

Afd. Diergeneesmiddelen 1985-11-13
RAPPORT 85.125 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: De geautomatiseerde bepaling
van dapson, monoacetyldapson en diacetyl-
dapson in bloedplasma door on-line voor-
zuivering d.m.v. HPLC-kolomschakeling en
on-line UV-detectie

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, directie VKA, Bibliotheek
(2x), afd. Diergeneesmiddelen (4x), Projektbeheer, Pro-
jektleider (Aerts), circulatie.

Project: Ontwikkelen methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze

Onderwerp: De geautomatiseerde bepaling van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloedplasma door on-line voorzuivering d.m.v. HPLC-kolomschakeling en on-line UV-detectie

Doel:

Het ontwikkelen van een snelle, automatiseerbare analysemethode voor dapson en metabolieten in bloedplasma ten behoeve van farmacokinetisch en toxicologisch onderzoek.

Samenvatting:

Nagegaan is wat de mogelijkheden en de problemen zijn voor het bepalen van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloedplasma met HPLC-kolomschakeling.

Daartoe worden de componenten geconcentreerd op een voorkolom, waarna matrixcomponenten verwijderd worden door spoelen met water. Elutie vindt plaats naar de analytische kolom in de back-flush richting. De volgende parameters zijn bestudeerd: doorslagvolumina voorkolom, lineariteit, invloed eiwitbinding en de-glucuronidering. Om de methode in de praktijk te toetsen zijn van een proefdier dat intraveneus dapson toegediend gekregen had de plasmamonsters geanalyseerd.

Conclusie:

Met de beschreven methode kunnen plasmamonsters geanalyseerd worden op dapson, monoacetyldapson, diacetyldapson en eventuele andere metabolieten. De detectiegrens voor dapson bedraagt 2 ng/ml plasma en voor mono- en diacetyldapson 5 ng/ml. De automatische analyse zonder noemenswaardige voorbewerking levert aanzienlijke tijdwinst op en goede resultaten. De methode lijkt ook voor andere componenten geschikt, hoewel in elk afzonderlijk geval gekeken moet worden naar concentreringsmogelijkheden en de invloed van eiwitbinding.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts
Medewerker/Samensteller: H.J. Keukens
Projectleider: drs M.M.L. Aerts



Inleiding

In het kader van het farmacokinetisch en toxicologisch onderzoek van dapson bij melkgevende runderen (pr.nr. 404.0850) moest een groot aantal plasmamonsters geanalyseerd worden. Een "normale" HPLC-methode [1] uitgaande van extractie in combinatie met voorzuivering is tamelijk arbeidsintensief en de directe meting na precipitatie van eiwitten volgens Zuidema et al. [2] gaf slechte resultaten.

In de literatuur wordt een aantal malen beschreven dat kolomschakeling geschikt is voor het bepalen van geneesmiddelen in plasma en/of serum [3-10]. Deze methode is te automatiseren terwijl de monstervoorbewerking vrijwel nihil is.

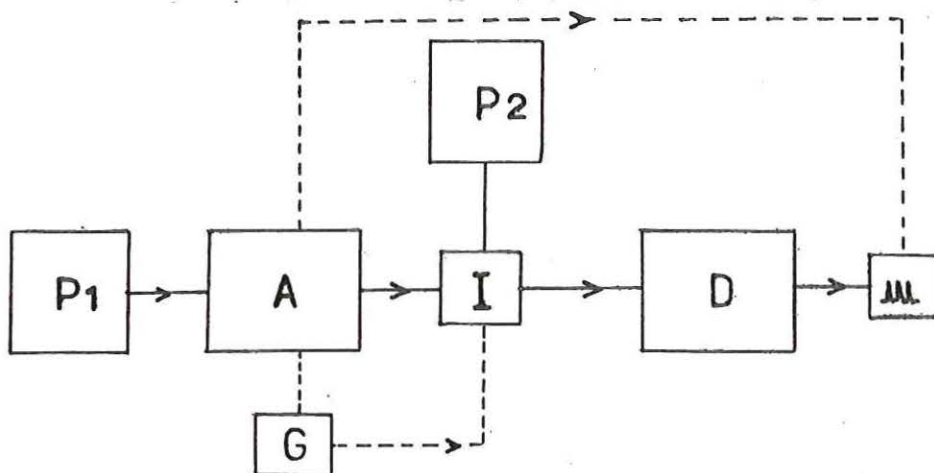
Als eerste aanzet voor toepassing van kolomschakeling voor het bepalen van diergeneesmiddelen werd nagegaan in hoeverre deze methode toepasbaar is voor het bepalen van dapson (DDS), monoacetyldapson (MADDS), diacetyldapson (DADDS) en andere metabolieten in plasma.

