

Afd. Diergeneesmiddelen 1985-06-14
RAPPORT 85.80 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: Bepaling van dapson, mono-
 acetyldapson en diacetyldapson
 in bloed, serum en melk.
Bijlagen: 6.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, bibliotheek
 (2x), afd. Diergeneesmiddelen (4x), projektbeheer, pro-
 jektleider (Aerts), circulatie.

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze

Onderwerp: Bepaling van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloed, serum en melk

Bijlagen: 6.

Doel:

Het ontwikkelen van een methode voor de bepaling van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloed, serum en melk met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie.

Samenvatting:

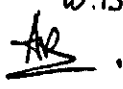
Er zijn methoden ontwikkeld voor de analyse van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloed en boerderijmelk. Na clean-up met behulp van Extrelutkolommen volgt analyse met isocratische reversed phase HPLC.

Conclusie:

De ontwikkelde methode voor bloed bleek te voldoen op een niveau tussen 0,1 en 100 µg/ml. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 0,05 µg/ml. Voor melk ligt het toepassingsgebied tussen 10 µg/l en 10 mg/l. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5 µg/l. Voor zowel bloed en melk bedroeg de recovery ca. 95%.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Mederwerker/Samensteller: W.M.J. Beek W.B.

Projektleider: drs M.M.L. Aerts 

1. Inleiding

Dapson (diamino-difenylsulfon) behoort tot de groep van sulfonen die zowel in de humane geneeskunde (lepra) alsook in de veterinaire praktijk wordt toegepast.

In het kader van het farmacokinetische en toxicologische onderzoek van dapson bij melkgevende runderen (pr.nr. 404.0840) was het nodig analysemethoden te ontwikkelen voor dapson en zijn twee metabolieten mono- en diacetyldapson in melk en bloed.

In de literatuur zijn voor de analyse van dapson en zijn twee metabolieten in plasma zowel HPLC alsook microbiologische methoden beschreven.

Vansant et al. (lit. 2), Jones et al. (lit. 7), Mannan et al. (lit. 8) beschrijven methoden voor de analyse van dapson, mono- en diacetyldapson in plasma tot op een niveau van 5 ng/ml.

Hierbij wordt na extractie van de stoffen uit bloed geanalyseerd met behulp van HPLC.

Zuidema et al. (lit. 1) beschrijft eveneens een HPLC methode maar hierbij wordt dapson vrij gemaakt door de eiwitten neer te slaan met perchloorzuur.

Verhoeven (lit. 11) voert dit ook uit met sulfonamiden.

Voor de bepaling van dapson in melk wordt door Ziv et al. (lit. 4) gebruik gemaakt van microbiologische methoden.

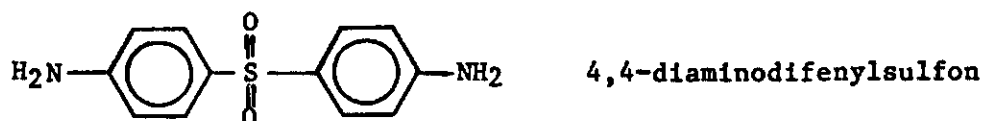
Van Gend et al. (lit. 12) bepaalt dapson en zijn metabolieten met behulp van FAST-LC. Chemische analysemethoden voor dapson in melk worden weinig beschreven.

Daarentegen zijn voor sulfonamiden in melk enkele spectroscopische methoden beschreven (lit. 9, 10).

Het doel van het onderzoek is een methode op te zetten welke het mogelijk maakt dapson, mono- en diacetyldapson in bloed en melk te bepalen. Hierbij dient gebruik te worden gemaakt van isocratische HPLC als analysetechniek.

2. Structuurformule

Dapson (DDS)



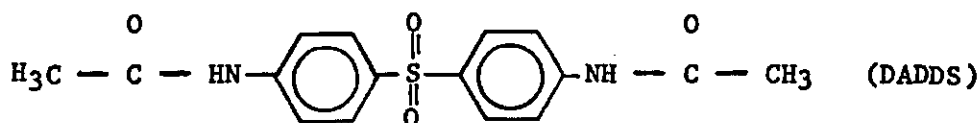
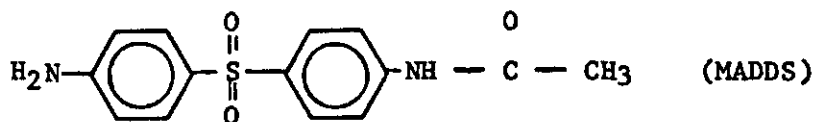
Molecuulformule: $C_{12}H_{12}N_2SO_2$.

Handelsnaam : Dapsone, Bovisone, Sandisone etc.

De stof is goed oplosbaar in acetonitril, ethylacetaat en methanol.

Matig oplosbaar in water. Het smeltpunt bedraagt 175-181°C.

De twee voornaamste metabolieten zijn monoacetyldapson (MADDS) en diacetyldapson (DADDS).



