

Afdeling Diergeneesmiddelen 1986-06-27
RAPPORT 86.67 Pr.nr. 505.0600/
404.0600

Onderwerp: Ontwikkeling van een FAST-LC
methode voor sulfaguanidine
in eieren en praktijkuitschei-
dingsproef.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling DGM (5x),
bibliotheek (1x), projectleider, projektbeheer,
circulatie, directie VD, directie VZ, COVP-Spelderholt (6x),
CL-RVV, RVV-6, Keuringsdienst van Waren Utrecht, Gezondh.
Dienst Pluimvee Doorn, secretaris ORA, vz ORA-Sulfa
werkgroep.

RAPPORT 86.67

Pr.nr. 505.0600/404.0600

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

Onderwerp: Ontwikkeling van een FAST-LC methode voor sulfaguanidine
in eieren en praktijkuitscheidingsproef.

Doel:

Het bepalen van sulfaguanidine in ei, eigeel en eiwit met behulp van FAST-LC met een detektieniveau van 10 ppb. Vergelijken van FAST-LC met de in Duitsland toegepaste multi-methode. Het in de praktijk toetsen van de methoden via een op het COVP-Spelderholt opgezet dierexperiment.

Samenvatting

Er is een FAST-LC methode voor sulfaguanidine in eieren ontwikkeld. Door toepassing van het FAST-LC systeem, kunnen monsters "on-line" zonder veel manuele handelingen automatisch worden geanalyseerd. De ontwikkelde methode is vergeleken met een arbeidsintensieve multi-methode beschreven door Malisch. De ontwikkelde methode is in de praktijk getoetst via een uitscheidingsproef waarbij sulfaguanidine op twee niveau's aan leghennen is verstrekt (COVP).

Conclusie

Sulfaguanidine is vanaf een niveau van 10 ppb goed analyseerbaar in monsters heelei en eigeel (in eiwit 20 ppb). Met de multi-methode van Malisch bleek dit niet mogelijk. Na éénmalige orale toediening zijn minimaal 10 dagen residuen van sulfaguanidine in eieren aantoonbaar.

Verantwoordelijk	: drs M.M.L. Aerts	
Medewerker(s)/Samensteller(s):	W.M.J. Beek; drs M.M.L. Aerts (RIKILT); drs C.A. Kan (COVP-Spelderholt)	
Projektleider	: drs M.M.L. Aerts	

1. Inleiding

Sulfaguanidine is een sulfonamide dat voor zover bekend niet (meer) wordt toegepast bij leghennen.

Door een Duits onderzoeksinstituut werden echter residuen ervan aangetroffen in meerdere partijen eieren, afkomstig uit Nederland. De gevonden gehalten varieerden van 40-110 ppb. Deze eieren werden onderzocht met behulp van een enigszins gemodificeerde versie van de multi-methode van Malisch (1).

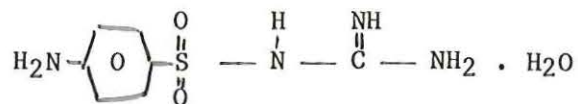
Met deze methode worden sulfonamiden en een groot aantal andere middelen geanalyseerd via een acetonitril extractie gevolgd door vloeistof-vloeistof extracties. De detectie vindt plaats via HPLC en gaschromatografie. De opgegeven recovery voor sulfaguanidine is laag (20%) en analyse is pas mogelijk vanaf een niveau van 100-500 ppb. De methode is vrij bewerkelijk (bijlage 1).

Uitgaande van het FAST-LC systeem, opgezet voor de analyse van sulfonamiden en dapson in melk/vlees en eieren is getracht ook voor sulfaguanidine automatische en specifieke analyse van residuen in ei mogelijk te maken.

In samenwerking met het COVP "Spelderholt" is een kleine farmacokinetische proef opgezet om de methode te kunnen toetsen aan praktijkmonsters. Tevens kon hierdoor een indruk worden verkregen van de uitscheiding van sulfaguanidine in eieren en het risico voor het voorkomen van residuen. Tenslotte kan aan de hand van deze praktijkmonsters een indruk verkregen worden van de storingsgevoeligheid van de analysemethoden.

2. Structuurformule en eigenschappen

Sulfaguanidine (N-p-Aminobenzeensulfanylguanidine monohydraat)



Mol. massa: 232,3

Mol. formule: C₇ H₁₀ N₄ O₂S, H₂O

Een wit kristallijn poeder. Smeltpunt $190^{\circ} - 192,5^{\circ}\text{C}$. Oplosbaar in water (1 g/1000 ml) en ethanol (1 g/250 ml). Goed oplosbaar in minerale zuren.

In water is het absorptiemaximum 259 nm. In ethanol is het absorptiemaximum 264 nm. pKa 11-12.

3. Uitvoering van de experimenten

3.1 Opzet van FAST-LC methode

Zie ook schema (bijlage 1 en 2).

3.1.1 Monstervoorbereiding

Heelei of dooier wordt gemengd (eventueel met behulp van een ultra-Turrax). Hierna wordt aan 10 g eistruif 10 ml fysiologische zoutoplossing en 3 ml natriumazideoplossing (100 g/liter) toegevoegd. Dit mengsel wordt in het FAST-LC systeem gebracht.

(Eiwit dient te worden verdund met 20 ml fysiologische zoutoplossing).

3.1.2 Concentrering en scheiding

Analyse vindt plaats door 10 minuten te bemonsteren. Het monstermateriaal wordt over twee (in serie gekoppelde) dialysers van 24 inch gevoerd.

Concentrering van de stoffen, die zich in de onderstroom bevinden, vindt plaats op een XAD-4 (50-100 nm) (60 * 4,6 mm) concentreringskolom. Tussen de 30e-35e minuut vindt backflush van de componenten plaats op de analyse kolom. Met het HPLC eluens, water-acetonitril-ijsazijn (970-20-10) vindt bij een elutiesnelheid van 1,0 ml/min scheiding plaats op een μ Bondapak C₁₈ (300 * 3,9 mm) kolom.

Na scheiding worden de componenten gederivatiseerd met DMAB (dimethylaminobenzaldehyde).

3.1.3 Derivatisering

Via een T-stuk wordt het derivatiseringsreagens (1,5% DMAB in 17% o-fosforzuuroplossing) met een snelheid van 0,5 ml/min toegevoegd. Reactie vindt plaats in een teflon coil (7,5 m x 0,5 mm ID) bij kamertemperatuur.

Detectie van de component vindt plaats bij 450 nm.

Alle handelingen geschieden volledig automatisch en computer gestuurd.

3.2 Opzet methode Malisch

Zie ook schema bijlage 1.

Het monstermateriaal wordt geëxtraheerd met acetonitril. Hierna wordt het extrakt gezuiverd door uitschudden met hexaan. Verdere opzuivering vindt plaats door extractie in dichloormethaan. Na droogdampen wordt het restant opgenomen in een water/methanol mengsel en verder gezuiverd met hexaan. Vanuit de waterige fase worden de te analyseren componenten teruggeëxtraheerd in ethylacetaat. Deze ethylacetaatfase wordt drooggedampt en het restant wordt opgenomen in water-methanol-acetonitril mengsel.

Hierna vindt analyse plaats met gradiënt of isocratische hogedruk-vloeistofchromatografie onder dezelfde omstandigheden als bij FAST-LC.

3.3 Opzet farmacokinetische proef

Om de uitscheiding van sulfaguanidine in eieren te volgen en om de analysemethode te toetsen werd aan leghennen sulfaguanidine verstrekt. Op het COVP "Het Spelderholt" kregen leghennen via een capsule een eenmalige dosis van 90 resp. 180 mg/dier sulfaguanidine (drie dieren per dosis).

De eieren werden 10 dagen verzameld en van 2 dieren per doseringsgroep werd per dag een mengmonster heelei gemaakt.

Van één leghen welke 90 mg sulfaquanidine kreeg werd voor analyse dooier en eiwit gescheiden. Het 180 mg/kg dier produceerde helaas alleen niet analyseerbare windeieren.