Experimenteel gedeelte

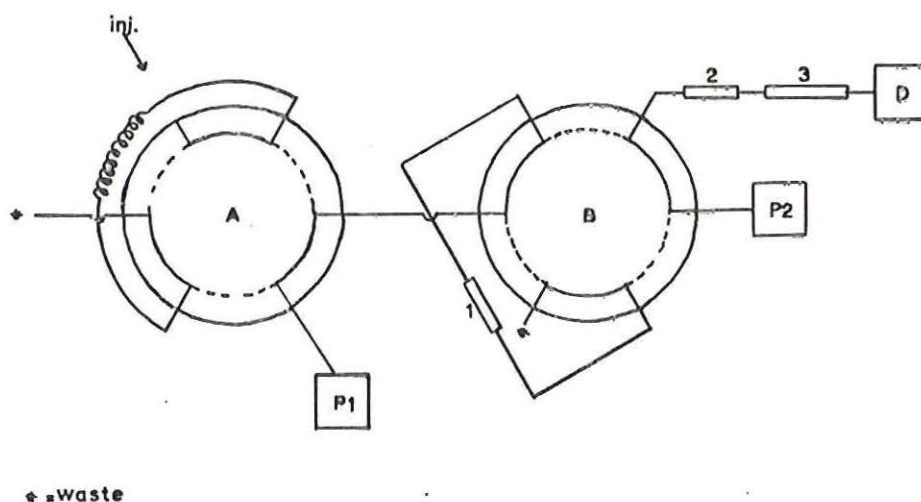
Apparatuur

Het kolomschakelingssysteem bestond uit een injectieautomaat WISP 710 B (Waters), een automatische gradientcontroller 680 (Waters), twee model 6000A pompen (Waters), een MUST kolomschakeleenheid (Kratos) en een UV-detector model PU 4020 (Pye Unicam). De chromatogrammen werden opgenomen met een recorder type BD 41 (Kipp).

De gebruikte opstelling is schematisch weergegeven in figuur 1 en 2.



Figuur 1 Schema van de opstelling voor automatische analyse van plasmamonsters. P1 en P2, HPLC pompen; A, injectieautomaat; G = gradientcontroller; I, MUST; D, detector



Figuur 2 Schema van de kolomschakeling. A, injectieautomaat; B, schakelkraan; 1, préconcentreringskolom; 2, guard kolom; 3, analytische kolom.

De préconcentreringskolom en guard kolom (70 x 2,1 mm ID) waren gevuld met Bondapack C18 materiaal (Waters) met deeltjesgrootte 37-50 μm . Beide kolommen waren voorzien van 20 μm frits (Altech). De analytische kolom was een cartridge kolom (200 mm x 3 mm ID) gepakt met CPT[™] Spher C18 7 μm (Chrompack). De préconcentratie en voorzuivering werd uitgevoerd met water (pomp P1) en het eluens bestond uit een mengsel van water en acetonitril 80:20 v/v (pomp P2). Het eluensdebiet bedroeg 0,8 ml/min en de meetgolflengte 292 nm.

Chemicaliën

Alle chemicaliën waren van analytische kwaliteit (Merck). Water werd bereid met een Milli Q^R waterzuiveringsinstallatie. Dapson (4,4'-diaminodiphenylsulfon) was afkomstig van Sigma en de metabolieten mono- en diacetyldapson waren een gift van de KvW Utrecht.

Methode

De plasmamonsters werden voor de analyse eerst zorgvuldig gemengd, vervolgens gedurende 5 minuten gecentrifugeerd (1000 rpm) en gefiltreerd over een acrodisc^R filter van 0,45 μm (Gelman).

De eerste twee druppels van het filtraat werden verworpen. Van het filtraat werd rechtstreeks 200 μ l geïnjecteerd op de pré-concentreringskolom.

Resultaten en discussie

Pré-concentreringskolom

Om dapson en de beide metaboliëten met kolomschakeling te kunnen bepalen is het noodzakelijk dat gedurende het spoelen met water de componenten op de voorkolom worden vastgehouden. Daartoe zijn de doorslagvolumina bepaald. De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 3.

Gebleden is dat er verliezen aan dapson optreden na een spoelvolumen van 4 ml. Of het debiet van pomp P1 0,5 of 1 ml/min bedraagt blijkt daarop niet van invloed. Voor monoacetyl- en diacetyldapson werden tot een spoelvolumen van 10 ml geen verliezen waargenomen.