3. Ontwikkeling van een methode ter bepaling van dapson, monoacetyl- dapson en diacetyldapson in bloed

3.1 HPLC en UV detectie

De "reversed phase" hogedrukvloeistofchromatografie is de meest aangewezen techniek. De scheiding van DDS, MADDS en DADDS is zoals in de literatuur (lit. 7, 8, 2) al staat aangegeven niet problematisch. Op een μ Bondapak C18 (300 * 3,9) kolom van Waters konden ze moeizaam worden gescheiden.

Het eluens water-methanol-ijsazijn dat door Vansant (lit. 2) in de verhouding 1000-300-25 werd toegepast voldeed niet erg goed.

De binnen het RIKILT veel toegepaste Cp Spher C18 (250 * 4,6 mm) 10 μ kolom werd geprobeerd. Hierop was een goede scheiding mogelijk met een eenvoudig eluens. De samenstelling water-acetonitril 800-200 voldeed uitstekend bij een eluensnelheid van 2,0 ml/min.

Ook op het cartridgesysteem van Chrompack Cp Spher (200 * 3) 7 μ voldeed dit eluens bij een elutiesnelheid van 0,8 ml/min. Andere mengverhoudingen gaven slechtere scheidingen (overlapping etc.).

De metingen werden uitgevoerd door gebruik te maken van een UV detector bij 254 nm.

Dit is niet de ideale absorptiegolflengte. Met een diode array detector (HP 1040 A) werd de maximale absorptie bepaald. Deze bedroeg voor DDS 292 nm, MADDS 290 nm en voor DADDS 284 nm.

De instelling van de UV detector op 292 nm is acceptabel omdat de absorbtie maxima voor alle drie de stoffen niet op een scherpe piek liggen (bijlagen).

3.2 Analyse

Voor de analyse van bloed worden twee opwerkingsprocedures beschreven. Het neerslaan van de eiwitten met perchloorzuur waarna de oplossing geneutraliseerd wordt en geïnjecteerd op de HPLC en extractie van het bloed met een organisch oplosmiddel waarna na indampen hiervan en oplossen in eluens analyse volgt met HPLC.

Blanco bloed werd gespiked op een niveau van 1-80 µg/ml aan DDS, MADDS en DADDS. Hierna werd perchloorzuur toegevoegd na centrifugeren, een deel ervan geneutraliseerd met bicarbonaat en geïnjecteerd op het HPLC systeem.

Geen van de bloedmonsters bleek een van de drie stoffen te bevatten. Standaardoplossingen voorberekt volgens dezelfde procedure vertoonden wel een goede recovery zodat insluiting van de stoffen voor de hand ligt. Deze procedure voldoet dus niet. In plaats daarvan is een solid-phase extractieprocedure toegepast, uitgaande van Extrelut-kolommetjes. Deze zijn enige jaren geleden beschreven door Breiter (lit. 3, 5). Hierbij brengt men het monster op een kolom gevuld met dit adsorptiemateriaal (diatomeen aarde). Men laat het monster gedurende enige tijd intrekken en elueert hierna de te bepalen stoffen van de kolom met een organisch oplosmiddel. Gespiked bloed werd op een Extrelut 3 kolom (max. 3 ml) gebracht en geelueerd met dichloormethaan. De ingedampde fase opgelost in eluens en geïnjecteerd.

Resultaat was een lage wisselende recovery (20-70%). De aanbeveling om te verdunnen werd getest.

Eénmaal verdunnen bracht geen verbetering. Experimenteel bleek dat bij een verdunning van 0,5 ml bloed met 3,0 ml water de juiste verhouding werd verkregen. Van dit mengsel werd 2,0 ml op de Extrelut gebracht en geelueerd met 15 ml dichloormethaan.

De organische fase werd ingedampt en opgelost in 0,5 ml eluens en hierna geïnjecteerd op de HPLC. Het resultaat was voor DDS, MADDS en DADDS een recovery van ca. 95% (bijlage).

4. Ontwikkelen van een methode ter bepaling van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in melk

4.1 HPLC

Voor de analyse met HPLC werd uitgegaan van hetzelfde systeem als bij bloed.

4.2 Analyse in boerderijmelk

Op grond van de positieve bevindingen bij de analyse van bloed werd ook getracht hetzelfde uit te voeren met melk.

Ook nu voldeed de methode niet als men onverdunde boerderijmelk op een Extrelut (20 ml) bracht. Verdunning van het monster leek dus de meest voor de hand liggende methode. Eénmaal verdunnen bleek niet voldoende. Pas toen 5,0 ml boerderijmelk werd gemengd met 20,0 ml water en hiervan 15,0 ml op de Extrelut (20 ml model) gebracht bleek na elutie met dichloormethaan de recovery voor DDS, MADDS en DADDS 95%-100% te bedragen (bijlagen).