4. Bespreking

4.1 FAST-LC

4.1.1 Scheiding en concentrering

De isocratische reversed phase HPLC analyse van sulfaguanidine bleek moeilijk.

Zelfs met zeer polaire elutiemiddelen was er nauwelijks retentie op een Cp Spher. C₈ en Cp Spher. C₁₈ kolom. Met een μ Bondapak C₁₈ kolom, waarvan de C₁₈-belading en end-capping goed is, kon wel retentie worden verkregen.

Met het eluens water-acetonitril-ijsazijn (970-20-10) werd een k' van 1,3 verkregen.

Sulfaguanidine, welke zich na dialyse in de onderstroom bevindt in het FAST-LC systeem, bleek niet te concentreren op C₁₈ materiaal. Zelfs met water vond directe doorslag plaats. XAD-4 materiaal (polystyreen materiaal) bleek succesvol om, bij concentreren in het FAST-LC systeem, sulfaguanidine voldoende lang te kunnen vasthouden. Ook andere matrixcomponenten worden dan vastgehouden. Door toepassing van post-column derivatisering wordt het storend effect van deze componenten op de sulfaguanidine detectie voorkomen. Het resultaat is een zeer schoon chromatogram met één matrix-pek, goed gescheiden van sulfaguanidine (zie bijlage 10).

4.1.2 Lineariteit en detectiegrens

De bepaling was lineair in het gebied van 10-1000 ppb (correlatie coëf: 0.99996).

Dit geldt voor zowel heelei, eigeel en eiwit. Eiwit diende echter wel extra te worden verdund omdat anders in het continuous flow gedeelte verstoppingen optraden (sterke emulsievorming bij oproeren vóór de analyse).

De detectiegrens bedroeg 10 ppb voor heelei en eigeel. Voor eiwit was dit 20 ppb.

De recovery vergeleken met standaarden was $87 \pm 5\%$. De dupliciteerbaarheid was goed ($n=6$, c.v.=4,7%, 100 µg/kg).

4.2 Methode Malisch

Met de methode van Malisch werden handelsmonsters en monsters van de kinetische proef onderzocht.

Deze multimethode berust op zuivering van de extrakten met behulp van vloeistof-vloeistof extracties waarna gradiënt analyse op een hypersil 50 DS (250 * 4.6 mm) kolom volgt. In opgewerkte blanco en gespike eimonsters bleken vooral bij gradiënt, maar ook, bij isocratische analyse zeer veel stoorpieken voor te komen (bijlagen 4, 5 en 13. Hierdoor was de aanwezigheid van sulfaguanidine vrijwel niet aan te tonen.

Ook bij hoge concentraties sulfaguanidine in eimonsters uit de kinetische proef kan bij opwerking volgens Malisch en isocratische analyse op een μ Bondapak C₁₈ kolom geen betrouwbare analyse worden verkregen. In bijlage 5 is een monster met 3 ppm sulfaguanidine te zien. Duidelijk is dat ook bij hoge niveau's storing van matrixcomponenten optreedt. In alle zes handelsmonsters welke met de methode Malisch als positief werden bevonden kon met behulp van de FAST-LC methode geen sulfaguanidine worden aangetoond. De recovery van de Malisch-methode bedroeg 5%. Gezien de hoeveelheid stoorpieken in het chromatogram is het risico van vals positieve uitslagen met de methode van Malisch bij gehalten <500-1000 μ g/kg zeer reëel.

Toepassing van Diode Array ter identificatie van de positieve piek zou het vóórkomen van vals positieven sterk moeten kunnen reduceren. Het UV-spectrum van in blanco ei aanwezige stoorpieken moet dan echter wel verschillen van het sulfaguanidine spectrum.

In de bijlage 3 t/m 5 is het chromatogram en het bijbehorende UV-spectrum weergegeven van de piek met vrijwel de retentietijd van sulfaguanidine in zowel blanco ei als in een monster waarin met behulp van FAST-LC 3019 μ g/kg aangetroffen werd. Hierbij werd het isocratische HPLC systeem toegepast, waarmee een optimale resolutie van de polaire componenten wordt bereikt.

Hieruit blijkt dat zowel in een blanco als in een positief monster, op nagenoeg dezelfde retentietijd als sulfaguanidine, componenten werden aangetroffen met een UV-absorptiespectrum dat bijna overeenkomt met de sulfaguanidine. Het feit dat enerzijds de spectra van matrixcomponent en sulfa sterk op elkaar lijken en anderzijds bij de normale Malisch analyse niet isocratisch maar met een gradiënt gewerkt wordt, maakt het vóórkomen van vals positieve uitslagen met deze multimethode reëel. Bij de toegepaste gradient is de polariteit van het eluens te laag voor optimale resolutie van de vroeg eluerende componenten. Pas bij isocratische analyse, specifiek gericht op sulfaguanidine, en bij een relatief hoog sulfa niveau is onderscheiding van matrix en sulfa m.b.v. Diode-Array mogelijk. Dan dienen wel de volledige spectra vergeleken te worden en niet de (in Duitsland gebruikelijke?) vergelijking van top en buigpunten. Positieve identificatie is alleen mogelijk bij doseringen op hoog niveau (> 1-2 ppm).

4.3 Uitscheidingsprofielen

Van de leghennen werden na eenmalige dosering de eieren verzameld en geanalyseerd. In een aantal gevallen werd per dag per twee kippen maar één ei of zelfs geen ei gelegd.

Dit maakt de uitscheiding wat minder vloeiend.

Zoals in de uitscheidingscurven te zien is (bijlagen 9a en 9b) is op de eerste dag na dosering de hoogste concentratie aantoonbaar. Dan is de concentratie in het (vers aangemaakte) eiwit bepalend voor de overall concentratie. Daarna wordt de concentratie in het eiwit snel lager. Dit wordt veroorzaakt door de snelle afname van de plasmaconcentratie waardoor het vers aangemaakte eiwit geen sulfaguanidine meer aangeboden krijgt. Alle sulfaguanidine is dan opgeslagen in het ei-eel in de zich vormende oöcyten. De hoeveelheid hangt daarbij af van het ontwikkelingsstadium van de oöcyt (ref. 2) en dit verklaart de langzame afname van de sulfaguanidine concentratie vanaf dag 2 tot dag 8. Terugdiffusie van de sulfa naar plasma lijkt niet of nauwelijks plaats te vinden.

Ondanks de lage lipofiliteit van sulfaguanidine blijken toch gedurende langere tijd (8 dagen) residuen in het ei voor te komen ($> 100 \mu\text{g/kg}$). Uit de summiere literatuurgegevens lijkt sulfaguanidine een niet-resorbeerbare stof te zijn maar kennelijk treedt toch een redelijke resorptie op. Vooropgesteld moet worden dat bij deze analyses alleen gekeken is naar de moederverbinding.

Het is echter mogelijk dat ook metabolieten aanwezig zijn die niet gedetecteerd worden. Ook bestaat de kans dat metabolieten met de intacte p-amino functie (welke dus met DMAB reageren) meegemeten worden wanneer ze chromatografisch hetzelfde gedrag vertonen. Vergelijking van de twee doseringen (90 en 180 mg/kg) toont een vrijwel evenredige verhoging van de ei-residuconcentraties tussen 1 en 8 dagen. Na 8 dagen is in beide gevallen het gehalte gedaald tot beneden $100 \mu\text{g/kg}$. Een minimale wachttermijn van 8 dagen lijkt dan ook nodig bij oraal gebruik van sulfaguanidine.

5. Conclusies

5.1 Met behulp van FAST-LC is sulfaguanidine vanaf een niveau van 10 µg/kg goed te bepalen in heelei en dooier. In eiwit vanaf een niveau van 20 µg/kg.

5.2 Vergelijking van de in de BRD gebruikte multi-methode van Malisch met de FAST-LC methode geeft aan dat de Malisch methode niet in staat lijkt gehalten van sulfaguanidine op niveau's beneden 500 µg/kg betrouwbaar aan te tonen. Gebruik van Diode Array UV/Vis detectie kan bij deze methode alleen hoge gehalten sulfaguanidine (> 1-2 ppm) bevestigen.