De standaarden bleken over het traject van 0,01 tot 1 μ g/ml bij een spoelvolumen van 4 ml geen verliezen te geven wat blijkt uit de ijklijnen welke weergegeven zijn in figuur 4.

Op basis van deze resultaten werd gekozen voor spoelen van de pré-concentreringskolom met water gedurende 4 minuten met 1 ml per minuut. Het programma voor de automatische analyse is weergegeven in tabel 1.

Tabel 1 Programma voor de geautomatiseerde analyse van dapson en metaboliëten in plasma met kolomschakeling

Tijd (min)	Actie
0	Injectie 200 μ l Start recorder Injectiemarkering
4	Omschakeling kraan B waardoor dapson en metaboliëten van de pré-concentreringskolom geelueerd worden in backflush
5	Kraan B naar oorspronkelijke positie
20	Einde analyse

Het starten van de recorder, de injectiemarkering en het aanroepen van het tijdprogramma gebeurt vanuit de injectieautomaat.

Het eventsignaal vanuit de gradientcontroller voor het omschakelen van kraan B van 12V wordt middels een relais omgezet in een spanningsloos signaal omdat de MUST voorzien is van eigen voeding.

Terugvindingspercentages en detectiegrenzen

Aan blanco plasmamonsters werd een hoeveelheid dapson, monoacetyl- en diacetyldapson toegevoegd overeenkomend met een gehalte van 0,1 µg/ml. Het terugvindingspercentage bedroeg voor dapson 93% (CV = 4,0%, n=8) voor monoacetyldapson 94% (CV = 3,6%, n=8) en voor diacetyldapson 91% (CV = 5,1%, n=8).

Een experiment met toevoeging op een niveau van 1 µg/ml gaf recoveries van resp. 98, 96 en 90%. Een aantal kenmerkende chromatogrammen is gegeven in figuur 5.

De detectiegrens bedraagt voor dapson 2 ng/ml en voor monoacetyl- en diacetyldapson 5 ng/ml.

Eiwitbinding

Volgens Ziv et al. [11] zijn dapson en monoacetyldapson in serum na toediening aan geiten voor meer dan 80% eiwitgebonden. Aan de hand van praktijkmonsters van een toedieningsproef aan melkgevend runderen werd de invloed van eiwitbinding nagegaan. Daartoe werden de monsters in de oorspronkelijke vorm geanalyseerd en na ultrafiltratie. De resultaten zijn gegeven in tabel 2.

Tabel 2 Analyseresultaten van dapson en mono-acetyldapson in een aantal plasmamonsters voor en na ultrafiltratie

monster-nummer	code	component	gehalte in µg/ml		
			normaal	ultrafiltraat	% eiwitbinding
1	12-8	DDS	0,065	0,004	94
		MADDS	1,022	0,011	99
2	12-10	DDS	0,048	<0,002	>96
		MADDS	0,785	0,010	99
3	11-10*	DDS	3,61	2,95	18
		MADDS	13,4	9,21	31
4	11-7.30**	DDS	27,4	23,2	15
		MADDS	17,9	12,5	30

* Monster 50x verdund met water

** Monster 100x verdund met water

Gezien de resultaten van de monsters 1 en 2 kon geconcludeerd worden dat de aanwezige eiwitbinding tussen plasma-eiwitten en DDS en MADDS op de voorkolom vrijwel compleet verbroken werd. Dit bevestigde de resultaten van de terugvindingsexperimenten. De interactie met het C-18 materiaal was kennelijk sterker dan de binding met de eiwitten, een fenomeen dat voor andere geneesmiddelen eerder werd waargenomen door Roth [9] en Voelter et al. [5]. De resultaten van de monsters 3 en 4 duiden erop dat een groot deel van de eiwitbinding al verbroken wordt bij verdunning van het monster met water.

Déglucuronidering

Door aan een achttal plasmamonsters van diverse dieren β -glucuronidase toe te voegen is nagegaan of dapson en monoacetyldapson al dan niet geglucuronideerd voorkomen in plasma.

Daartoe is aan 1 ml plasma telkens 10 μ l helix pomatia (Merck) toegevoegd. De monsters zijn gedurende 2 uur geïncubeerd bij 37°C en vervolgens na filtratie direct geanalyseerd overeenkomstig de beschreven methode. De resultaten zijn gegeven in tabel 3.

