Project 505.0640

Ontwikkeling methoden voor de bepaling van tranquillizers in organen en (slacht)vee (drs J.M.P. den Hartog)

Rapport 88.02 Januari 1988

DE BEPALING VAN TRANQUILLIZERS EN DE β-BLOCKER CARAZOLOL IN VARKENSNIER

H.J. Keukens

Afdeling: Diergeneesmiddelen

Goedgekeurd door: drs M.M.L. Aerts

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 17717

8802

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

afdelingshoofden

afdeling DGM (4x)

projectleider

circulatie

afdeling BFA

afdeling TOX

afdeling OCON

EXTERN:

directie VKA

directie VZ

directie VD

projectleider IKB-slachtvarkens

dr Stephany (RIVM)

directie VHI

directie RVV

prof. Ruiter (VVDO-RU Utrecht)

directie DLO

directeur PR-Lelystad

directeur PV-Rosmalen

CAD Varkenshouderij-Rosmalen

CIVO-TNO

CLRVV, dhr Frijns

ILOB

INHOUD blz

SAMENVATTING II

1 INLEIDING 1

2 METHODE EN MATERIALEN 2
2.1 Materiaal 2
2.2 Werkwijze 4
2.3 HPLC-condities 5

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE 5
3.1 HPLC-scheiding 5
3.2 Detectie 11
3.3 Extractie-voorzuivering 13
3.4 Terugvindingspercentages en variatiecoëfficiënt 16
3.5 Bepaalbaarheidsgrens 18
3.6 Praktijkresultaten 18
3.7 Confirmatie 20
3.8 Storingsanalyse en toepasbaarheid 20

4 CONCLUSIES 21

LITERATUUR 22

BIJLAGEN
A INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT A 486
B STRUCTUURFORMULES
C STORINGSANALYSECOMPONENTEN

SAMENVATTING

Er is een multimethode ontwikkeld voor de bepaling van de "β-blocker" carazolol en de tranquillizers xylazine, azaperon, acepromazine, haloperidol, propionylpromazine en chloorpromazine in varkensnier. De methode is gebaseerd op een eenvoudige voorzuivering met Seppak C-18 kolommetjes en "reversed phase" hogedrukvloeistofchromatografie met fluorescentie- en UV-detectie. De bepaalbaarheidsgrens voor carazolol is 0,3 µg/kg en voor de overige componenten ligt deze tussen 1 en 10 µg/kg. Het terugvindingspercentage is voor alle componenten groter dan 90%. Alleen xylazine geeft een lager resultaat van ca. 50%. Met uitzondering van haloperidol en chloorpromazine zijn de componenten toegediend aan volwassen slachtvarkens. Met de beschreven methode bleken 5 uur na toediening van een normale dosering nog residuen van de moederverbindingen in de nieren aantoonbaar.

De methode is zeer goed routinematig toepasbaar en is uitgetest tijdens de analyse van meer dan 1000 niermonsters. Per dag kunnen 24 monsters geanalyseerd worden.

1 INLEIDING

In de veterinaire praktijk worden "β-receptorblockers" en tranquillizers niet alleen klinisch therapeutisch toegepast, maar ook als voorzorg bij stieren en varkens om transportschade tegen te gaan. Deze schade, veroorzaakt door stress, bestaat uit kwalitatief slecht vlees en sterfte. De bekendste en mogelijk meest toegepaste middelen zijn:

carazolol	- Suacron^R
xylazine	- Rompun^R
azaperon	- Stresnil^R
acepromazine	- Acetazine^R
propionylpromazine	- Combolene^R
chloorpromazine	- Largactil^R

De structuurformules van deze verbindingen zijn gegeven in bijlage B. Wettelijke maatregelen die de toepassing van deze preparaten reguleren zijn in Nederland niet van kracht.

In Duitsland geldt bij toepassing van carazolol een wachttermijn van drie dagen (Rudolph, 1987). Over de omvang van het gebruik van deze middelen is officieel weinig bekend. In 1980 werd door Olling et al (Olling, 1980) bij een beperkt onderzoek in meer dan 90% van de onderzochte varkensniermonsters propionylpromazine aangetoond. Vanuit Duitsland komen gegevens dat een hoog percentage van de slachtvarkens positief blijkt bij de controle op carazolol (Rudolph, 1987 a).

Om meer inzicht in de Nederlandse situatie te krijgen zijn in het kader van twee projecten (VKA-keuringsprogramma en IKB-project slachtvarkens) in totaal 1500 monsters varkensnier genomen voor onderzoek op tranquillizers en β-blockers.

Er is gekozen voor niermonsters, omdat uit de literatuur bekend is dat de nier een geschikt "target"-orgaan is (Rauws 1978, Olling 1981, Rudolph 1987) voor het aantonen van β-blockers en tranquillizers.

In de literatuur is, voor zover ons bekend, geen methode beschreven waarmee alle componenten in één analysegang kwantitatief te bepalen zijn. Wel zijn methoden beschreven voor de bepaling van één of een aantal van deze componenten in varkensnier. Dit zijn de fluorimetrische analyse van carazolol (Engelsma, 1985), DLC-analyse van azaperon en propionylpromazine (Rauws 1976, Olling 1982), GC-analyse van acepromazine, propionylpromazine, chloorpromazine en xylazine

(Laitem 1978) en azaperon (Olling 1982), HPLC-analyse van carazolol (Rudolph 1987) en de analyse met RIA van carazolol (Rattenberger 1985). Een HPLC-methode voor alle componenten met uitzondering van carazolol (Etter, 1984) welke beschreven is gaf lage terugvindingspercentages (< 60%) en een hoge variatiecoëfficiënt (22 tot 56% bij toevoeging van 25 µg/kg).
Een DLC-methode van Haagsma et al. (1988) voor alle genoemde componenten bleek lage terugvindingspercentages voor de promazines te geven, te hoge bepaalheidsgrenzen en een matige reproduceerbaarheid.
In dit rapport wordt de ontwikkeling beschreven van een methode waarmee in varkensnier alle genoemde componenten te bepalen zijn inclusief azaperol, een metaboliet van azaperon, en haloperidol, een neurolepticum dat met name humaan toegepast wordt. De methode is gebaseerd op HPLC met simultane UV- en fluorescentie-detectie. De methode is tot stand gekomen na overleg met VVDO-Utrecht en het RIVM. Daarnaast worden de resultaten beschreven van toedieningsexperimenten bij varkens met deze componenten met uitzondering van chloorpromazine en haloperidol.

2 MATERIAAL EN METHODE

2.1 Materiaal

Chemicaliën

- Acetonitril b.v. Merck art. 3
- Acetonitril UVASOL b.v. Merck art. 16
- Natriumchloride b.v. Merck art. 6404
- Hexaan b.v. Merck art. 714
- Zwavelzuur gec. b.v. Merck art. 714
- IJsazijn b.v. Merck art. 63
- Natriumacetaat b.v. Merck art. 6268
- Natriumchlorideoplossing 10%
  Weeg 100 g natriumchloride af in een kolf van 1 l, los op in water, vul aan tot de streep en meng.