5.3 Na eenmalige orale dosering van sulfaguanidine (90 en 180 mg/kip) zijn gedurende 8 dagen residuen > 100 µg/kg in ei aantoonbaar.

Literatuur

1. R. Malish.

Z. Lebensm. Unters. Forsch (1986) 182 : 385-399.

2. Geertsma M.F.; Nouws J.F.M.; Grondel J.K.; Aerts M.M.L.;
Vree T.B.; Kan C.A.

Residues of sulfadimidine and its metabolites in the hen's egg
following oral sulfadimidine medication.

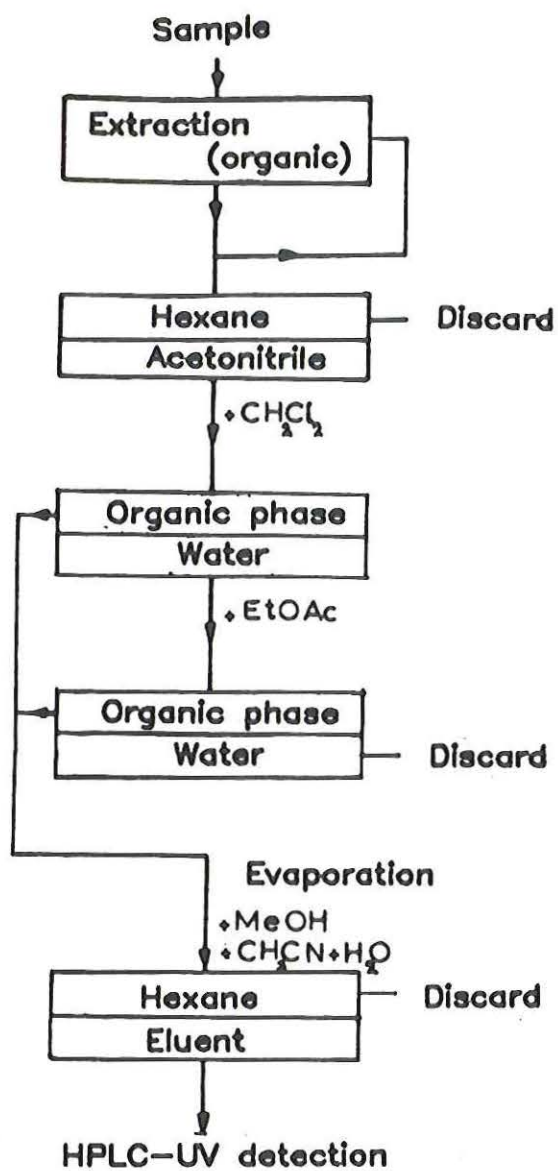
Veterinary Quaterly (in press).

Bijlagen

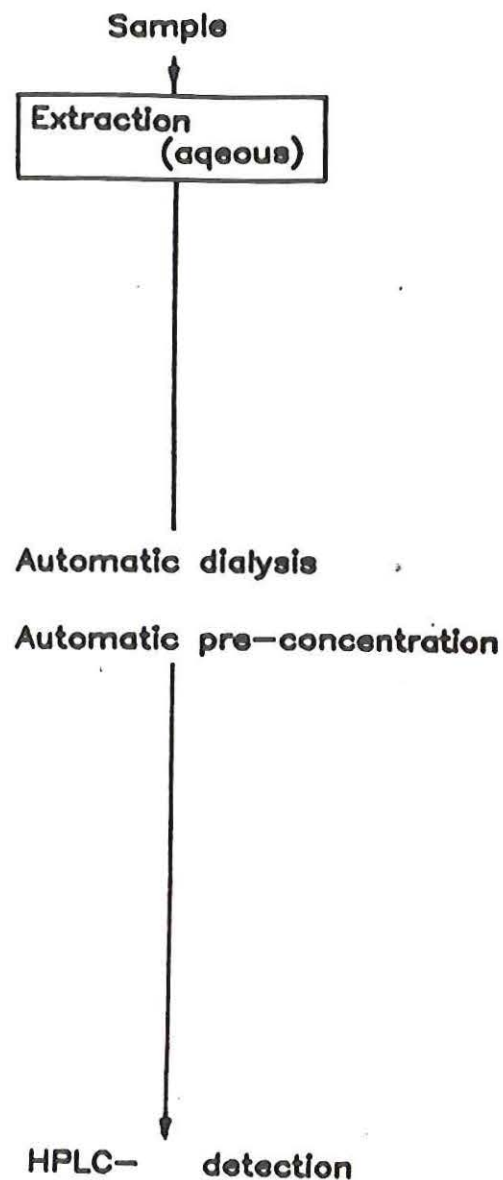
1. Schema procedure Malish - FAST-LC
2. FAST-LC schema
3. Chromatogram/spectrum sulfaguanidine standaardstof
4. Chromatogram/spectra blanco ei
5. Chromatogram/spectra ei + 3019 ppb sulfaguanidine
6. Resultaat dosering 90 mg/dier
7. Resultaat dosering 180 mg/dier
8. Resultaat dosering 90 mg/dier: eiwit - eigeel
9. Grafiek uitscheidingsprofielen
 - curve **b**. Concentratie sulfaguanidine in heel ei na eenmalige orale dosering aan 2 leghennen (180 mg/capsule en 90 mg/capsule).
 - curve **a**. Concentratie sulfaguanidine in eiwit/eigeel na eenmalige orale dosering van 90 mg sulfaguanidine (capsule)

: heel ei; 2 dieren
eigeel ; 1 dier
eiwit ; 1 dier
10. FAST-LC chromatogram (blanco ei)
11. FAST-LC chromatogram (ei + 11 ppb)
12. FAST-LC chromatogram (ei + 110 ppb)
13. Chromatogram gradiënt analyse Malish.