Tabel 3 Analyseresultaten voor dapson en monoacetyldapson in bloedplasma vóór en na déglucuronidering

diernr.	code	gehalten in μ g/ml			
		dapson		monoacetyldapson	
		I	II	I	II
396	9-14.00	0,54	0,64	3,5	3,6
	9-21.00	0,18	0,22	2,0	2,0
1102	9- 8.00	2,8	3,2	3,8	3,9
	9-12.00	3,2	3,3	7,2	7,2
383	9- 7.30	0,91	0,97	0,43	0,46
	9-18.00	1,5	1,4	2,0	2,0
441	9-10.00	1,8	1,6	1,2	1,3
	9-18.00	1,0	1,1	2,3	2,5

I = zonder déglucuronidering

II = na déglucuronidering

Uit de resultaten blijkt dat er geen duidelijke verschillen optreden tussen de analyseresultaten zonder en met déglucuronidering voor dapson en monoacetyldapson.

De conclusie is dat er geen grote hoeveelheden van deze componenten in bloedplasma voorkomen in de glucuronidevorm.

Analyseresultaten

Van een proefdier dat intraveneus dapson toegediend heeft gekregen werden de plasmamonsters geanalyseerd overeenkomstig de procedure zoals eerder beschreven. De resultaten zijn gegeven in tabel 4 en de grafische weergaven in figuur 6.

Tabel 4 Analyseresultaten voor dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloedplasma van proefdier nr. 1106 (dapson intraveneus, 11 april 7.00 uur)