- Zwavelzuuroplossing 0,02 N
  Breng bij ca. 500 ml water 28 ml geconcentreerd zwavelzuur, meng en vul aan tot 1 liter en meng nogmaals. Breng van deze oplossing 20 ml in een 1 l maatkolf, vul aan met water en meng.
- Zure acetonitril
  Voeg aan 100 ml acetonitril 1 ml zwavelzuur 0,1 N toe en meng.
- HPLC-eluens
  Weeg 2,46 g natriumacetaat af. Voeg 450 ml water en 550 ml acetonitril toe en meng. Breng de pH op 6,4 met ijsazijn 50%.
- Standaardstoffen
  Acepromazine, azaperon, chloorpromazine, propionylpromazine en xylazine (Technische Universiteit, Berlijn)
  Azaperol, carazolol en haloperidol (RIVM, Bilthoven)
- Stamoplossing tranquillizers (100 µg/ml)
  Weeg 10 mg standaardstof af in een maatkolf van 100 ml. Los op in methanol, vul hiermee aan en meng. Deze oplossingen zijn stabiel wanneer deze bewaard worden bij 4°C onder uitsluiting van daglicht.
- Standaardoplossing
  Pipetteer van de stamoplossing van carazolol 0,1 ml van de stamoplossing, van xylazine 2 ml en van elk van de andere stamoplossingen, met uitzondering van die van azaperol, 1 ml in een maatkolf van 100 ml, vul aan met water en meng (oplossing I, 1 µg/ml). Pipetteer in een maatkolf van 100 ml 10 ml van oplossing I en 2 ml zwavelzuur 1 N, vul aan met water en meng. Deze oplossing bevat 0,1 µg/ml van elk der componenten maar voor carazolol 0,01 µg/ml en voor xylazine 0,2 µg/ml.
  De oplossing is ca. 1 week houdbaar bij uitsluiting van daglicht.

Overige benodigdheden

- Vleesmolen
- Centrifugebuizen polypropyleen met dop (80 ml)
- Seppak C-18 Waters art. 51910
- Gecalibreerde puntbuizen 10 ml b.v. Haak
- Centrifuge b.v. MSE-Coolspin
- Mengapparaat b.v. IKA vibrofix
- Indampapparatuur

HPLC-systeem

HPLC-pomp b.v. Waters M-6000.
HPLC-injectieautomaat b.v. Waters WISP 710 B. UV-detector met een meetbereik tot 0,001 Aufs b.v. Kratos 783. Fluorescentiedetector b.v. HP-1046 A.

2.2 Werkwijze

2.2.1 Monstervoorbereiding

Maal de gehele nier na verwijdering van overmatig vet tot een homogene massa in de keukenmachine. Van het homogene monster wordt 5 g afgewogen in een kunststof centrifugebuis.

2.2.2 Extractie

Pipetteer onder voortdurend mengen met de vibrofix (ca. 750 rpm) 20 ml acetonitril in de centrifugebuis met daarin het monster. Sluit de buis af en meng 45 sec. bij 1500 rpm. Plaats de buizen 2 min. in een ultrasoonbad en centrifugeer 5 min. bij 4000 rpm.

2.2.3 Voorzuivering

Activeer een Seppak C-18 met achtereenvolgens 5 ml methanol en 5 ml water.
Sluit de Seppak aan op een wegwerpspuit van 50 ml. Breng in de spuit 40 ml natriumchlorideoplossing 10% en 7,5 ml van het monsterextract (2.2.2). Meng en pers het geheel geleidelijk door de cartridge. Spoel vervolgens de cartridge met 1 ml zwavelzuur 0,02 N, blaas door met 2 ml lucht en elueer de componenten met 2 ml aangezuurde acetonitril. Vang het eluaat op in een gecalibreerde puntbuis welke vooraf gespoeld is met geconcentreerde ammonia, water en aceton. Damp onder verwarming (t = 70°C) in tot een volume van ca. 300 µl, meng en voeg direct 1 ml hexaan toe. Meng 30 sec. op de vibrofix (700 rpm), centrifugeer 5 min. bij 2000 rpm en injecteer van de onderstaande fase 50 µl op het HPLC-systeem.

2.3 HPLC-condities

Kolommen:
- voorkolom 3 x 10 mm (Chrompack) gepakt met Bondapak C-18 37-50 µm
- analytische kolom 3,9 x 300 mm, µ-Bondapak C-18 10 µm (Waters)

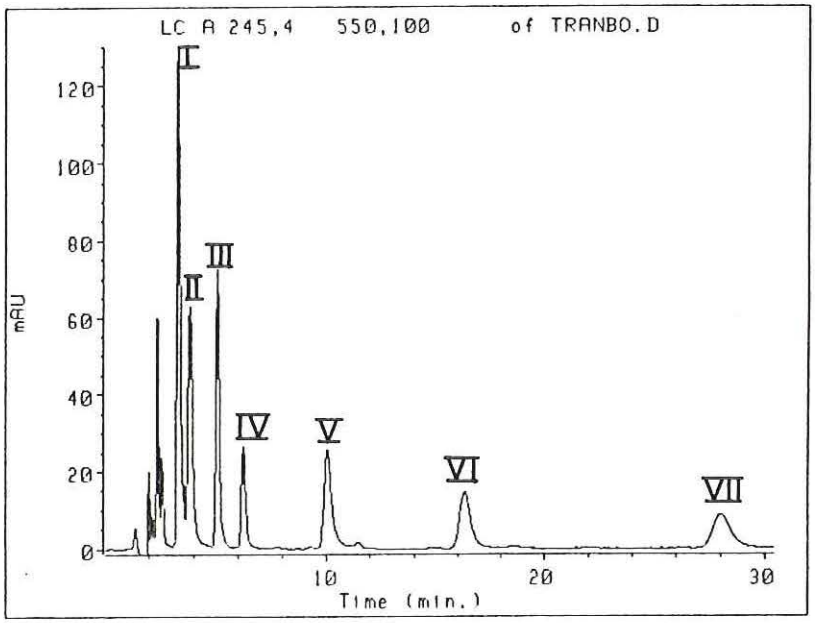
Mobiele fase:
Acetonitril-acetaatbuffer 55 : 45 v/v ; pH = 6,4.
Pompdebiet: 1,2 ml/min.
UV-detector:
Meetgolflengte = 240 nm
Gevoeligheid = 0,002 Aufs
mV_{rec} = 10

Fluorescentiedetector:
λ_{ex} = 246 nm; λ_{em} = 351 nm; PMT gain = 12; mV_{rec} = 10; slits = 4 mm

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 HPLC-scheiding
Door Etter et al. (1984) werd voor de scheiding van tranquillizers een phenyl-kolom toegepast in combinatie met een mengsel van acetonitril en een zure acetaatbuffer als eluens. Een dergelijke combinatie bleek ook in onze handen een goede scheiding te geven voor alle genoemde componenten indien een standaardmengsel werd geinjecteerd. Bij langer gebruik van het systeem (> 24 uur) bleek echter dat zowel piekhoogten als retentietijden van de verschillende componenten slecht reproduceerbaar waren. Daarnaast week het chromatografisch gedrag van de componenten bij aanwezigheid van niermatrix sterk af van het gedrag in standaardoplossingen. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door geringe variaties in de pH van het te injecteren extract.
Daarom is gekozen voor toepassing van een "reversed phase" C-18 kolom. Het retentiegedrag van de tranquillizers en "β-blockers" bleek sterk afhankelijk van de zoutconcentratie en de pH van het eluens. Bij toepassing van een zuur eluens (pH < 7) bleken alleen pakkingsmaterialen met een goede "endcap" zoals Bondapak C-18 (Waters) en Supelcosil C-8 DB (Supelco) toepasbaar.