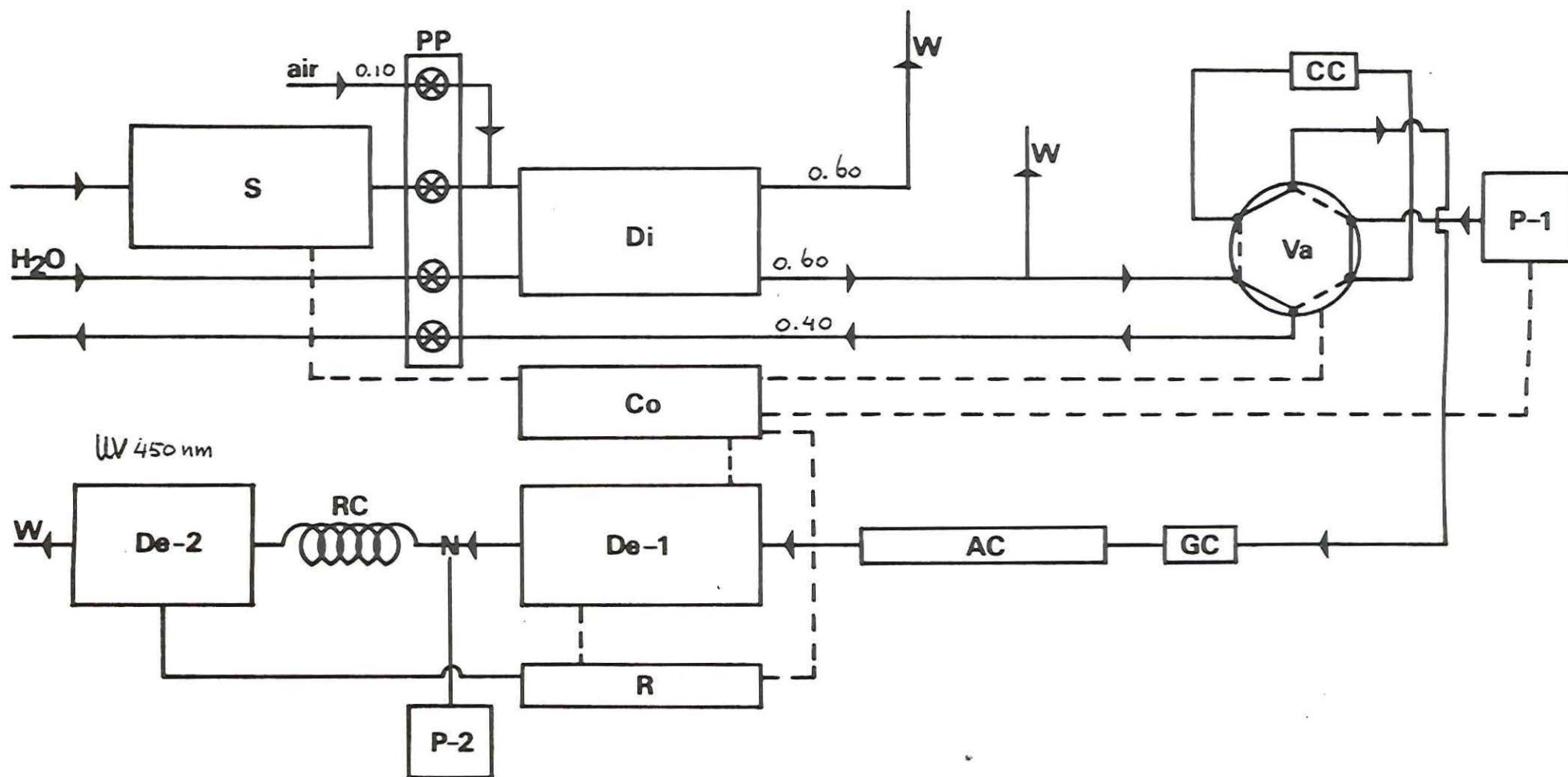
Malish procedure



FAST-LC procedure



Fully Automated Sample Treatment – Liquid Chromatography



S sampler
 Di dialyser
 Va six-port valve
 CC concentration column
 P HPLC-pump

GC guard column
 PP peristaltic pump
 AC analytical column
 De detector
 R recorder

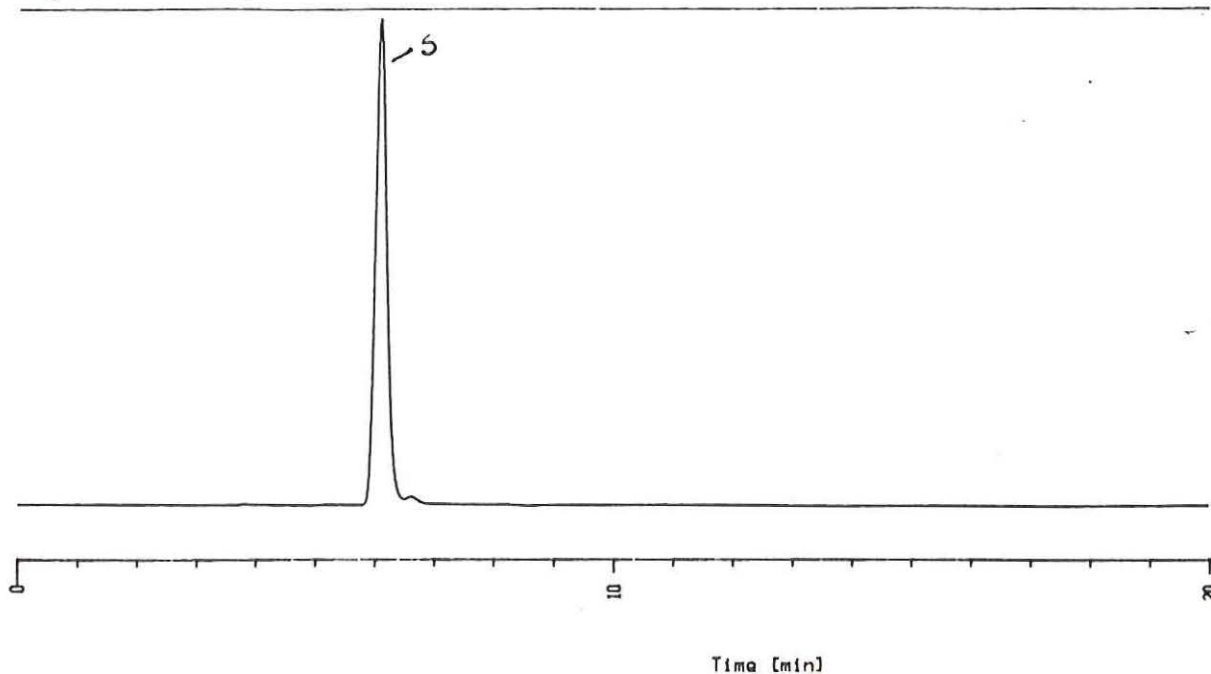
Co controller
 W waste
 RC reaction coil

Sulfaguanidine - standaard.

File: da1011
Date: 07/16/1986
Inj. Time: 09:31
Attn (mAU): 250.0 (219.9)
Zero%: 10
Signal: A: 2,1

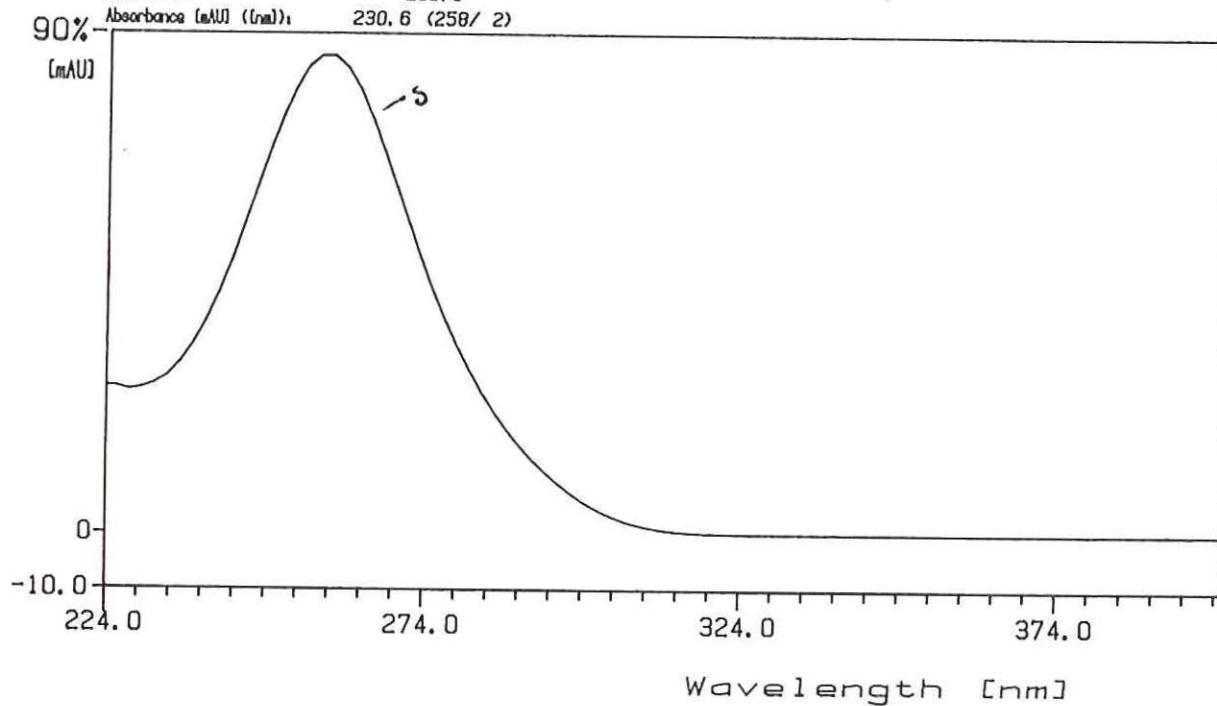
Wavelength (nm)
1. 550, 10
2. 254, 4
3. 260, 4
4. 313, 4
5. 305, 4
6. 360, 4
7. 330, 4
8. 230, 4