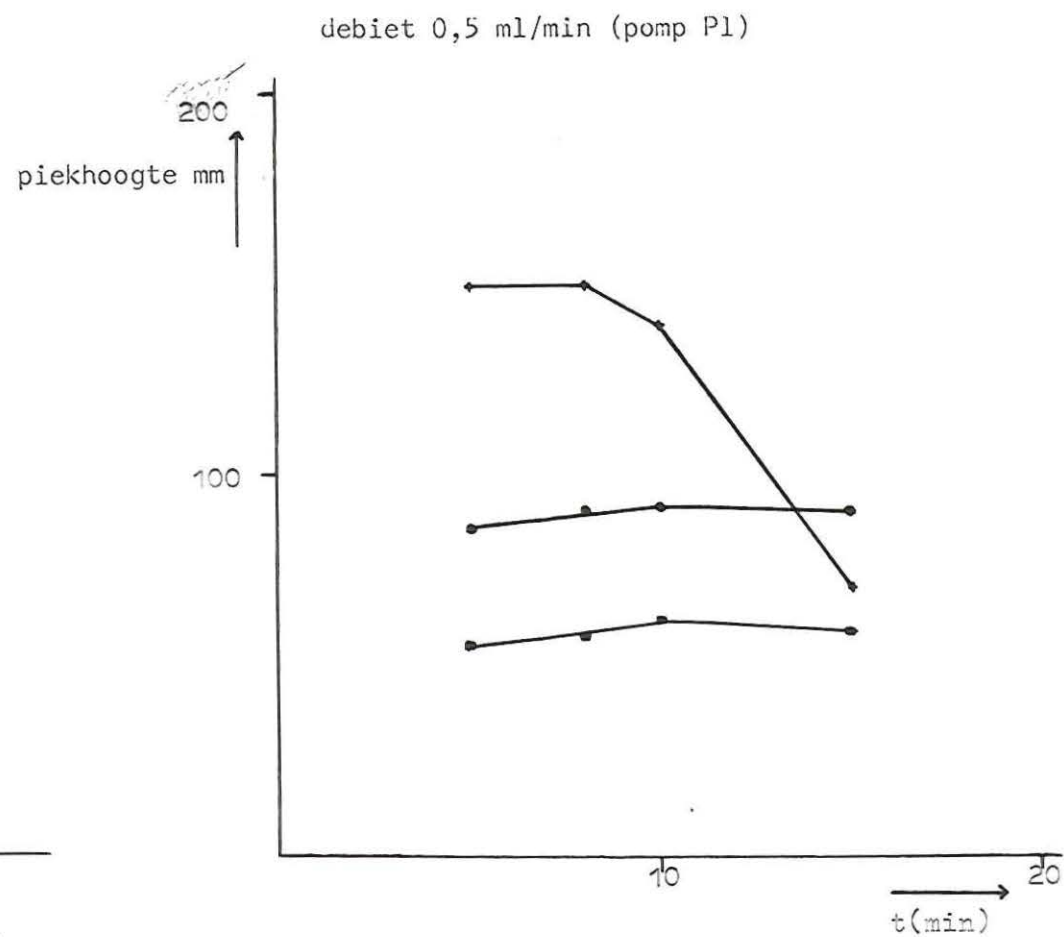
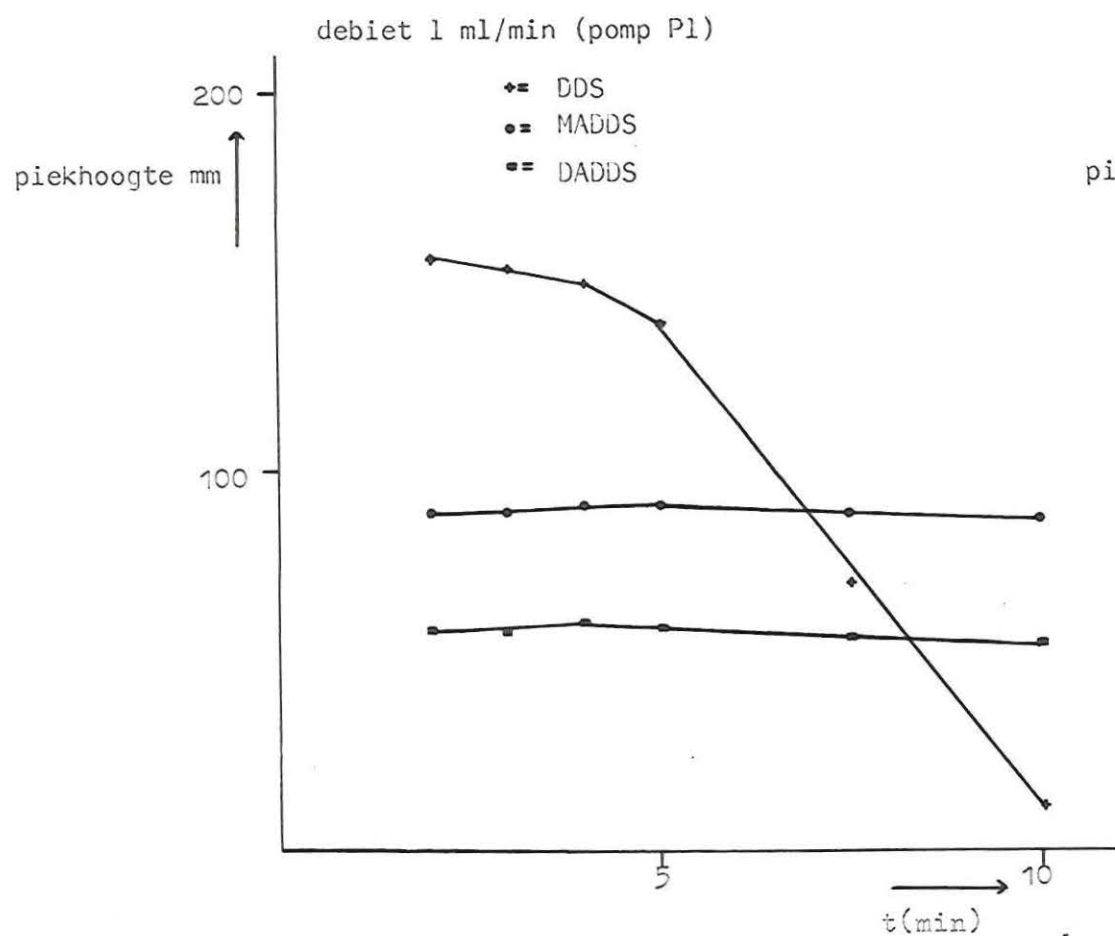
Datum be- monstering	Tijdstip	Gehalte in µg/ml		
		DDS	MADDS	DADDS
11	7.00	0,002	<0,005	<0,005
11	7.30	27,4	17,9	0,017
11	10.00	3,6	13,4	0,049
11	12.00	1,6	8,1	0,049
11	14.00	0,75	6,1	0,053
12	8.00	0,065	1,0	0,015
12	10.00	0,048	0,78	0,012
12	12.00	0,043	0,61	0,010
12	14.00	0,025	0,41	0,007
13	8.00	0,007	0,090	<0,005
13	10.00	0,007	0,082	<0,005
13	14.00	0,013	0,058	<0,005
14	8.00	0,002	0,022	<0,005
16	14.00	<0,002	<0,005	<0,005

Conclusie

Gezien de resultaten van het onderzoek voldoet de beschreven methode voor het bepalen van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloedplasma tot op het niveau van tenminste 10 µg/kg. De monsters kunnen zonder een uitgebreide voorbereiding automatisch geanalyseerd worden wat een aanzienlijke tijdsbesparing tot gevolg heeft. Voor andere, in de toekomst te bepalen componenten zal telkens nagegaan moeten worden of er pakkingsmateriaal voor de pré-concentreringskolom voorhanden is waarop de componenten te concentreren zijn en waarmee de eventuele eiwitbinding verbroken wordt.