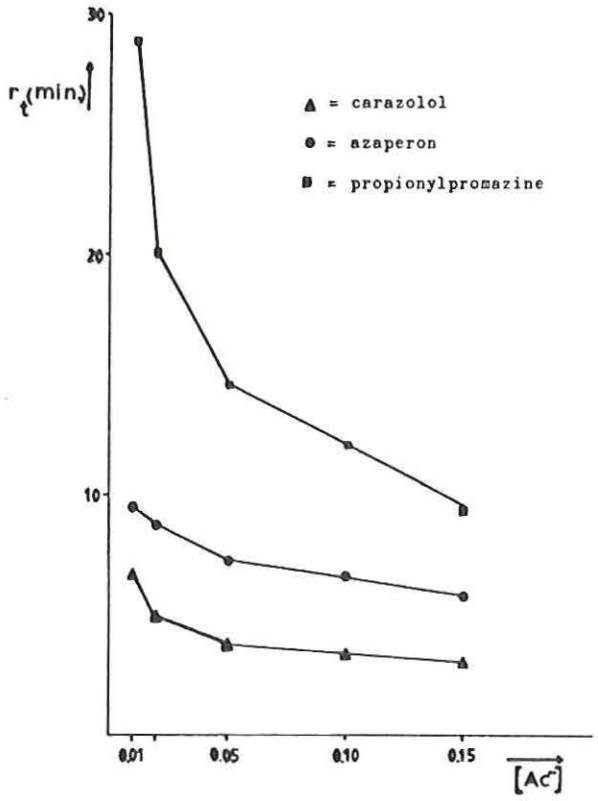
Dit geldt tevens voor het pakkingsmateriaal van de voorkolom. Andere kolommen zoals de Chromspher C-18 (Chrompack) en de Lichrosorb C18 (Merck) gaven in combinatie met een zuur eluens sterke absorptie van alle componenten met uitzondering van azaperon. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door interactie met vrije silanolgroepen. Wordt namelijk aan het eluens 0,005 m n-octylamine als tegenion toegevoegd dan geeft een dergelijke kolom wel een perfecte scheiding en piekvorm voor alle componenten.



Figuur 1: HPLC-chromatogram van een standaardmengsel geanalyseerd op een Chromspher C-18 kolom (100 x 3 mm, 5 µm) met het eluens beschreven bij 2.1 onder toevoeging van 0,005 m n-octylammine. I = carazolol; II = xylazine; III = azaperon; IV = haloperidol; V = acepromazine; VI = propionylpromazine en VII = chloorpromazine.

Een dergelijk eluens heeft echter een pH hoger dan 10. Dit is niet wenselijk voor routinematige toepassing, omdat de silanolbasis oplost. De µ-Bondapak C-18 kolom (Waters) bleek het best toepasbaar voor de analyse van de tranquillizers in combinatie met een zuur eluens.

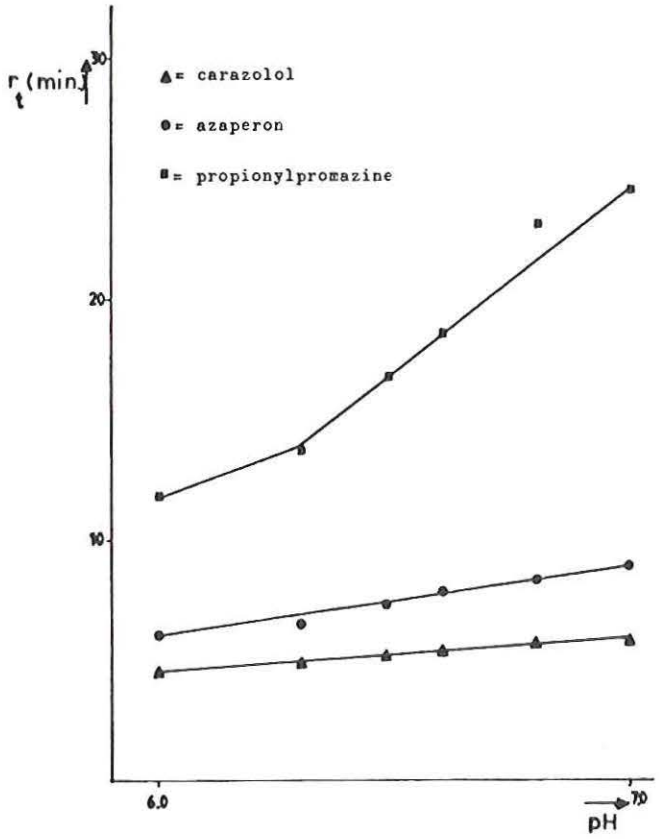
De invloed van de acetaatconcentratie in het eluens is voor een aantal componenten weergegeven in figuur 2.



Figuur 2: Grafische weergave van de relatie tussen de zoutconcentratie in het eluens en de retentietijd van carazolol, azaperon en propionylpromazine. De verhouding acetonitril-buffer was in alle gevallen 45:55 v/v en de pH werd ingesteld op 7. Het debiet bedroeg 1,5 ml/min. Kolom: µ-Bondapak C18 (300 x 3,9 mm).

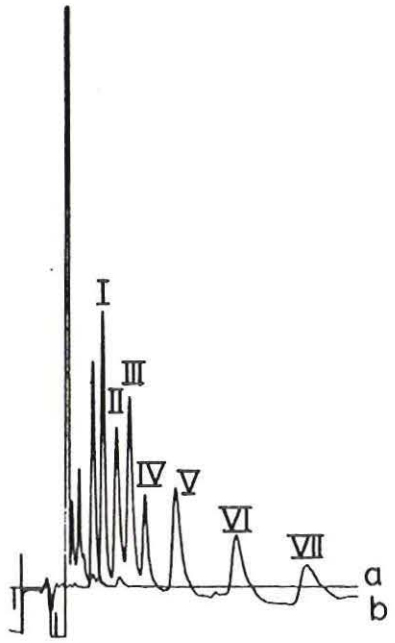
De retentietijd voor met name de laat eluerende componenten propionylpromazine en chloorpromazine blijkt sterk af te nemen bij een toenemende zoutconcentratie.

Daarnaast is gebleken dat bij nog lagere zoutconcentraties dan 0,01 mol/l sterke absorbtie aan het kolommateriaal optreedt voor de polairste componenten carazolol en xylazine. Daarom is gekozen voor een zoutconcentratie van 0,03 mol/l wat resulteert in een redelijke retentietijd voor alle componenten en een goede resolutie.
Naast de zoutconcentratie heeft ook de pH invloed op het retentiegedrag dat grafisch is weergegeven in figuur 3.