hp 1040A

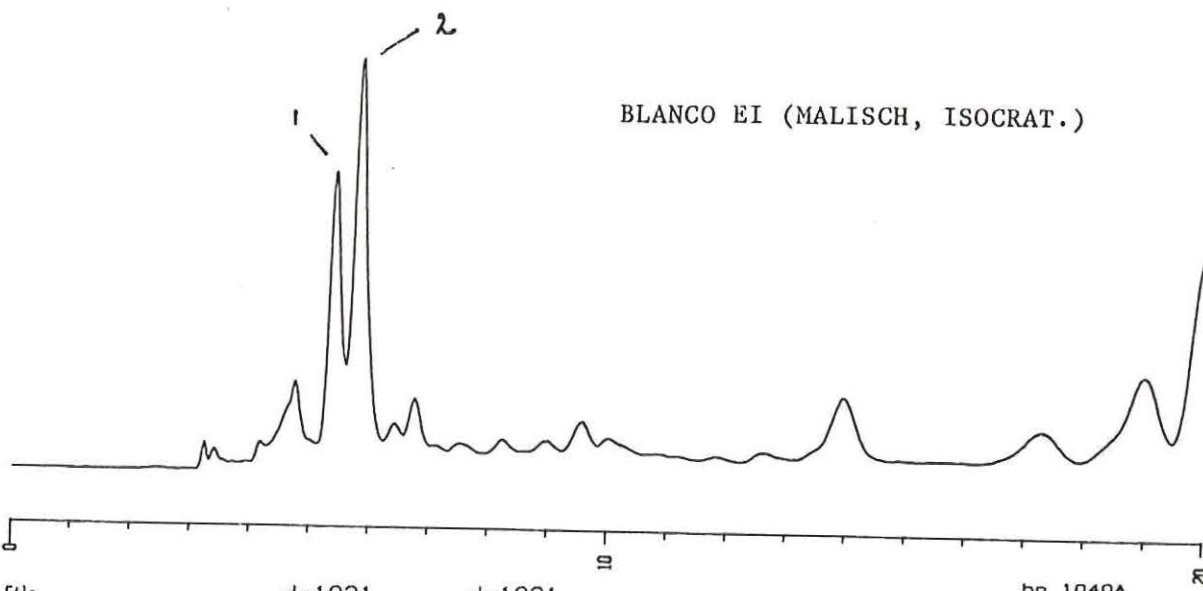


File: da1011
Date: 07/16/1986
Spectrum (min): 6.0707
Reference (min): 6.4883
Attn (mAU): 269.0
Absorbance (mAU) (nm): 230.6 (258/ 2)

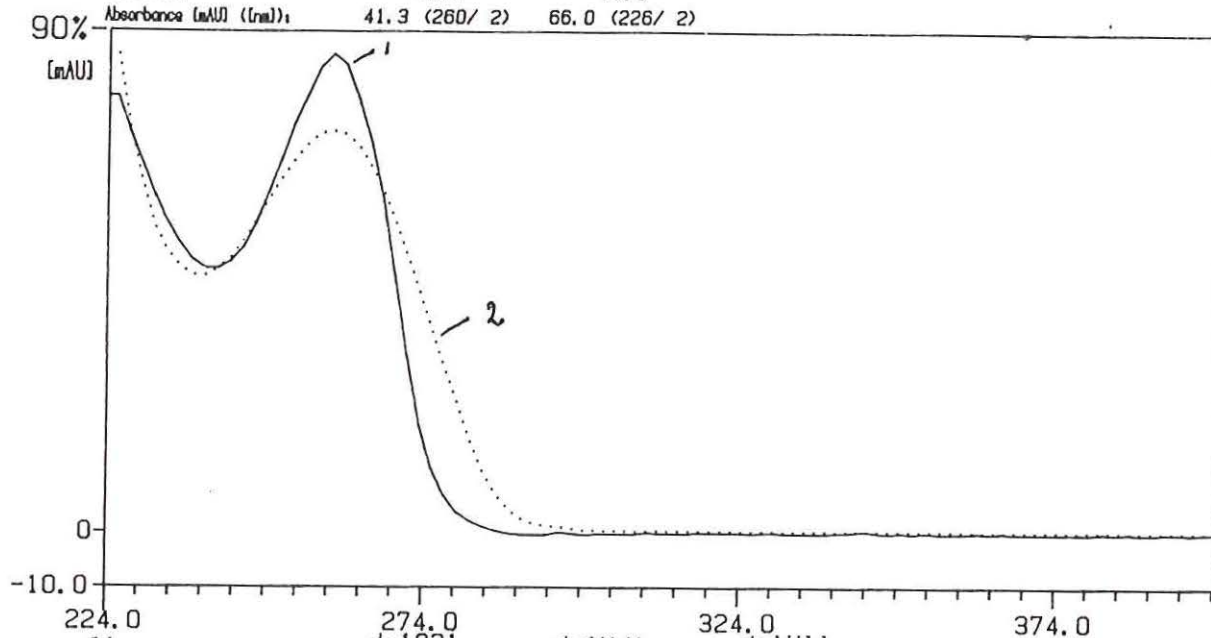
hp 1040A



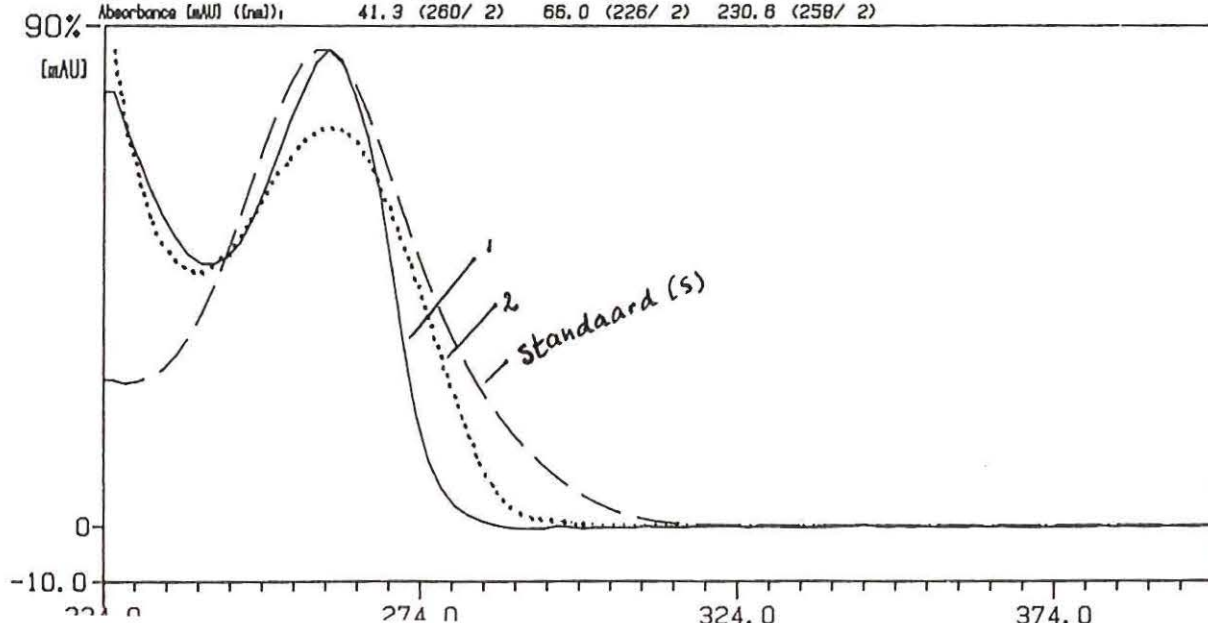
Attn (mAU): 75.0 (56.4)
 Zero%: 10
 Signal: A: 2, 1



File:	da1021	da1021
Date:	07/16/1986	07/16/1986
Spectrum (min):	5.3913	5.7860
Reference (min):	5.1203	6.2297
Attn (mAU):	48.1	77.0
Absorbance (mAU) (nm):	41.3 (260/ 2)	66.0 (226/ 2)