5. Eiwitbinding

Voor de bepaling van de eiwitbinding in bloed voor dapson en zijn twee metabolieten werden bekende hoeveelheden toegevoegd aan plasma.

Na 3 dagen te hebben laten staan bij 37°C werden de monsters geanalyseerd met extrelutmethode en ook door ze te filtreren door een ultrafiltratie unit (eiwitbindend) en daarna te analyseren. Het bleek dat bij de extrelutmethode alles werd teruggevonden (> 95% recovery) en de ultrafiltratie maar 6-9%.

Hieruit bleek dat met de Extrelutmethode zowel eiwitgebonden als vrije dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson gemeten werden. Deze methode werd ook gevolgd voor boerderijmelk. Hierbij werden vreemde waarden gevonden. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de verzuring van de melk tijdens de incubatieperiode.

De gevolgde procedure was niet toepasbaar voor melk.

De procedure dient herhaald te worden door gespikete-melk te bewaren bij 6°C en de melk te conserveren met b.v. natrium-azide.

6. Deglucuronidering

Voor de bepaling van de hoeveelheid als glucuronidevorm aanwezige dapson en monoacetyldapson moet aan praktijkmonsters glucuronidase/arylsulfatase worden toegevoegd.

Na incubatie (12 h) met het enzym dienen de monsters dan nogmaals te worden gemeten (lit. 6).

7. Conclusie

De ontwikkelde methode voor bloed bleek te voldoen op een niveau tussen 0,1 en 100 µg/ml.

De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 0,05 µg/ml. Voor melk ligt het toepassingsgebied tussen 10 µg/l en 10 mg/l. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5 µg/l. Voor zowel bloed en melk bedroeg de recovery ca. 95%.

8. Literatuur

8.1 Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of dapsone and monoacetyldapsone in biological fluids

J. Zuidema, E.S.M. Modderman, H.W. Hilbers, F.W.H.M. Merkus

Journal of Chromatography 182, 1980, pp. 130-135.

8.2 Normal distribution of acetylation phenotypes in systemic lupus erythematus

J. Vansant, R.L. Woosley, J.T. John, J.S. Sargent

Arthritis and Rheumatism vol. 21, no. 2, 1978, pp. 192-195.

8.3 Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids

J. Breiter, R. Helger and H. Lang

Forensic Science 7, 1976, pp. 131-140.

8.4 Dapsone residues in milk and the organs of cows after intramammary and intrauterine administration

G. Ziv and J.F.M. Nouws

Br. Vet. J. 1981, 137, pp. 388-397.

8.5 Extrelut

Neues Verfahren zur Extraktion Lipohiler Stoffe

Uitgave: Diagnostica Merck.

8.6 Bepaling van dapson, mono- en diacetyldapson in runderbloedplasma
Afdeling Diergeneesmiddelen. Rapport 85.37.

8.7 Determination of plasma concentrations of dapsone, monoacetyldapsone and pyrimethamine in human subjects dosed with maloprim

C.R. Jones and S.M. Ovenell

Journal of Chromatography 163 (1979) 179-185.

8.8 High Speed Liquid Chromatographic Analysis of Dapsone and Related Compounds

C.A. Mannan, G.J. Krol and B.T. Kho

Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 66, no. 11, 1979 pp. 1618-1623.

8.9 Improved Method for Determination of Sulfonamides in Milk and Tissues

F. Tishler, J.L. Sutter, J.N. Batish and H.E. Hagman
J. Agric. Food Chem. vol. 16, no. 1, 1968, pp. 50-53.

8.10 Determination of Sulfonamides in Milk

S.F. Houston and J.E. Umstead
Journal of the AOAC vol. 51, no. 5, 1968, pp. 1016-1019.

8.11 De serumconcentratie van enkele sulfonamiden en hun N⁴-acetylmetabolieten: bepaling en praktische betekenis voor de kliniek

R.T.M. Verhoeven
Pharmaceutisch Weekblad 117, 1978, pp. 845-847.

8.12 Geautomatiseerde bepaling van diaminodifenylsulfon (DDS) en zijn acetylmetabolieten (MADDS en DADDS) in melk, met behulp van het FAST-LC systeem.

M.B.C. Brinkman, E.M. Mattern en H.W. van Gend
Rapport IR/73/07/84/D06 Keuringsdienst van Waren, Utrecht.

Bijlagen:

1. Analysevoorschrift dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloed.
2. Analysevoorschrift dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in melk.
3. Chromatogram standaarden dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson op Cp Spher C18.
4. Absorptiespectra van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson.
5. Recoveryproeven plasma.
6. Recoveryproeven boerderijmelk.

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 404

1e oplage (1985-02-01)

BLOED - BEPALING VAN DAPSON, MONOACETYLDAPSON en DIACETYLDAPSON - HPLC

Verzendlijst: bibliotheek (5x), afdeling Diergeneesmiddelen (4x), sektorhoofd.