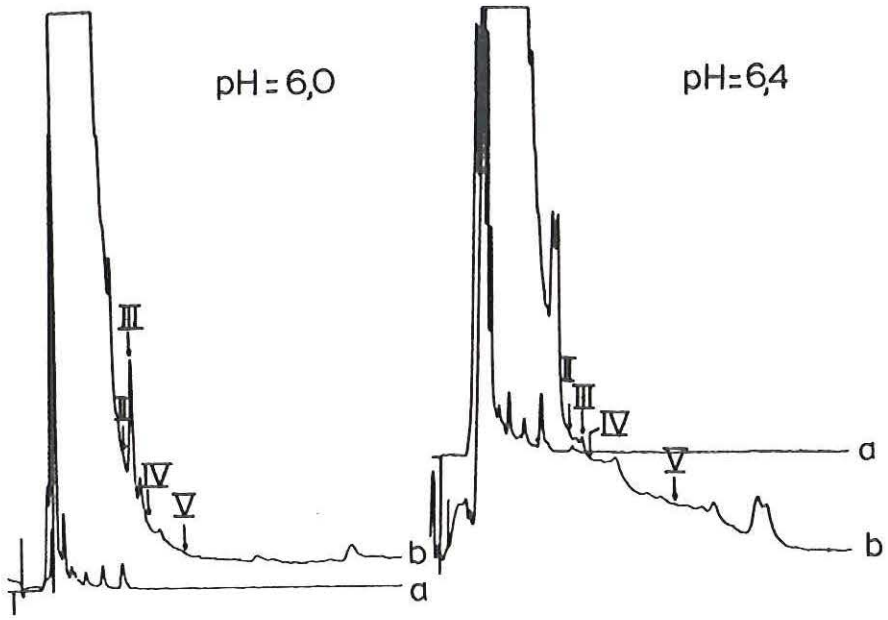
Figuur 3: Grafische weergave van de relatie tussen de pH van het eluens en de retentietijd van carazolol, azaperon en propionylpromazine. De verhouding acetonitrilbuffer was in alle gevallen 55 : 45 (v/v) en de zoutconcentratie bedroeg 0,03 mol/l. Het pompdebiet was 1,5 ml/min. Kolom: µ-Bondapak C-18 (300 x 3,9 mm).

De retentietijd van alle componenten blijkt af te nemen bij lagere pH. Voor een deel zal dit veroorzaakt worden doordat bij instelling van een lagere pH met ijsazijn de acetaatconcentratie toeneemt (zie figuur 2).
Het leek aannemelijk te kiezen voor een lage pH waardoor een snelle elutie wordt verkregen. Een voorbeeld van een analyse van een standaardmengsel bij pH=6 is gegeven in figuur 4.



Figuur 4: HPLC-chromatogram van een standaardmengsel van tranquillizers met als parameters: kolom µ-Bondapak C-18 300 x 3,9 mm 10 µm; eluens acetonitril-acetaat-buffer 55 : 45 v/v; bufferconcentratie 0,03 m; pH = 6,0; λ = 240 nm. De volgorde en de nummering van de componenten is dezelfde als die in figuur 1. a = fluorescentiesignaal, b = UV-signaal.

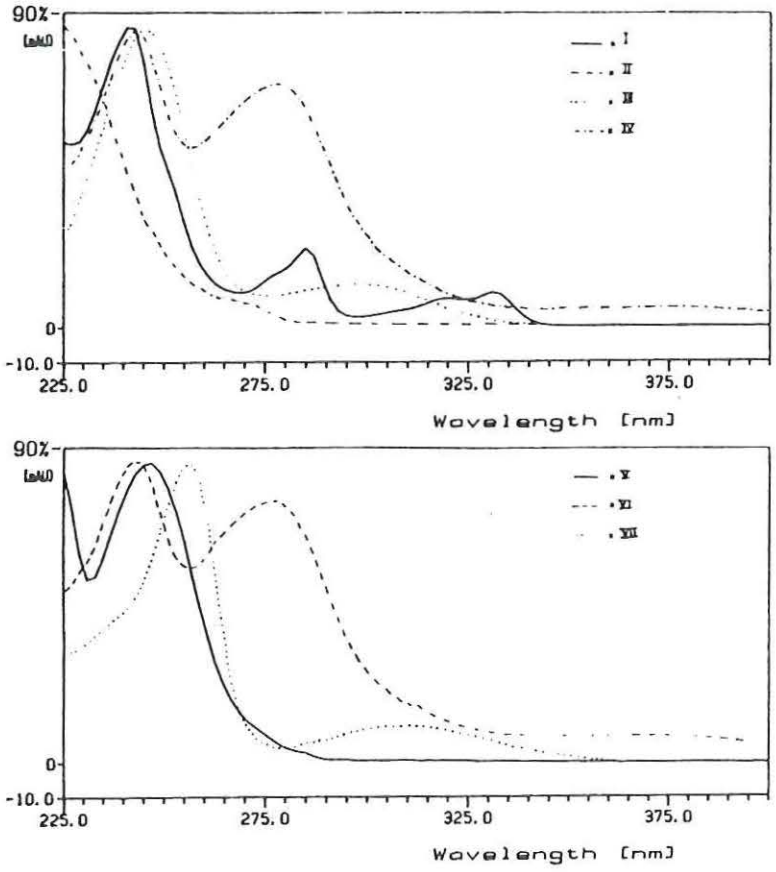
Bij analyse van blanco nierextracten is echter gebleken dat bij een pH = 6 van het eluens xylazine op de tailing van de matrix komt en dat twee interferenties optreden met globaal de retentietijd van azaperon. Wordt de pH echter ingesteld op 6,4 dan blijken de interferenties in de matrix te verdwijnen en is azaperon vrijwel storingsvrij te bepalen (zie figuur 5).



Figuur 5: HPLC-chromatogrammen van een blanco nierextract geanalyseerd met een eluens met pH = 6,0 en pH = 6,4. De overige condities waren dezelfde zoals beschreven bij figuur 4. De retentietijden van de verschillende componenten zijn met pijltjes aangegeven; II = xylazine; III = azaperon; IV = haloperidol; V = acepromazine. a = fluorescentiesignaal, b = UV-signaal.

3.2 Detectie

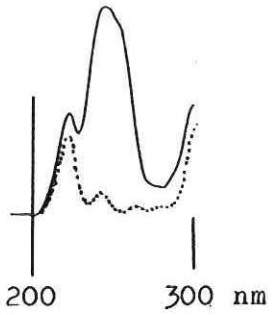
Alle genoemde tranquillizers zijn te bepalen met UV-detectie. Met een Diode Array detector (HP 1040-M) zijn "on-line" spectra opgenomen. De absorptiemaxima liggen voor alle componenten rond de 245 nm met uitzondering van het maximum voor chloorpromazine 257 nm en voor xylazine waarvan het maximum onder 225 nm ligt (zie figuur 6).



Figuur 6: UV-spectra van de β-blocker carazolol en de tranquillizers "on-line" geregistreerd met een HP-1040 M. Diode Array detector. De HPLC-condities waren dezelfde zoals beschreven in bijlage A.

Om alle componenten op redelijk niveau te kunnen meten is gekozen voor een meetgolflengte van 240 nm.
Carazolol is tevens met fluorescentiedetectie te bepalen (Engelsma 1985, Rudolph 1987).

Carazolol blijkt onder de gegeven HPLC-condities een excitatiespectrum (λ_{em} = 350 nm) te geven met een vlak optimum tussen 230 en 245 nm (zie figuur 7) en niet bij 283 nm zoals aangegeven door Rudolph et al (1987).



Figuur 7: Excitatiespectrum voor carazolol (——) en het eluens (....) "on-line" opgenomen met "stop-flow" techniek. λ_{em} = 351 nm; scansnelheid 1,5 nm/sec; papiersnelheid 1 mm/sec. De HPLC-condities waren dezelfde zoals beschreven in bijlage A.

Aanvankelijk is gemeten bij λ_{ex} = 241 nm en λ_{em} = 351 nm. Later werd gemeten bij λ_{ex} = 246 nm. Bij deze excitatiegolflengte is de gevoeligheid gelijk, maar de ruis is ca. 2 maal zo laag waardoor de absolute detectiegrens lager is. Deze bedraagt, uitgedrukt als drie maal de gemiddelde ruis ca. 3 pg.
In tegenstelling tot hetgeen wat Engelsma et al. (Engelsma 1985) rapporteren wordt onder de genoemde condities ook een fluorescentiesignaal waargenomen voor azaperon en azaperol. Dit maakt het mogelijk het snel eluerende azaperol te bepalen aan de hand van het fluorescentiesignaal dat onder de beschreven HPLC-condities bij analyse van nierextracten op de plaats van azaperol geen interferenties vertoonde. Dit in tegenstelling tot het UV-signaal. Daarnaast is de piekhoogte van het fluorescentiesignaal meer dan drie maal hoger dan het UV-signaal.