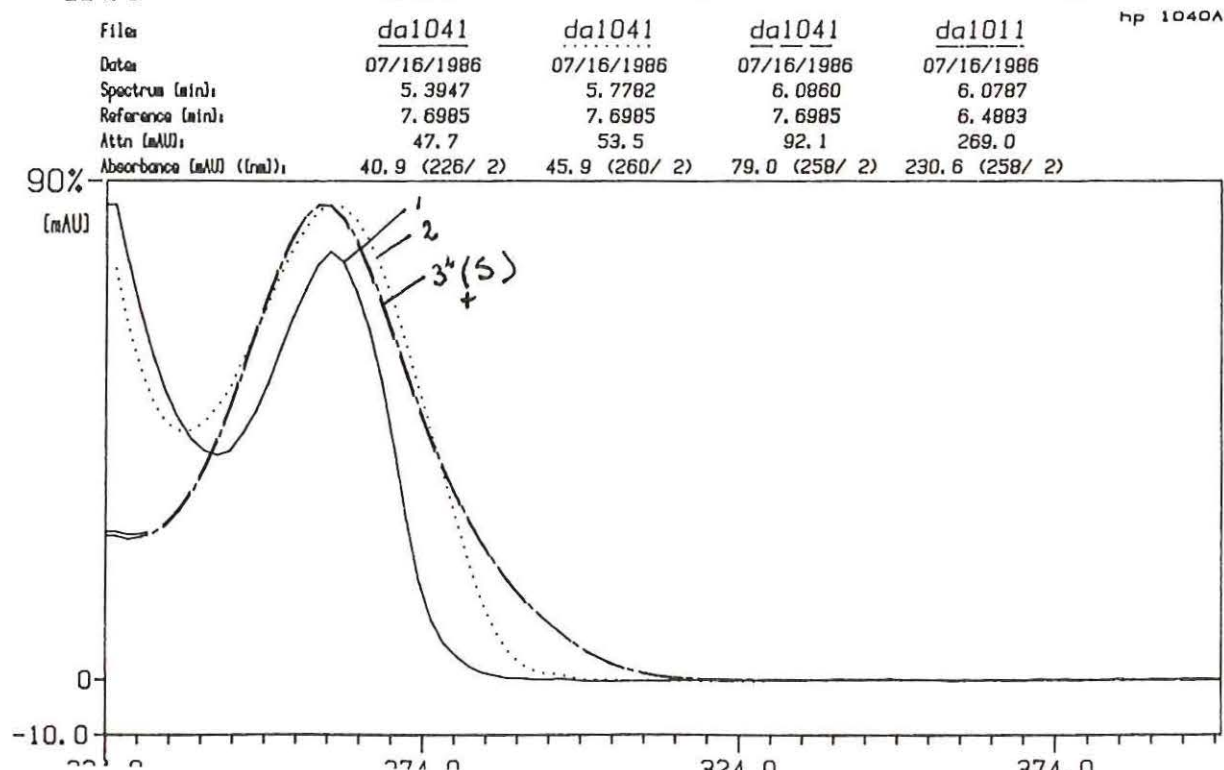
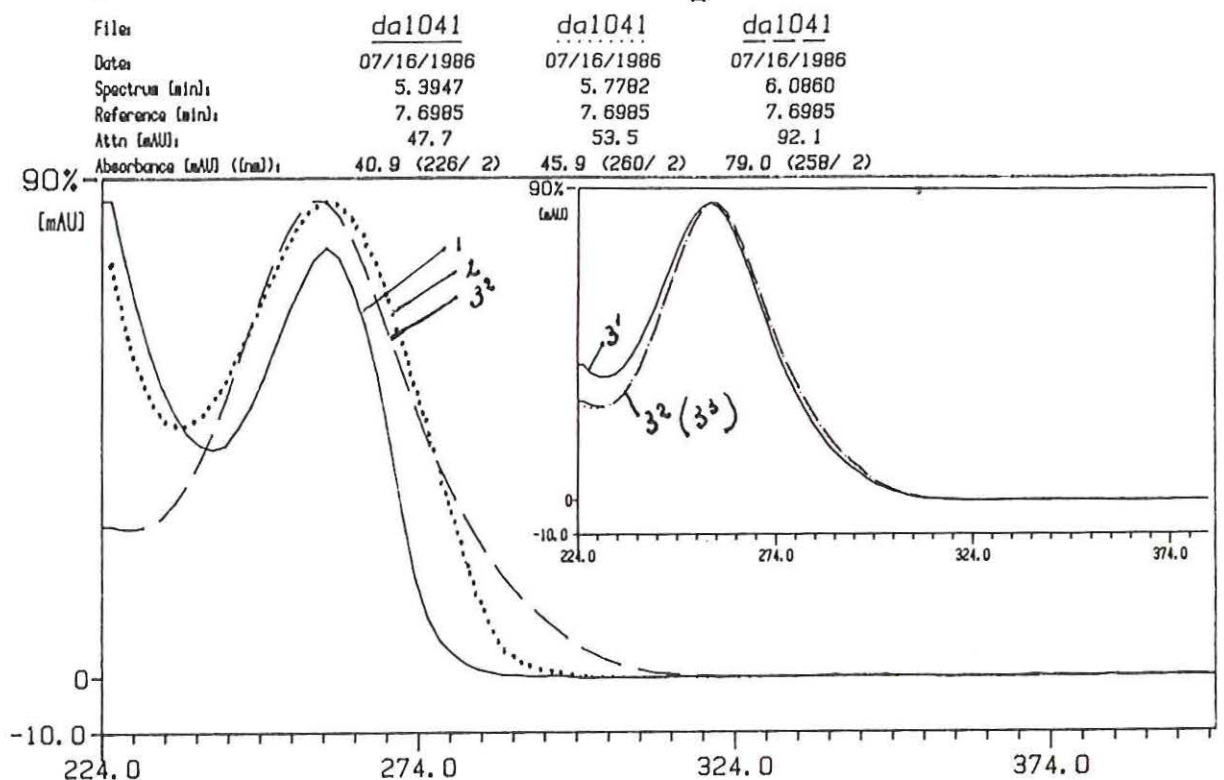
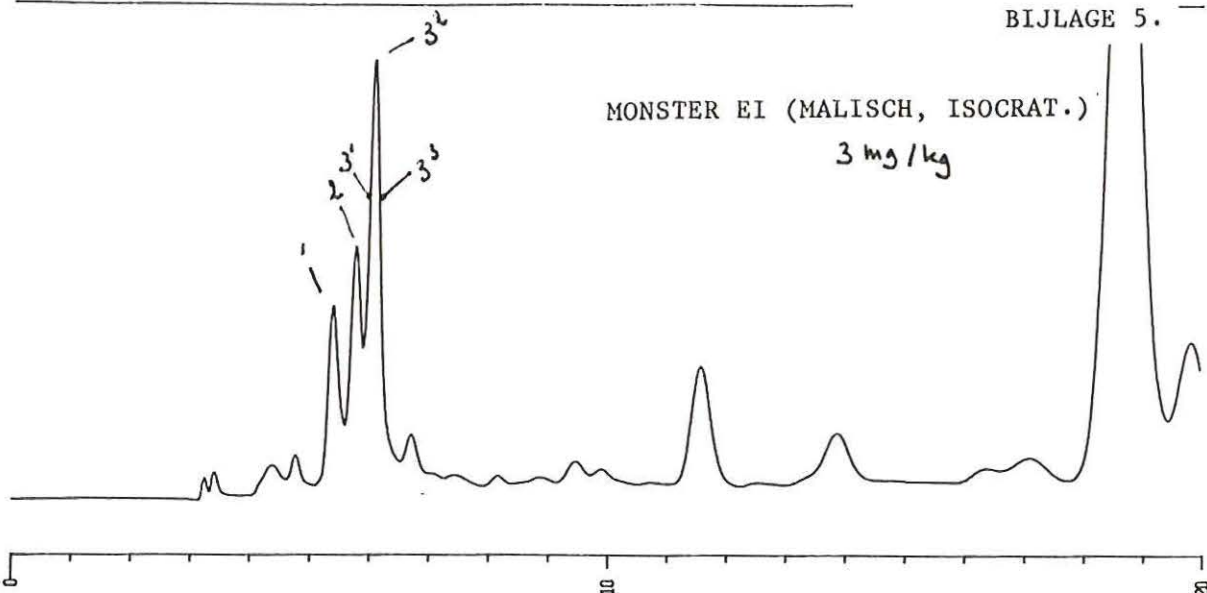


File:	da1021	da1021	da1011
Date:	07/16/1986	07/16/1986	07/16/1986
Spectrum (min):	5.3913	5.7860	6.0787
Reference (min):	5.1203	6.2297	6.4883
Attn (mAU):	48.1	77.0	269.0
Absorbance (mAU) (nm):	41.3 (260/ 2)	66.0 (226/ 2)	230.8 (258/ 2)



Attn (mAU): 100.0 (143.5)
 ZeroX: 10
 Signal: A: 2, 1

BIJLAGE 5.