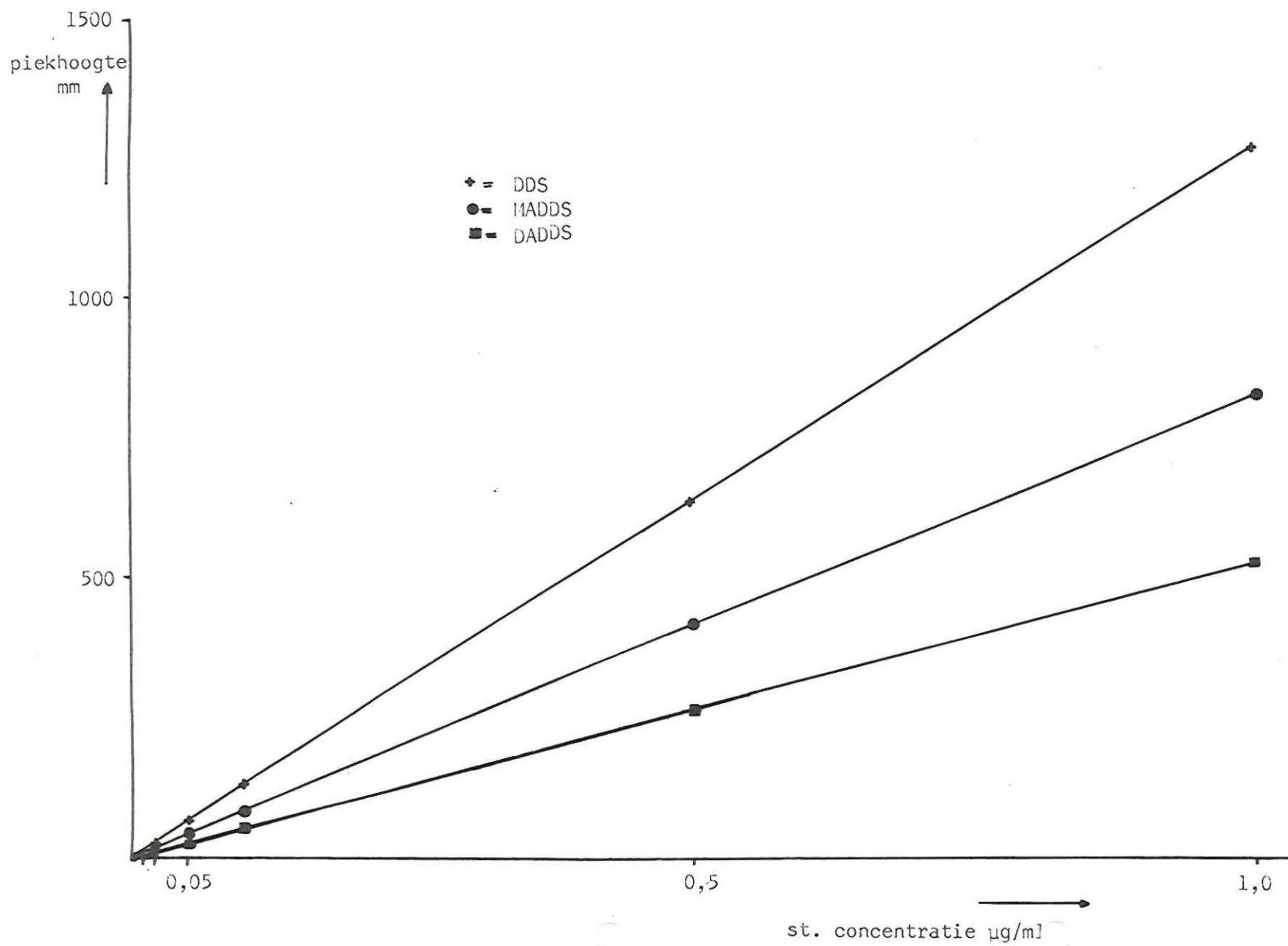
Literatuur

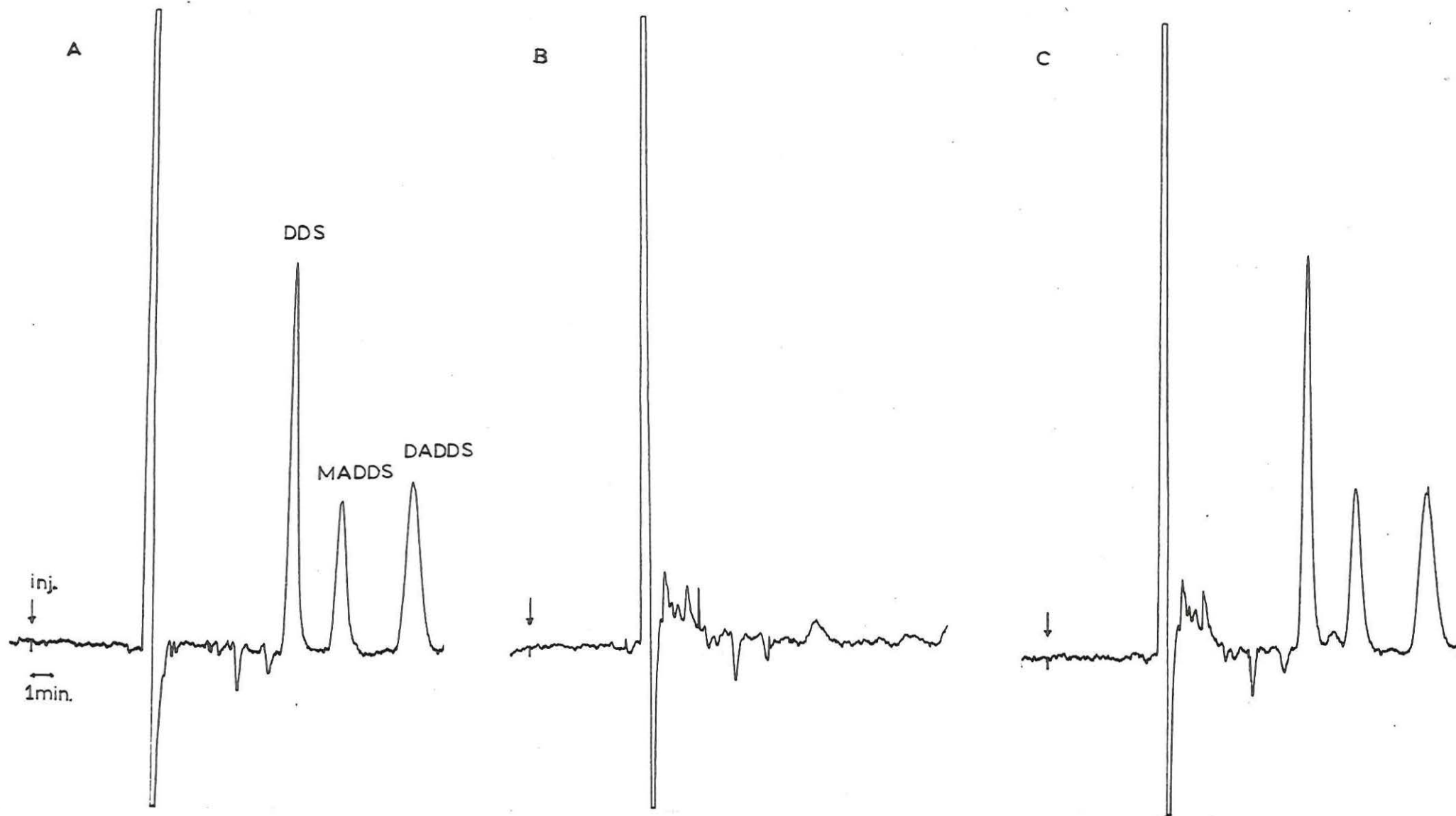
1. Jones C.R., Ovenell S.M.; J. Chromatogr. 163 (1979) 179-185.
2. Zuidema, J., Modderman E.S.M., Hilbers H.W., Merkus F.W.H.M.; J. Chromatogr. 182 (1980) 130-135.
3. Apffel J.A., Alfredson T.V., Majors R.E.; J. Chromatogr. 206 (1981) 43.
4. Roth W., Beschke K., Jauch R., Zimmer A., Koss, F.W.; J. Chromatogr. 222 (1981) 13.
5. Voelter W., Kronbach Th., Zech K., Huber R.; J. Chromatogr. 239 (1982) 475.
6. Jong G.J. de, Zeeman J.; Chromatographia 15 (1982) 453.
7. Nussbaumer K., Niederberger W., Keller H.P.; J.H.RCC; 5 (1982) 424.
8. Werkhoven Goewie C.E., Brinkman U.A.Th., Frei R.W., de Ruiter C., de Vries J.; J. Chromatogr. 276 (1983) 349.
9. Roth W.; J. Chromatogr. 278 (1983) 347.
10. Arvidsson T., Wahlund K.G., Daoud N.; J. Chromatogr. 317 (1984) 213.
11. Ziv G., Dekker A., Hageman R.; Refuah Vet. 35 (2) (1978) 41.