3.3 Extractie-voorzuivering

Er zijn 2 belangrijke combinaties voor extractie en voorzuivering uitgetest. Aanvankelijk werd uitgegaan van extractie van niermonsters met water, zuivering met Extrelut^{R} met als elutiemiddel dichloormethaan en vervolgens opname (na droogdampen) van het residue in verdund zuur en partitie met petroleumether. Deze methode gaf voor carazolol, xylazine en azaperon goede tot redelijke terugvindingspercentages (> 50%) maar voor haloperidol en de drie promazines was dat veel lager (10-30%) en slecht reproduceerbaar. Hoewel in de literatuur als oorzaak van slechte terugvindingspercentages veelal interacties met glaswerk worden genoemd (Etter 1984, Rudolph 1987) gaf toepassing van alleen polypropyleenmaterialen geen verbetering.

Werd een deel van het waterige extract geconcentreerd op een geactiveerd Seppak C-18 kolommetje dat vervolgens geëlueerd werd met acetonitril dan werd het terugvindingspercentage voor de promazines niet hoger. Werden echter de verbindingen toegevoegd ná de exctractie van nier met water dan werden terugvindingspercentages gevonden van ongeveer honderd procent. Kennelijk is het niet mogelijk om de drie promazines en haloperidol met water kwantitatief uit nier te extraheren, waarschijnlijk omdat deze te à-polair zijn. Extractie met zure acetaatbuffers (0,1 m; pH 4-6) gaf hetzelfde slechte resultaat.

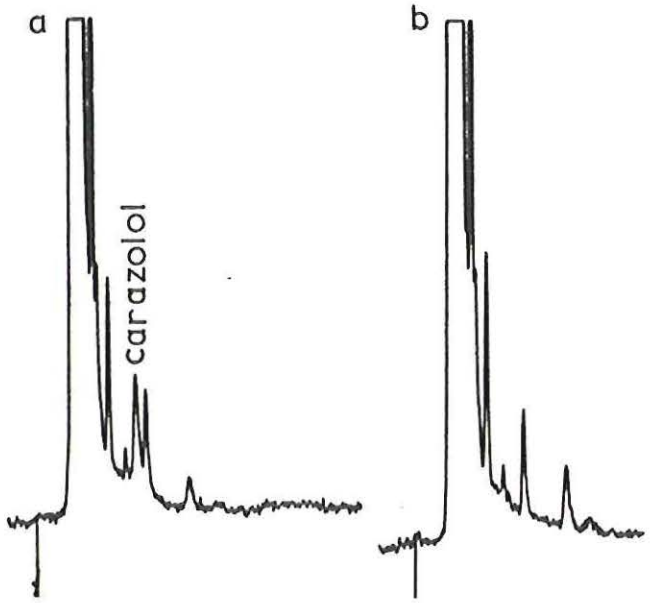
Vervolgens is extractie met acetonitril getest in combinatie met concentrering op een Seppak C-18 kolom. Werd een deel van het acetonitril extract van nier verdund met water dan bleken de polaire componenten carazolol, xylazine en azaperol door de Seppak te spoelen bij de préconcentratie. Door water te vervangen door een 10% natriumchlorideoplossing werd dit voorkomen.

Het was wel noodzakelijk de Seppak daarna te spoelen met water om overtollig zout te verwijderen. Daarbij traden geen verliezen voor de 8 componenten op.

Deze konden na het spoelen van het kolommetje geëlueerd worden met acetonitril of aangezuurde acetonitril. In beide gevallen was 2 ml voldoende voor een kwantitatieve elutie.

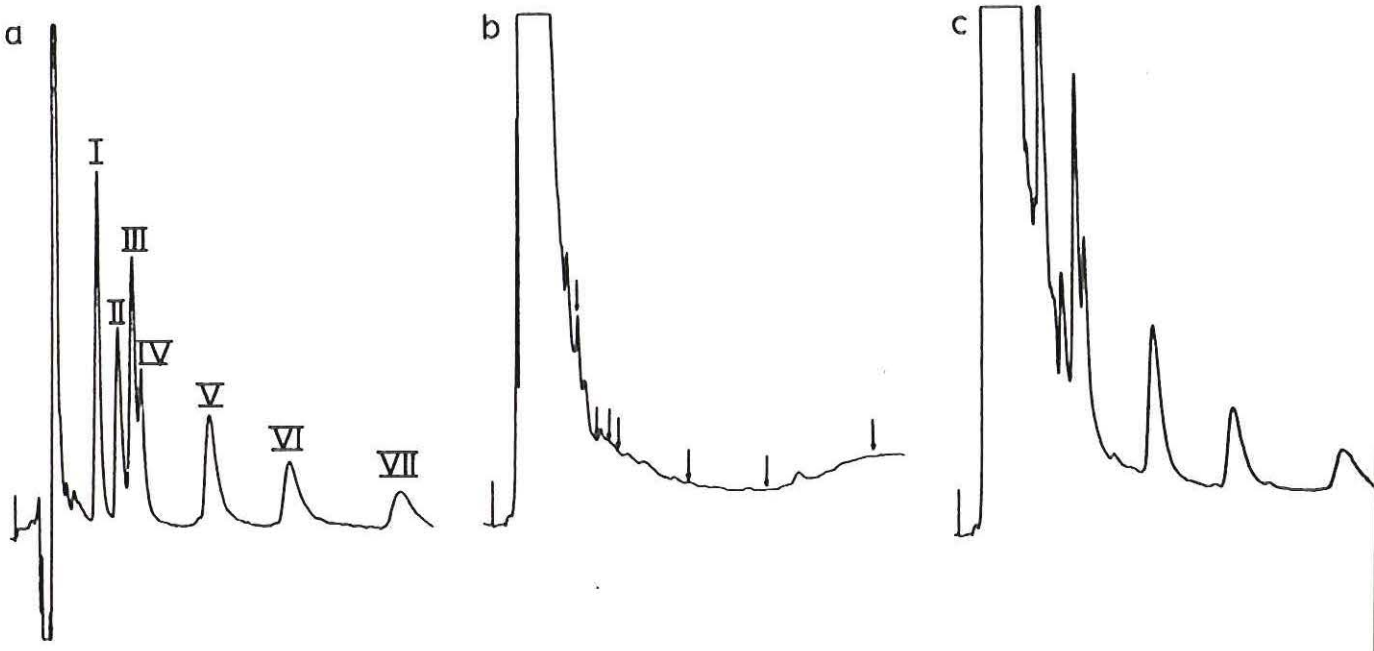
Na droogdampen van het eluaat bleek er in de reageerbuis nog een vettig residu aanwezig.