Ei

Dosering: 90 mg/dier

Aantal dieren: 2

Dag	Aantal eieren	Concentratie (ppb)
0	2	-
1	1	1785
2	x	-
3	3	650
4	1	573
5	2	518
6	1	440
7	2	230
8	2	136
9	1	40
10	1	11
11	2	-

x geen ei

Ei

Dosering: 180 mg/dier

Aantal dieren: 2

Dag	Aantal eieren	Concentratie (ppb)
0	2	-
1	2	3019
2	2	2093
3	1	970
4	2	1013
5	2	904
6	2	785
7	x	-
8	1	252
9	1	19
10	2	15
11	2	-

x geen ei

Eigeel/eiwit

Dosering: 90 mg/dier

Aantal dieren: 1

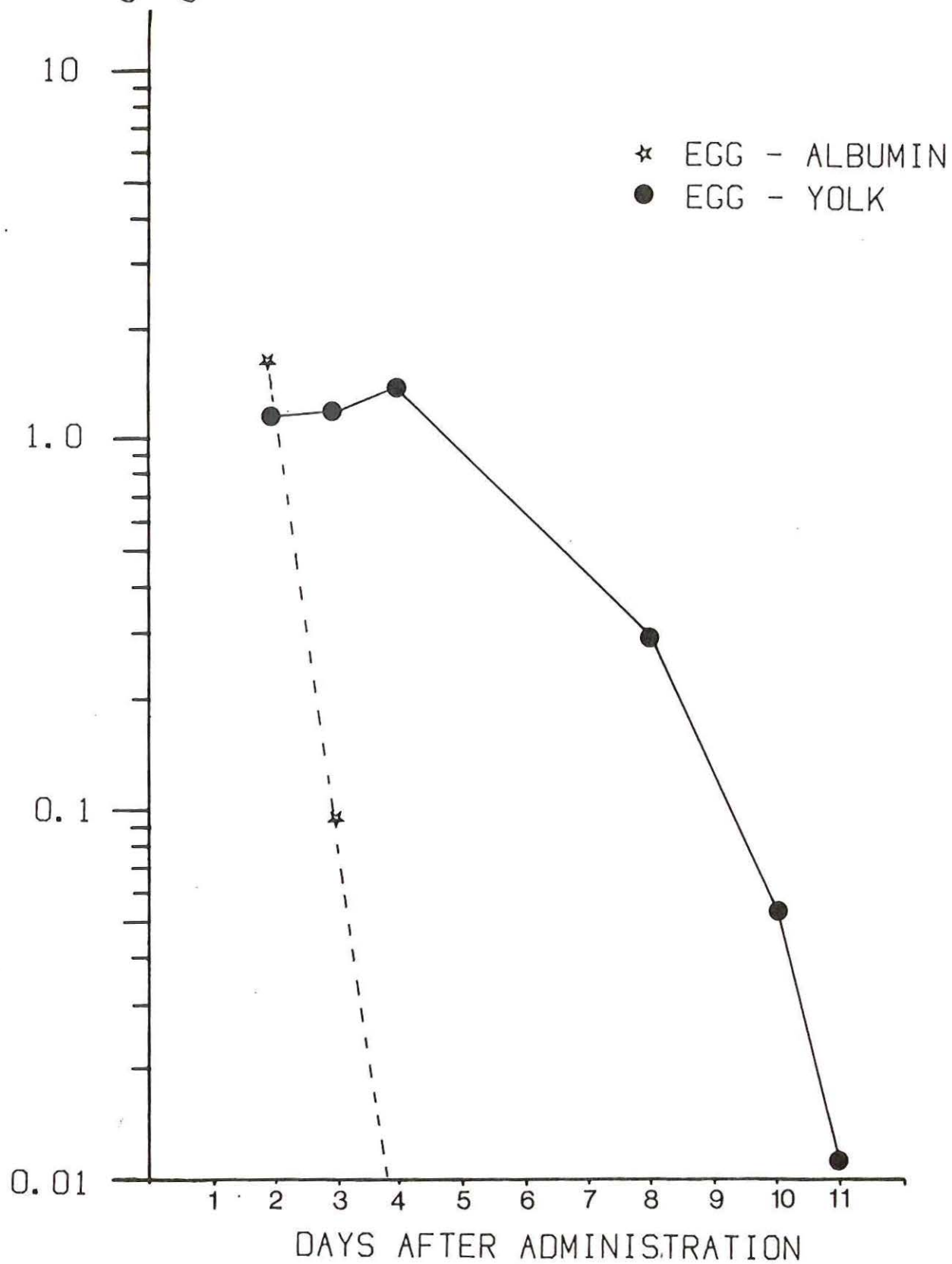
Dag	Aantal eieren	Concentratie (ppb) eigeel/eiwit
0	1	- -
1	x	
2	1	1146/1580
3	1	1192/ 92
4	1	1421/ -
5	x	
6	x	
7	x	
8	1	273/ -
9	x	
10	1	50/ -
11	1	11/ -