1. Doel en toepassingsgebied

De bepaling is geschikt voor de gelijktijdige kwantitatieve analyse van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloed, serum en plasma.

De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 0,05 µg/ml (10 maal de ruis). Het toepassingsgebied ligt tussen 0,1 µg/ml en 100 µg/ml. Het terugvindingspercentage (recovery) van de methode voor dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson bedraagt ca. 95%.

2. Principe

Bij een bekend volume monstermateriaal wordt water toegevoegd en gemengd. De waterige oplossing wordt op een Extrelut-kolom gebracht. Dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson worden van de extrelut-kolom geelueerd met behulp van dichloormethaan.

De organische fase wordt verdampt tot er een droog restant wordt verkregen. Na oplossen van het restant in HPLC eluens volgt analyse met behulp van isocratische "reversed phase" HPLC met UV detectie bij 292 nm.

Met de methode wordt het totale, zowel vrij als ook eiwitgebonden dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in het materiaal bepaald.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Millipore water.

3.2 Acetonitril, Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck art. 30).

3.3 Dichloormethaan (b.v. Merck art. 6050).

3.4 Methanol (b.v. Merck art. 6009).

3.5 HPLC eluens

Meng 800 ml millipore water met 200 ml acetonitril (Lichrosolv).

3.6 Extrelut kolommen (3 ml) (Merck art. 15372) met aan de onderzijde een naald.

3.7 Ultrafiltratie units (Amicon produkt no. 4104).

3.8 Dapson standaardstof.

3.8.1 Dapson standaardoplossingen

Weeg op 0,1 mg nauwkeurig 25 mg standaardstof af in een maatkolf van 100 ml en los op in methanol, vul aan en meng (oplossing A). Breng 10,0 ml van deze oplossing in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing B).

Breng 10,0 ml van oplossing B in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing C).

Breng 10,0 ml van oplossing C in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing D).

Breng 10,0 ml van oplossing D in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing E).

Breng van oplossing A, B, C, D, en E precies 2,0 ml in afzonderlijke cultuurbuizen. Verdamp de methanol met behulp van een stikstofstroom en los het residu op in precies 2,0 ml HPLC eluens.

De aldus verkregen standaardoplossingen bevatten 250 µg/ml; 25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,025 µg/ml aan dapson ten behoeve van HPLC.

3.9 Monoacetyldapson standaardstof

3.9.1 Monoacetyldapson standaardoplossingen

Weeg af en handel als bij dapson om standaardoplossingen te verkrijgen met eenzelfde concentratie.

3.10 Diacetyldapson standaardstof

3.10.1 Diacetyldapson standaardoplossingen

Weeg af en handel als bij dapson om standaardoplossingen te verkrijgen met eenzelfde concentratie.

3.11 Sulfatase/glucuronidase (Sigma S-3009).

3.12 Fosfaatbuffer pH 5,0 (1 Molair)

Los 174,09 g dikaliumfosfaat op in 500 ml water en stel de pH in op 5,0 met zoutzuur (6 N). Vul hierna aan tot 1 liter en meng.

3.13 Glucuronidaseoplossing (+ 40 mg/ml)

Los 10 mg sulfatase/glucuronidase (3.11) op in 250 µl buffer pH 5,0.

4. Apparatuur

4.1 Vibro-fix (Ika).

4.2 Centrifuge.

4.3 HPLC opstelling voor isocratische "reversed phase" met een variabele golflengte.

UV-detektor en een CP Spher C18 (250 x 4,6) 10 µ kolom.

Als voorkolom een Bondapak/Corasil C18 kolom (20 x 3,9) 37-50 µ.

4.4 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Analyse monstermateriaal (0,5 µg/ml - 100 µg/ml)

Pipetteer 0,5 ml monstermateriaal in een cultuurbuis. Pipetteer hierbij 3,0 ml water en meng op een vortex menger gedurende 15 seconden.

Pipetteer 2,0 ml van het mengsel op de Extrelut-kolom en laat 15 minuten in het pakkingsmateriaal trekken.

Elueer nu dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson van de extrelut met behulp van 15 ml dichloormethaan via de naald in een 25 ml buis met ingeslepen stop.

Verdamp de organische fase onder een stikstofstroom tot droog.

Los het restant op in precies 0,5 ml HPLC eluens (gebruik een vortex mixer). Injecteer 50 μ l van deze oplossing in het HPLC systeem.

5.2 Analyse monstermateriaal (0,05 μ g/ml-0,5 μ g/ml)

Pipetteer 0,5 ml monstermateriaal in een cultuurbuis. Pipetteer hierbij 3,0 ml water en meng op een vortex mixer gedurende 15 seconden.

Pipetteer 30 μ l van het mengsel op de Extrelut-kolom en laat 15 minuten in het pakkingsmateriaal trekken.

Elueer nu dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson van de extrelut met behulp van 15 ml dichloormethaan via de naald in een 25 ml buis met ingeslepen stop.