Door opname van het residu in verdund zwavelzuur (0,02 N) en extractie met petroleumether werd dit verwijderd.
De ontstane methode gaf redelijke resultaten. Het terugvindingspercentage voor chloorpromazine was echter nog laag (ca. 40%) en slecht reproduceerbaar. Verder werd in het chromatogram van de fluorescentiedetector een stoorpiek waargenomen met een retentietijd welke bijna gelijk was aan die van carazolol (zie figuur 8).
Het verlies aan chloorpromazine werd aanvankelijk toegeschreven aan indampeffecten. Door het tussentijds spoelen van de Seppak met water te vervangen door spoelen met 0,02 n zwavelzuur en door het eluaat op te vangen in een gecalibreerde puntbuis was geheel droogdampen niet meer noodzakelijk. De slechte terugvindingspercentages voor chloorpromazine bleven echter optreden, maar minder frequent. Werd direct na indampen van de acetonitril het zure extract geëxtraheerd met petroleumether dan was het terugvindingspercentage voor alle componenten bij alle analyses groter dan 90%. Kennelijk absorberen de promazines in waterig milieu aan matrixrestanten (bijvoorbeeld vet) die bij extractie met petroleumether in de organische fase terecht komen. Door directe extractie kan dit voorkomen worden. De methode bleek nu goede resultaten te geven: hoge terugvindingspercentages, schone blanco's en een goede reproduceerbaarheid.



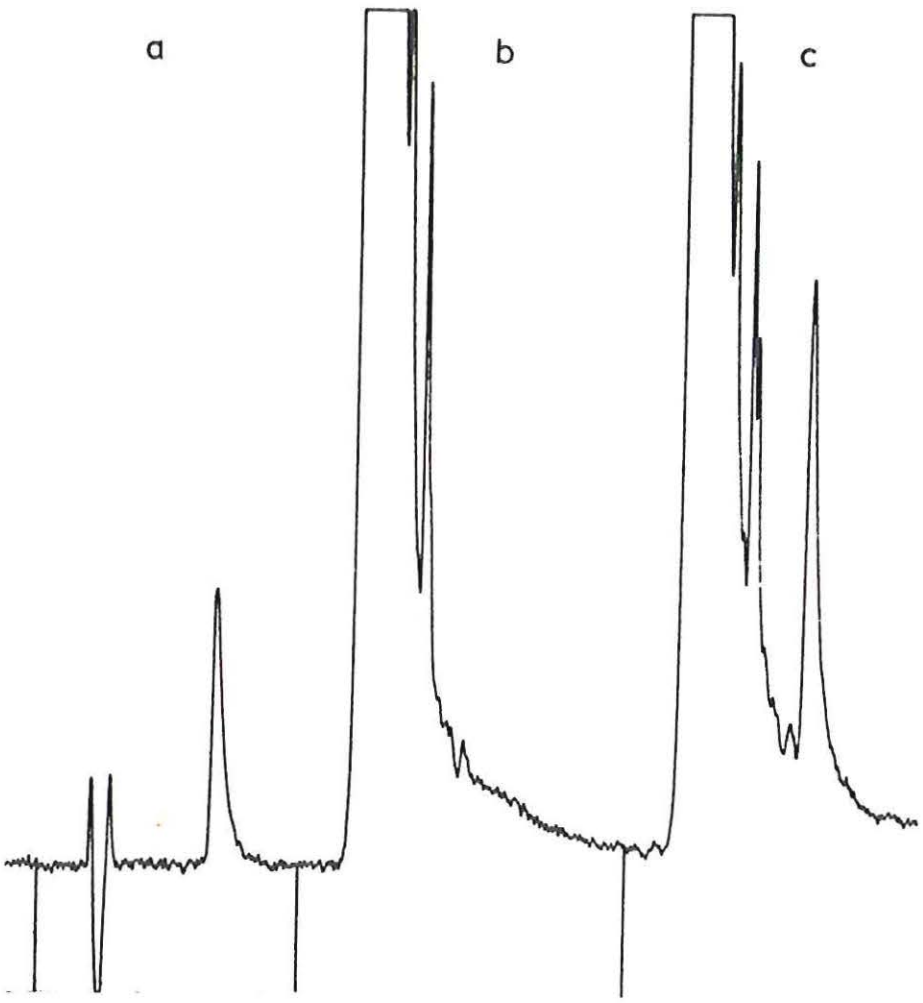
Figuur 8: HPLC-chromatogrammen voor (a) blanco nier + 1 µg/kg carazolol en (b) blanco nier. Meting met fluorescentiedetectie. De HPLC-condities en detectorinstelling waren gelijk aan die gegeven in bijlage A.

Een aantal karakteristieke HPLC-chromatogrammen met UV-detectie zijn gegeven in figuur 9.



Figuur 9: HPLC-chromatogrammen met UV-detectie van (a) standaard-oplossing 0,1 µg/ml (carazolol 0,05 en xylazine 0,2 µg/ml) (b) blanco nier en (c) blanco nier + 50 µg/kg spike. De nummering van de componenten is dezelfde als in figuur 1. De HPLC-condities zijn gegeven in bijlage A.

De stoorpiek in het chromatogram van de fluorescentiedetector bleek afkomstig uit de petroleumether. Bij vervanging van petroleumether door hexaan bleek deze verdwenen (zie figuur 10). Dit heeft verder geen waarneembaar effect op de resultaten.



Figuur 10: HPLC-chromatogrammen na fluorescentiedetectie van (a) standaardoplossing carazolol 0,005 µg/ml (b) blanco niermonster en (c) praktijkmonster met 2,0 µg/kg carazolol. De HPLC-condities zijn gegeven in bijlage A.

3.4 Terugvindingspercentages en variatiecoëfficiënt.

Terugvindingsexperimenten zijn uitgevoerd door toevoeging van een hoeveelheid mengstandaardoplossing aan niermonsters. Carazolol werd toegevoegd op een niveau van 10 µg/kg, xylazine op een niveau van 40 µg/kg en alle overige componenten op een niveau van 20 µg/kg.

De resultaten zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Terugvindingspercentages en variatiecoëfficiënten voor de bepaling van tranquillizers in niermonsters volgens de methode beschreven in bijlage A (n=10).

Comp. nr.	Component	Toegevoegd µg/kg	Gemiddeld recovery %	Variatie-coëfficiënt %
I	carazolol	10	99	5,3
II	xylazine	40	52	18,9
III	azaperon	20	99	8,8
IV	haloperidol	20	95	7,6
V	acepromazine	20	101	8,2
VI	propionylpromazine	20	95	6,7
VII	chloorpromazine	20	93	13,4

Xylazine geeft de hoogste variatiecoëfficiënt, omdat de pré-concentratie van deze component op de Seppak C-18 onder de gekozen condities kritisch is. Wordt in plaats van 7,5 slechts 5 ml van het nierextract op de Seppak gebracht dan wordt xylazine ook kwantitatief teruggevonden. Dit heeft echter gevolgen voor detectiegrens van de overige componenten. Een deel van de geobserveerde variatiecoëfficiënt wordt veroorzaakt door de matige calibratie van de puntbuizen. Is kwantitatieve bepaling van één der componenten noodzakelijk dan is toevoeging van een interne standaard aan de uiteindelijke meetoplossing noodzakelijk. Hiervoor is haloperidol toepasbaar, omdat dit middel alleen humaan wordt toegepast.

Het terugvindingspercentage en de variatiecoëfficiënt voor carazolol zijn redelijk vergelijkbaar bij een toevoegingsniveau van 1 en 10 µg/kg . Een positief monster varkensnier met een gemiddeld gehalte van 2,0 µg/kg carazolol gaf bij herhaalde analyse (n=14) een variatiecoëfficiënt van 14,4%. Deze hogere waarde wordt waarschijnlijk veroorzaakt door inhomogeniteit van het monstermateriaal. Carazolol is dus ook bij een gehalte lager dan 10 µg/kg met acetonitril goed extraheerbaar. Dit in tegenstelling tot de bevindingen van Rudolph et al. (1987) die bij extractie met alleen acetonitril geen reproduceerbare resultaten vonden.