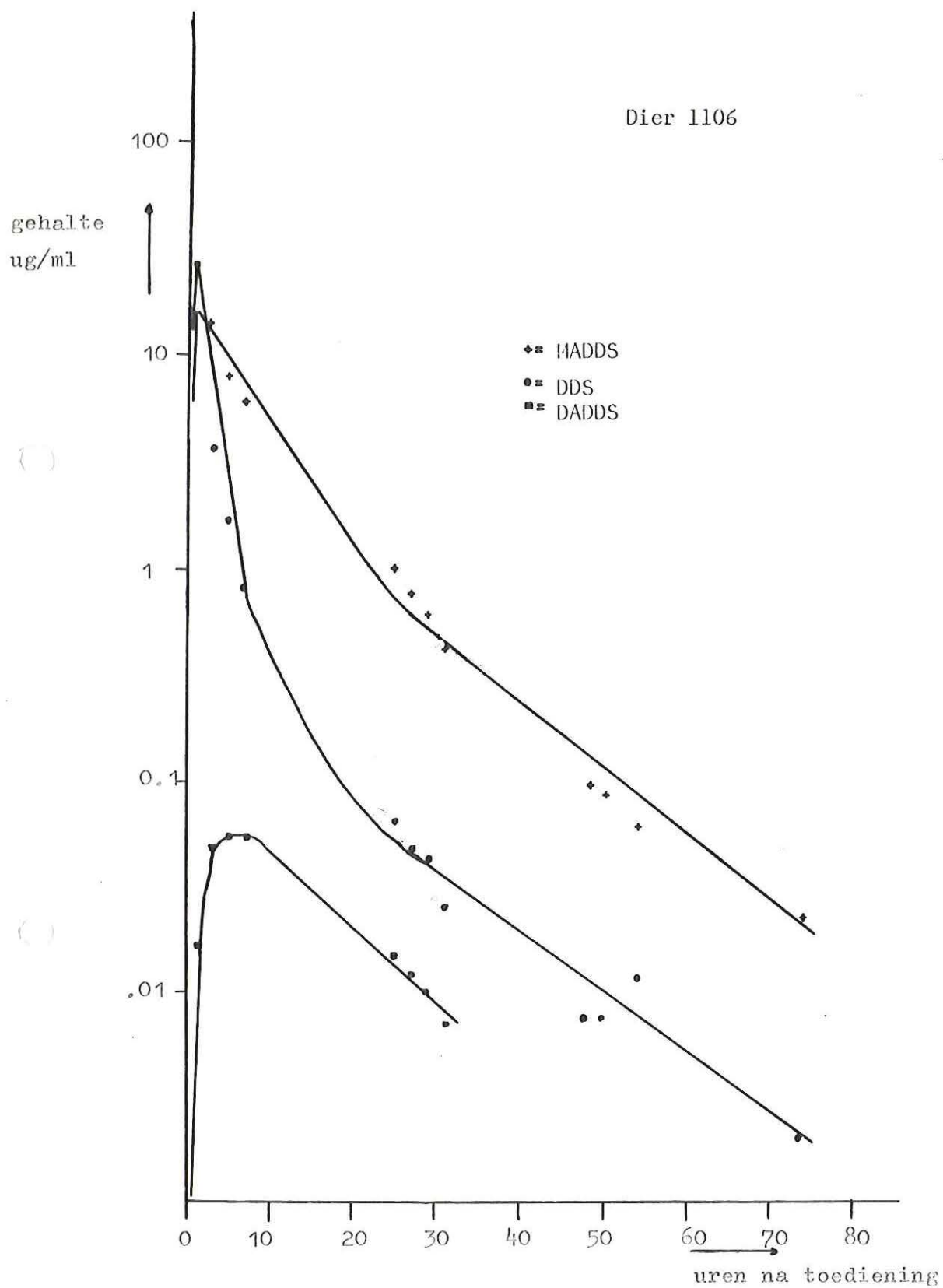
Figuur 3: Grafische weergave van de spoeltijd van de pré-concentreringskolom op de gemeten piekhoogten voor dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson.

Figuur 4: Lineariteit UV-sigitaal dapson en metabolieten met kolomschakeling.





Figuur 5: HPLC chromatogrammen voor A; standaardoplossing 0,1 $\mu\text{g/ml}$, B; blanco plasma en C; plasma + 100 ppb DDS, MADDS en DADDS. De HPLC-condities waren zoals beschreven in de tekst.



Figuur 6: Grafische weergave concentratieverloop dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloedplasma na intraveneuze toediening van dapson (15 gram).