Verdamp de organische fase onder een stikstofstroom tot droog.

Los het restant op in precies 0,25 ml HPLC eluens (gebruik een vortex mixer). Injecteer 100 μ l van deze oplossing op het HPLC systeem.

5.3 Eiwitbinding

Breng 1 ml monstermateriaal in een ultrafiltratieunit (Amicon produkt nr. 4104) en centrifugeer net zolang totdat voldoende monstermateriaal is verkregen (2000 rpm).

Injecteer het eiwitvrije monstermateriaal direkt in het HPLC systeem (injectievolume 50 μ l).

5.4 Deglucuronidering

Breng 500 μ l monstermateriaal in een buis van 25 ml. Voeg toe 500 μ l 1 M fosfaatbuffer pH 5,0 en 10 μ l sulfatase/glucuronidase (Sigma S-3009; \pm 40 mg/ml in buffer) en meng het geheel.

Sluit de buis af en zet ze 3 uur in een stoof bij 37°C.

Vervolg nu de analyse zoals staat beschreven in 5.1 en houdt rekening met de verdunning.

6. HPLC opstelling

Kolommen

Analytische kolom: CP Spher C18 (250 x 4,6 mm)
10 μ (Chrompack)
Voorkolom : Bondapak C18 (ϕ 20 x 3,9 mm)
37-50 μ (Waters)
Eluens : Water-acetonitril 800-200.
Eluenssnelheid : 2,0 ml/min.
Detectie : UV 292 nm.
Injectievolume : 50 of 100 μ l.
Retentietijd : tussen 10-16 minuten.

7. Uitvoering

Breng 50 of 100 μ l van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de pieken met die, die met één van de standaardoplossingen wordt verkregen. Bereken het gehalte in μ g/ml aan dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in het monster (let op de verdunning van het monster).

8. Opmerkingen

8.1 Voor recoveryproeven dient men van de standaardoplossingen in methanol een bekende hoeveelheid te pipetteren in een buis en af te dampen met behulp van stikstof.

Hierna bloed, plasma etc. in de buis brengen en de analyse volgen zoals staat beschreven.

Bij elke serie dient steeds een blanco monster en een blanco monster met toevoeging van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson meegenomen te worden.

9. Literatuur

9.1 Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of dapsone and monoacetyldapsone in biological fluids.
J. Zuidema, E.S.M. Modderman, H.W. Hilbers and F.W.H.M. Merkus
Journal of Chromatography, 182 (1980) 130-135.

9.2 Normal Distribution of Acetylation Phenotypes in Systemic Lupus Erythematosus.

J. Vansant, R.L. Wosley, J.T. John and J.S. Sargent.
Arthritis and Rheumatism vol. 21, no. 2 (Marck 1978) 192-195.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Samensteller : W.M.J. Beek W.B.

AR

Bijlage 2.

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 424

1e oplage (1985-09-20)

MELK - BEPALING VAN DAPSON, MONOACETYLDAPSON EN DIACETYLDAPSON - HPLC

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorchef, afdeling DGM (5x).

Melk - Bepaling van dapson, mono-acetyldapson en diacetyldapson - HPLC

1. Doel en toepassingsgebied

De bepaling is geschikt voor de kwantitatieve analyse van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in magere melk, volle melk en boerderijmelk.

De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5 µg/ml. Het toepassingsgebied ligt tussen 10 µg/ml en 10 mg/ml.

Het terugvindingspercentage (recovery) van de methode voor dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson bedraagt ca. 95%.

2. Principe

Bij een bekend volume monstermateriaal wordt water toegevoegd en gemengd. De waterige oplossing wordt op een Extrelut-kolom gebracht. Dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson worden van de extrelutkolom geëluëerd, met behulp van dichloormethaan.

De organische fase wordt verdampt tot er een droog restant wordt verkregen. Na oplossen van het restant in HPLC eluens volgt analyse met behulp van isocratische "reversed phase" HPLC met UV-detektie bij 292 nm.

Met de methode wordt het totale, zowel vrij alsook eiwit gebonden, aan dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in het materiaal bepaald.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Millipore water.

3.2 Acetonitril, Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck art. 30).

3.3 Dichloormethaan (b.v. Merck art. 6050).

3.4 Methanol (b.v. Merck art. 6009).

3.5 HPLC-eluens.

Meng 800 ml millipore water met 200 ml acetonitril (Lichrosolv).

3.6 Extrelut-kolommen (20 ml) (Merck art. 11737).

3.7 Dapson standaardstof.

3.7.1 Dapson standaardoplossingen.

Weeg op 0,1 mg nauwkeurig 25 mg standaardstof af in een maatkolf van 100 ml en los op in methanol, vul aan en meng (oplossing A).

Breng 10,0 ml van deze oplossing in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing B).

Breng 10,0 ml van oplossing B in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing C).

Breng 10,0 ml van oplossing C in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing D).