3.5 Bepaalbaarheidsgrenzen

De bepaalheidsgrenzen voor de componenten zijn gegeven in tabel 2.

Tabel 2: Bepaalbaarheidsgrenzen voor tranquillizers in niermonsters bij analyse volgens de methode beschreven in bijlage A.

Component nummer		Bepaalbaarheidsgrens µg/kg
I	carazolol	0,3
II	xylazine	4,0
III	azaperon*	1,0
IV	haloperidol	1,5
V	acepromazine	2,0
VI	propionylpromazine	3,5
VII	chloorpromazine	6,2
*	azaperol	1,8

Als bepaalbaarheidsgrens is aangehouden een minimale signaalhoogte van 5 mm overeenkomend met meer dan tien maal de gemiddelde ruis (Freeman 1980). Onder de gekozen condities wordt geen UV-signaal waargenomen in blanco monsters met de retentietijd van één der componenten en de ruis in het UV-signaal is nog nauwelijks waarneembaar. Daarom is gekozen voor een vaste signaalhoogte voor het berekenen van de bepaalbaarheidsgrens.

3.6 Praktijkresultaten

Met een aantal middelen welke in Nederland commercieel verkrijgbaaar zijn als injectievloeistof is een praktijkproef uitgevoerd (dr J. Nouws, RVV kring 6). De dieren zijn na 1, 2 of 3 uur geslacht en de nieren zijn verwijderd. Deze zijn gehomogeniseerd en geanalyseerd volgens de beschreven methode. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.

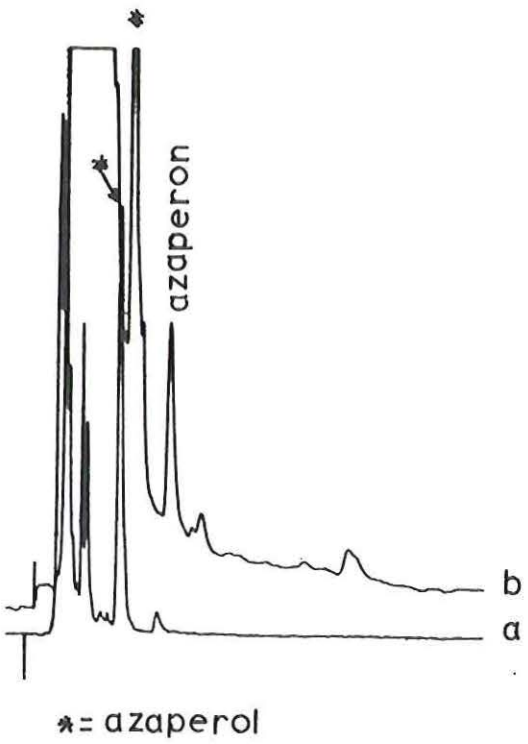
Tabel 3: Resultaten van de analyse van niermonsters van dieren welke behandeld zijn met tranquillizers met de methode welke beschreven is in bijlage A.

Component	Dier	Toediening	t(uur)	Gehalte nier in mg/kg
carazolol	1	1 ml Suacron^R 0,05%	2	0,0037
	2	1 ml Suacron^R 0,05%	5	0,0008
	3	2 ml Suacron^R 0,05%	1	0,011
	4	2 ml Suacron^R 0,05%	2	0,019
	5	5 ml Suacron^R 0,05%	2	0,024
xylazine	1	2 ml Sedamum^R 2%	2	1,5
	2	1,5 ml Sedamum^R 2%	5	0,15
azaperon	1	1 ml Stresnil^R 4%	2	0,078 (0,28)*
	2	1 ml Stresnil^R 4%	5	0,023 (0,13)*
acepromazine	1	2 ml Acetazine^R 0,5%	2	0,26
	2	2 ml Acetazine^R 0,5%	5	0,036
propionylproma-zine	1	2,5 ml Combolen^R 1%	2	0,16
	2	2,5 ml Combolen^R 1%	5	0,046

De gehalten zijn gecorrigeerd voor het terugvindingspercentage.

t = tijdsduur verstreken tussen toediening en slacht
( )* = gevonden gehalte voor azaperol

In de niermonsters van de dieren welke behandeld zijn met azaperon is tevens azaperol bepaald. Het azaperolgehalte bleek meer dan drie maal zo hoog als dat van azaperon. Dit komt overeen met de bevindingen van Rauws et al. (1978). Een chromatogram is gegeven in figuur 11. Naast azaperon en azaperol zijn in het fluorescentiechromatogram nog twee onbekende metabolieten zichtbaar. Voor alle overige componenten is alleen de moederverbinding bepaald. Uit de resultaten blijkt dat de componenten met de beschreven methode te bepalen zijn in nieren van behandelde dieren. De detectiegrenzen zijn voldoende laag om in alle gevallen 5 uur na een normale dosering de moederverbinding aan te tonen. Van dier 4 dat behandeld is met carazolol is met de beschreven methode tevens het vlees geanalyseerd. Het gehalte aan carazolol bedroeg hierin 0,011 mg/kg. De verhouding tussen het gehalte in nier en het gehalte in vlees komt goed overeen met de resultaten van Rudolph et al. (1987).



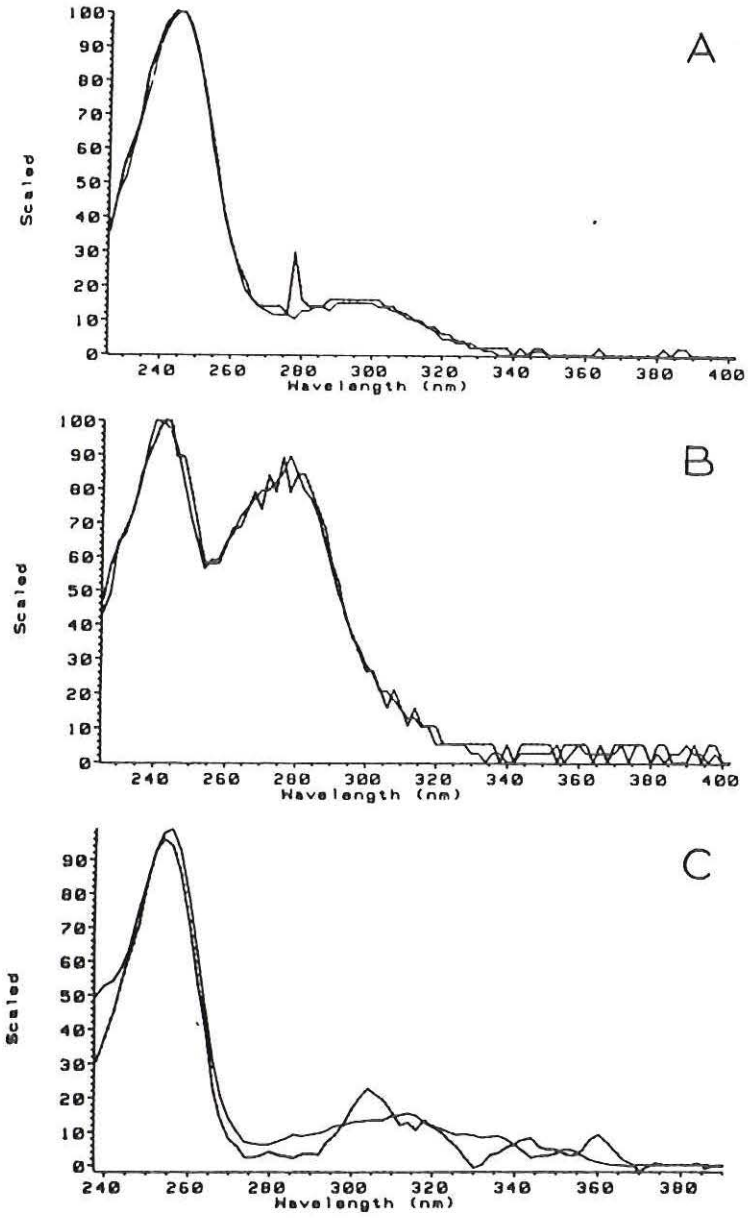
Figuur 11: HPLC-chromatogram voor een niermonster van een slachtvarken dat behandeld is met Stresnil^{R} en 2 uur na de dosering is geslacht. a. fluorescentiesignaal, b. UV-signaal. De HPLC-condities waren ongeveer gelijk aan die beschreven in bijlage A, maar het injectievolume was 20 µl en de "PMT-gain" van de fluorescentiedetector 10.