x geen ei

CONCENTRATION

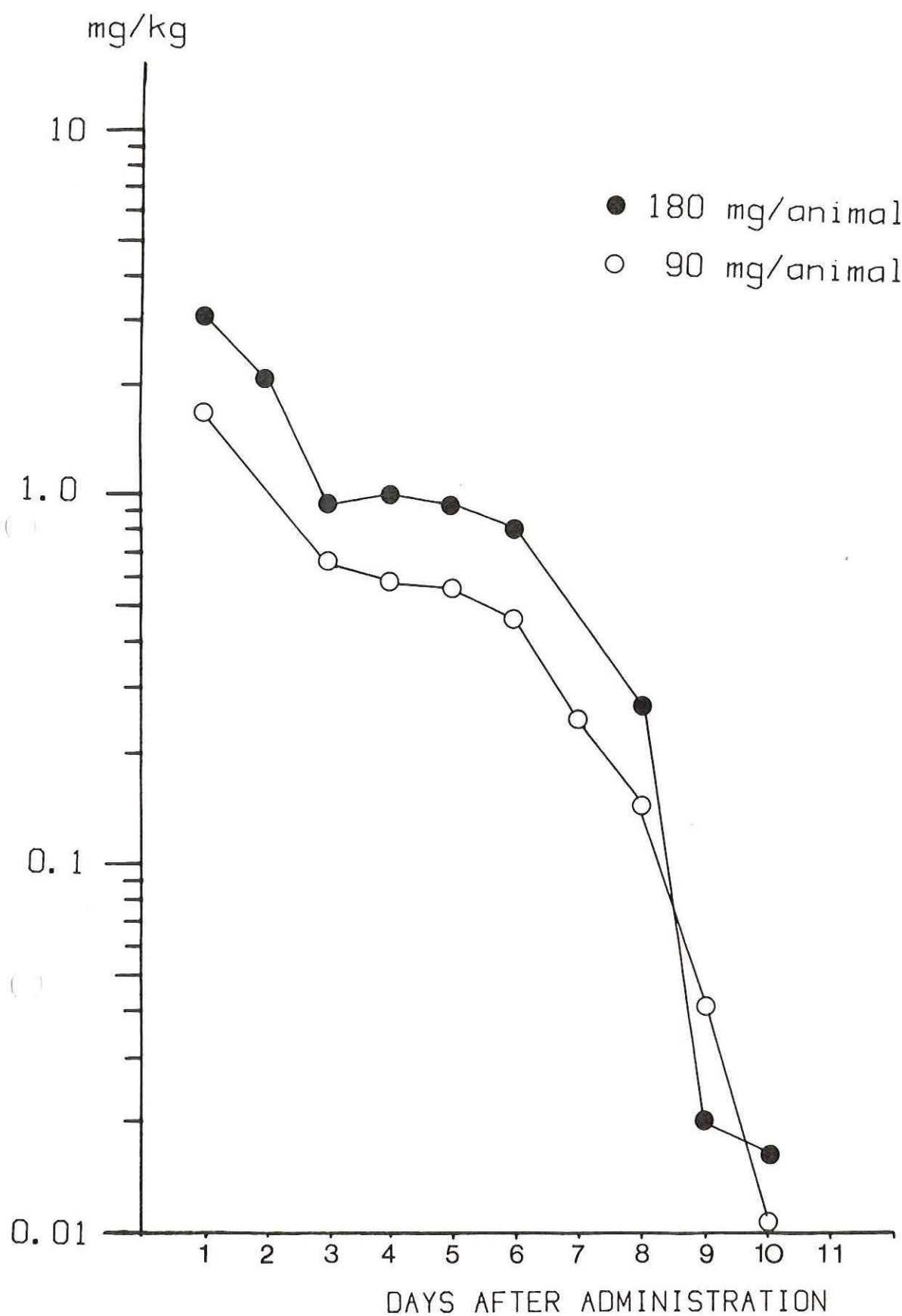
9a

mg/kg

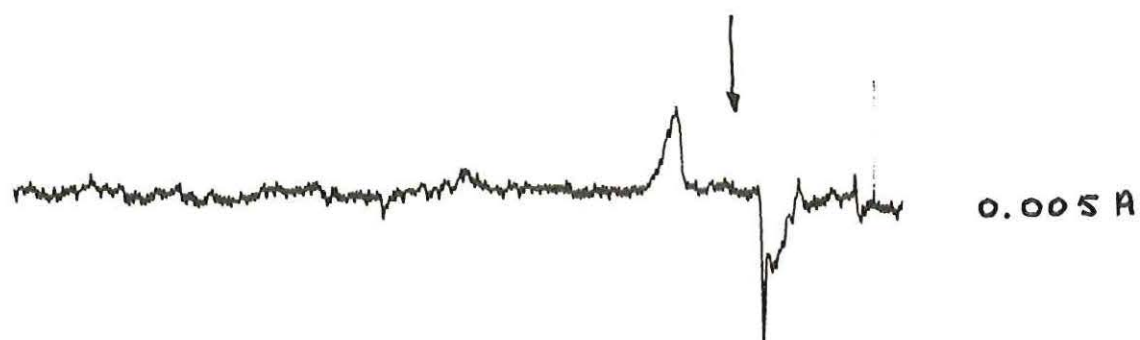


EGG CONCENTRATION

9b



FAST-LC

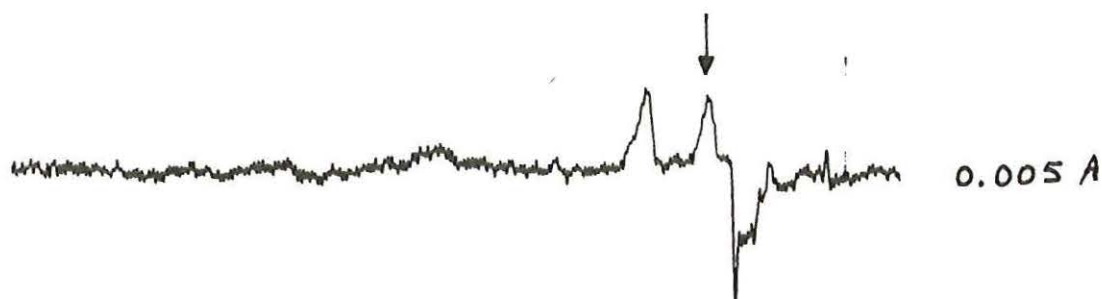


BLANCO EI

FAST-LC



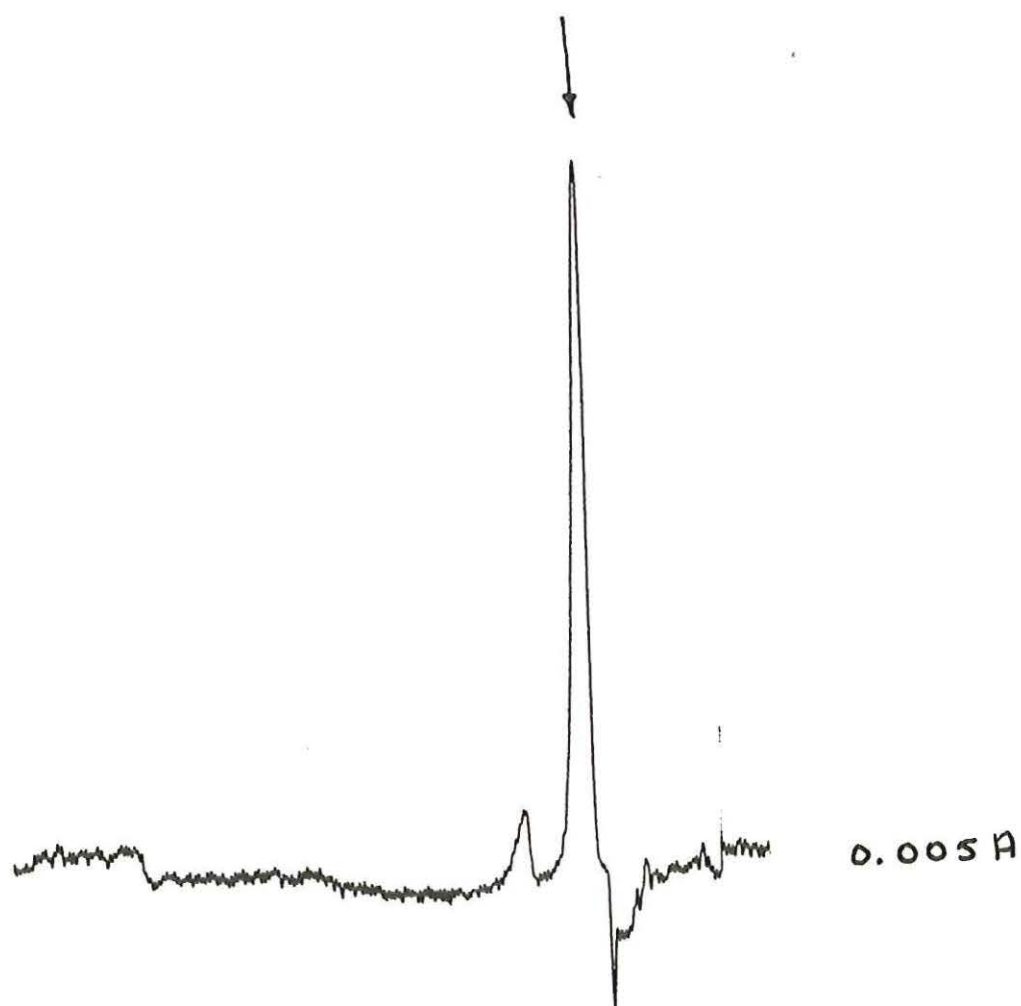
0.05 A



0.005 A

BLANCO EI + 11 PPB SULFAGUANIDINE

FAST-LC



BLANCO EI + 110 PPB SULFAGUANIDINE

hp 1040A

Wavelength [nm]
1 . 210. 4
2 . 360. 4
3 . 254. 4
4 . 275. 4
5 . 290. 4
6 . 310. 4
7 . 330. 4
8 . 550.100

File: RAW001
Date: 05/30/1986
Inj. Time: 11:00
Attn [mAU]: 10.0 (139.0)
Zero%: 10
Signal: B: 4,8