Breng 10,0 ml van oplossing D in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing E).

Breng van oplossing A, B, C, D en E precies 2,0 ml in afzonderlijke cultuurbuizen. Verdamp de methanol met behulp van een stikstofstroom en los het residu op in precies 2,0 ml HPLC eluens.

De aldus verkregen standaardoplossingen bevatten 250 µg/ml; 25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,025 µg/ml aan dapson ten behoeve van HPLC.

3.8 Monoacetyldapson standaardstof (verkregen via dr Eggelte of via synthese).

3.8.1 Monoacetyldapson standaardoplossingen.

Weeg af en handel als bij dapson om standaardoplossingen te verkrijgen met eenzelfde concentratie.

3.9 Diacetyldapson standaardstof (verkregen via dr T. Eggelte of via synthese).

3.9.1 Diacetyldapson standaardoplossingen.

Weeg af en handel als bij dapson om standaardoplossingen te verkrijgen met eenzelfde concentratie.

4. Apparatuur

4.1 Vibro-fix (Ika).

4.2 Centrifuge.

4.3 HPLC-opstelling voor isocratische "reversed phase" met een variabele golflengte UV-detektor en een Cp Spher C18 (250 x 4,6) 10 µ kolom.

Als voorkolom een Bondapak/Corasil C18 (20 x 3,9) 37-50 µ.

4.4 Normaal laboratoriumglaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Analyse monstermateriaal (0,5 µg/ml - 100 µg/ml).

Pipetteer 5,0 ml melk in een buis van 25 ml met ingeslepen stop.

Pipetteer hierbij 20,0 ml water en meng het geheel.

Pipetteer 15,0 ml van het mengsel op de goed gepakte Extrelut-kolom en laat 20-30 minuten in het pakkingsmateriaal trekken.

Elueer nu dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson van de extrelut met behulp van 40 ml dichloormethaan via de naald in een 25 ml buis met ingeslepen stop.

Verdamp de organische fase onder een stikstofstroom tot er een olieachtig restant wordt verkregen. Voeg nu aan het restant 3 ml methanol en verdamp opnieuw onder de stikstofstroom. Herhaal het nogmaals.

Los het droge residu op in precies 0,5 ml HPLC eluens.

Voeg toe 2 ml isooctaan en schud het geheel 30 seconden.

Centrifugeer nu 5 minuten (ca. 800 rpm) en filtreer de onderstaande laag door een 0,45 µm HV filter (klein dood volume).

Injecteer 50 µl van deze oplossing in het HPLC systeem.

6. HPLC-instelling

Kolommen:

Analytische kolom: Cp Spher C18 (250 x 4,6 mm)
10 µ (Chrompack)
Voorkolom : Bondapak C18 (320 x 3,9 mm)
37-50 µ (Waters)
Eluens : water-acetonitril 800-200
Eluensnelheid : 2,0 ml/min
Detectie : UV 292 nm
Injectievolume : 50 µl
Retentietijd : 10-16 minuten.

7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de pieken met die, die met één van de standaardoplossingen wordt verkregen.

Bereken het gehalte in µg/ml aan dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in het monster (let op de verdunning van het monster).

8. Opmerkingen

8.1 Voor recovery proeven dient men van de standaardoplossingen in methanol een bekende hoeveelheid te pipetteren in een buis en af te dampen met behulp van stikstof.

Hierna melk in de buis brengen en de analyse volgen zoals staat beschreven.

8.2 Bij magere melk is het mogelijk zonder verdunning de analyse uit te voeren.

9. Literatuur

9.1 Evaluation of column extraction: A new procedure for the analysis of drugs in body fluids.

J. Breiter, R. Helger and H. Lang.
Forensic Science, 7 (1976) 131-140.

9.2 Dapsone residues in milk and the organs of cows after intramammary and intrauterine administration.

G. Ziv and J.F.M. Nouws
Br. Vet. J. 1981, 137, pp 388.

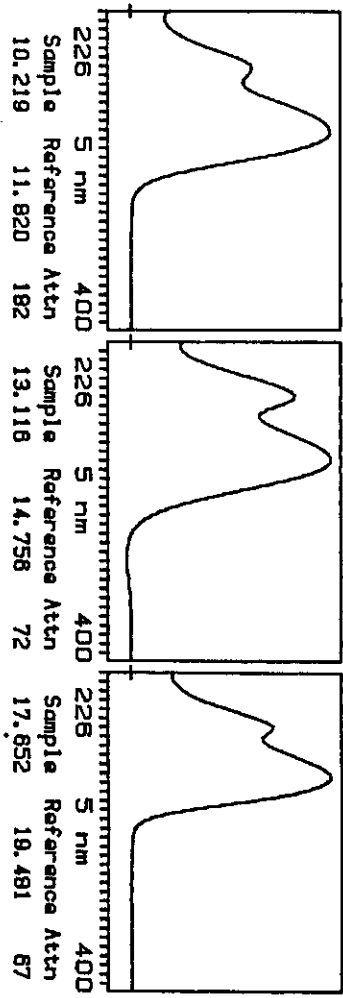
9.3 Absorption, Distribution and Elimination of Dapsone in Goats.

G. Ziv, A. Dekker en R. Hageman.
Refuak vet 35 (2) 1978 pp. 41-57.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts MA
Samensteller : W.M.J. Beek WB

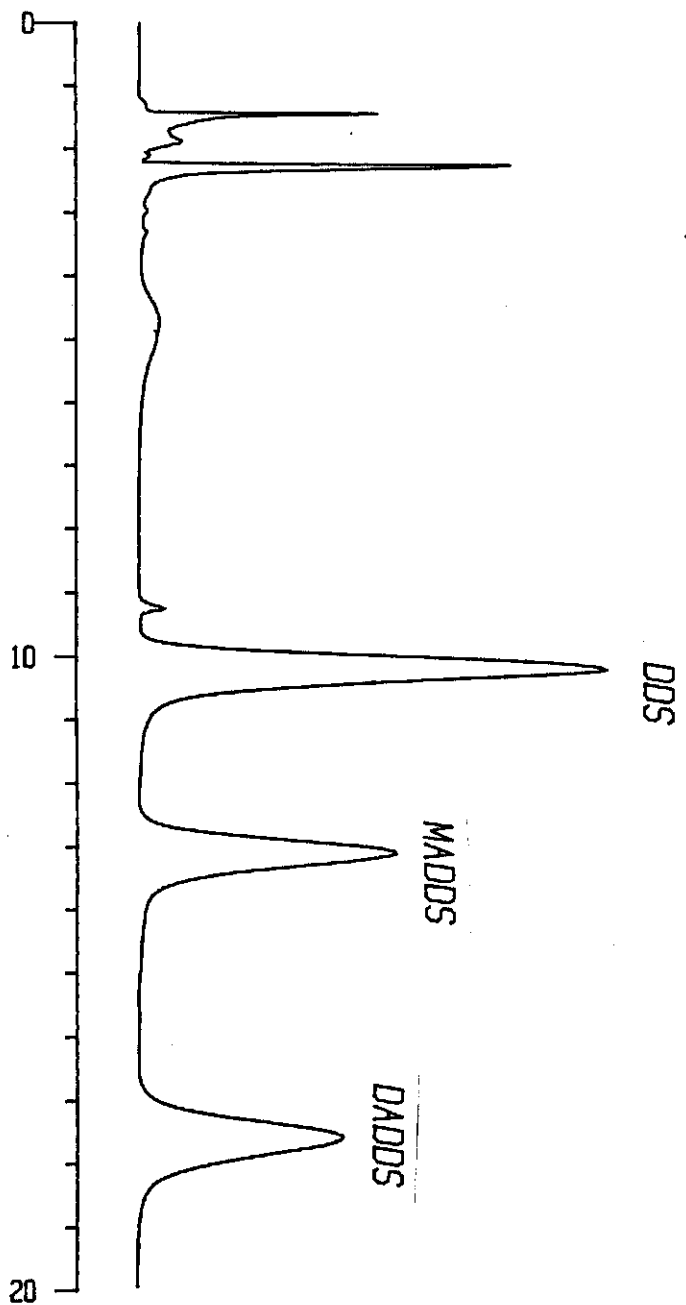
File: RAW 1
Date: 01/31/1985

RIKILT
origin



DDS; MADDs; DADDs
sample id.

hp 1040A



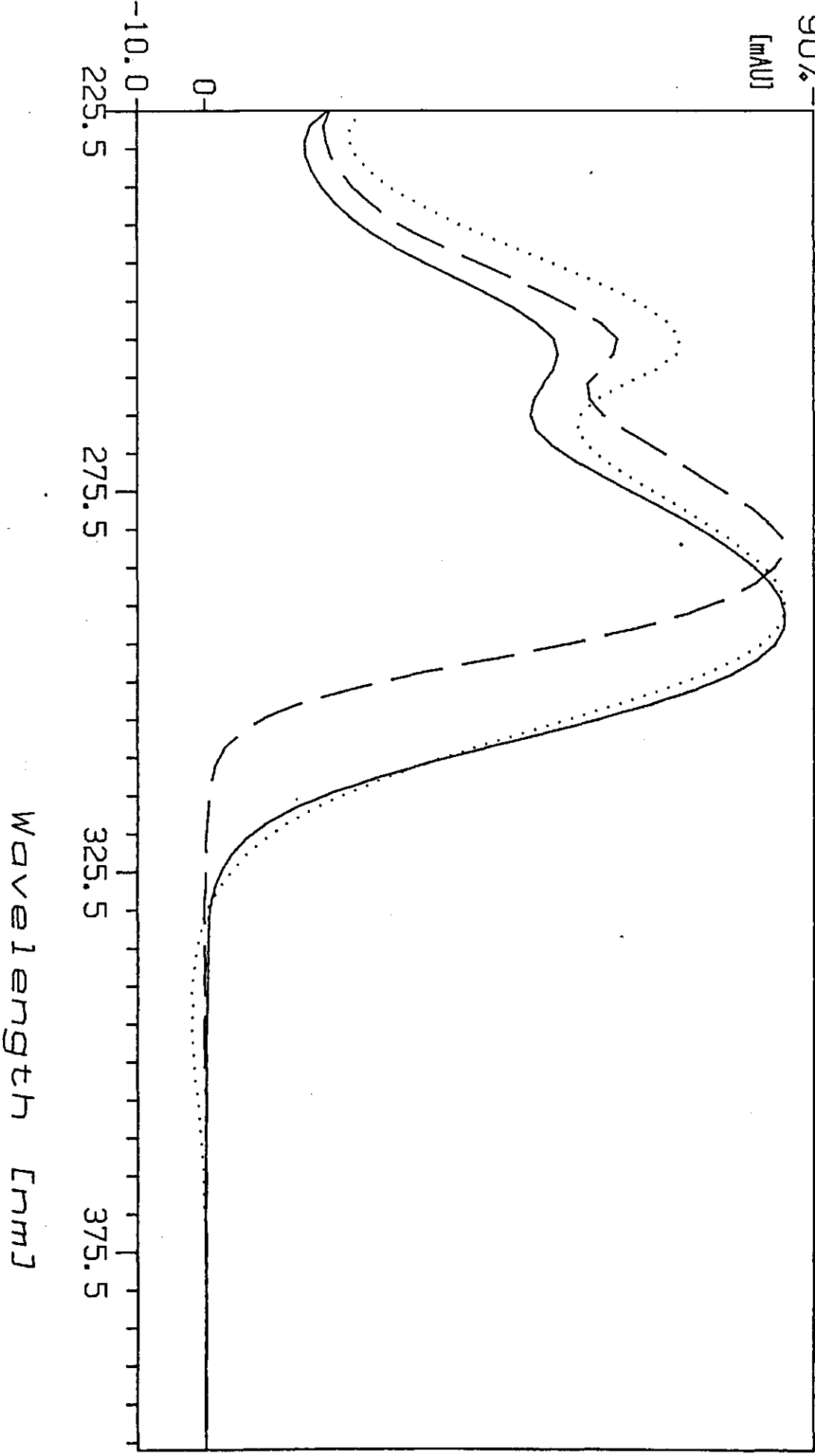
inj. vol. 200 μ L
mobile ph. WATER - ACETONITRIL
" " 800 - 200
" " 0.8 ml/min
stat. ph. Cp SPHER C18
column 200*3
Inj. Time: 08:51
Attn (mAU): 125.0 (90.7)
Zero%: 10%
Signal: A: 3.0 Set

Wavelength: 1. 210, 4
2. 244, 4
3. 254, 4
4. 280, 4
5. 280, 4
6. 320, 4
7. 450, 50
8. 550, 100

Time [min]

Operator:

File: RAW 1 RAW 1 RAW 1
Date: 01/31/1985 01/31/1985 01/31/1985
Spectrum [min]: 10.2188 13.1162 17.6517
Reference [min]: 11.8197 14.7557 19.4813
Attn [mAU]: 182.0 71.9 66.9
Absorbance [mAU] (nm): 156.0 (292/ 2) 61.6 (290/ 2) 57.4 (284/ 2)



Boerderijmelk

	Recovery
	%
Blanco melk	
Blanco melk + 8,48 ppb DDS	92
6,42 ppb MADDS	91
4,52 ppb DADDS	97
Blanco melk + 169,6 ppb DDS	96
128,4 ppb MADDS	93
90,4 ppb DADDS	96
Blanco melk + 424 ppb DDS	96
321 ppb MADDS	100
226 ppb DADDS	103
Blanco melk + 848 ppb DDS	99
642 ppb MADDS	101
452 ppb DADDS	100
Blanco melk + 1,696 ppm DDS	106
1,284 ppm MADDS	102
0,904 ppm DADDS	108
Gem. rec. DDS = 97,8%	S = 5,2
MADDS = 97,4%	S = 5,0
DADDS = 100,8%	S = 4,9

Bloedplasma

	Recovery %
Blanco plasma	
Blanco plasma + 8,48 µg/ml DDS	91
6,42 µg/ml MADDs	92
4,52 µg/ml DADDs	88
Blanco plasma + 16,96 µg/ml DDS	103
12,84 µg/ml MADDs	101
9,04 µg/ml DADDs	97
Blanco plasma + 33,92 µg/ml DDS	100
25,68 µg/ml MADDs	94
18,08 µg/ml DADDs	91
Gem. rec. DDS = 98%	S = 6,2
MADDs = 96%	S = 4,7
DADDs = 92%	S = 4,6