3.7 Confirmatie

Bevestiging aan de hand van een UV-spectrum met een Diode Array detector is globaal mogelijk vanaf een niveau van 0,1 mg/kg (zie figuur 12).

3.8 Storingsanalyse en toepasbaarheid

Voor meer dan 40 diergeneesmiddelen (zie bijlage 3) en andere (humane) tranquillizers is nagegaan of onder de gekozen HPLC-condities interferenties optreden. De enige storing doet zich voor bij propionylpromazine. Perphenazine en promazine geven een UV-signaal met een retentietijd die respectievelijk 0,1 en 0,5 minuut verschilt van die van propionylpromazine. Met de beschreven methode kunnen per dag 24 niermonsters geanalyseerd worden. Tot op dit moment zijn meer dan 1000 anlayses uitgevoerd zonder noemenswaardige problemen. De resultaten van dat onderzoek zullen later gerapporteerd worden.



Figuur 12: UV-spectra van standaard (——) en nier + spike 100 µg/kg (...) voor A: azaperon, B: acepromazine en C: chloorpromazine. De HPLC-condities waren dezelfde als die beschreven in bijlage A met toepassing van een Diode Array detector (HP 1040 M).

4 CONCLUSIES

Met de ontwikkelde methode kunnen de tranquillizers xylazine, azaperon, haloperidol, acepromazine, propionylpromazine en chloorpromazine en de "β-blocker" carazolol bepaald worden in varkensnier met een detectieniveau dat lager ligt dan 10 µg/kg en voor carazolol lager dan 1 µg/kg.

Dit meetniveau is voor carazolol, xylazine, azaperon, acepromazine en propionylpromazine voldoende laag om vijf uur na een normale dosering de moederverbinding te bepalen in varkensnier. In vergelijking met eerder in de literatuur beschreven methoden zijn de terugvindingspercentages en de reproduceerbaarheid voor alle componenten aanzienlijk beter.
De methode is zeer geschikt voor routinematige toepassing op grote series monsters.

LITERATUUR

Engelsma J.W., J. Simons (1985), The Veterinary Quarterly 7 (1), 73-76.

Etter R. et al. (1984), Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 75, 447-458.

Freeman D. (1980), Anal. Chem. 52, 2249-2257.

Haagsma N., E.R. Bathelt and J.W. Engelsma (1988), J. Chrom. in press.

Rauws A.G. and M. Olling (1978), J. Vet. Pharmacol. Therap. 1, 57-62.

Laitem L., I. Bello and P. Gaspar (1978), J. Chrom. 156, 327-329.

Olling M., R.W. Stephany and A.G. Rauws (1981), J. Vet. Pharmacol Therap. 4, 291-294.

Rattenberger E., P. Matzke and J. Neudegger (1985), Archiv für Lebensmittelhyg. 36, 77-100.

Rauws A.G. et al (1976), Toxicology and Applied Pharmacology 35, 333-339.

Rauws A.G. and M. Olling (1978), J. Vet. Pharmacol. Therap. 1, 57-62.

Rudolph M. and H. Steinhart (1987), J. Chrom. 392, 371-378.

Rudoplh M. and H. Steinhart (1987), Deutsche Lebensm. Rundschau 83 (9), 273-276.

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT A 486

2e oplage (1987-09-14)

NIER - BEPALING VAN TRANQUILLIZERS - HPLC

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sectorhoofd, afdeling DGM (5x)

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT A 486
2e oplage (1987-09-14)

Nier - Bepaling van tranquillizers - HPLC

---

1 Doel en toepassingsgebied

De bepaling is geschikt voor de gelijktijdige screening/analyse van chloorpromazine, propiopromazine, acepromazine, haloperidol, carazolol, azaperol, azaperon en xylazine in nier.
De methode is toepasbaar vanaf 0,3 µg/kg voor carazolol, 10 µg/kg voor xylazine en 5 µg/kg voor de overige componenten. De recovery bedraagt ca. 90% voor de componenten met uitzondering van xylazine. Deze bedraagt ca. 50%.

2 Principe

De tranquillizers worden met acetonitril uit nier geëxtraheerd. Van het verkregen extract wordt, na centrifugeren, een deel verdund met een natriumchloride-oplossing.
Het mengsel wordt door een Seppak C18 geleid. De op de Seppak geconcentreerde tranquillizers worden met zure acetonitril geëlueerd. Het eluaat wordt onder een stikstofstroom bijna drooggedampt. Het restant wordt gezuiverd met hexaan. De waterige fase wordt in het HPLC systeem gebracht. De detectie geschiedt bij een golflengte van 240 nm.
Carazolol wordt bepaald met fluorescentie detectie (λ_{ex} =246 nm; λ_{em} =351 nm.)

3 Reagentia

Alle reagentia zijn van p.a. kwaliteit of anders indien vermeld.

3.1 Millipore water.

3.2 Natriumacetaat (b.v. Merck art. 6268).

3.3 IJsazijn (b.v. Merck art. 63).

3.4 Acetonitril (b.v. Merck art. 3).

3.5 Natriumchloride (b.v. Merck art. 6404).

3.6 Zwavelzuur gec. (b.v. Merck art. 714).

3.7 Hexaan (b.v. Merck art. 909).

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

3.9 Seppak C18 cartridge (Waters art. 51910).

3.10 Zure acetonitril.
Voeg aan 100 ml acetonitril 1 ml zwavelzuur 0,1 N toe en meng.

3.11 Natriumchloride-oplossing 10%.
Weeg 100 g natriumchloride (3.5) af in een kolf van 1 l, los op in water, vul aan tot de streep en meng.

3.12 Zwavelzuuroplossing 0,02 N.
Breng bij ca. 500 ml millipore water 28 ml gec. zwavelzuur (3.6), meng en vul aan tot 1 liter en meng nogmaals (zwavelzuur 1 N). Breng van deze oplossing 20 ml in een 1000 ml maatkolf, vul aan met water en meng.

3.13 HPLC eluens.
0,03 M natriumacetaat-acetonitriloplossing (45+55 v/v) (pH 6,4).
Weeg 2,46 g natriumacetaat af, voeg 450 ml water en 550 ml acetonitril toe en meng. Breng de pH op precies 6,4 met 50% azijnzuuroplossing (gebruik pH meter) nadat het mengsel op kamertemperatuur is gebracht. Filtreer de oplossing over een filter van 0,45 µm en leid helium door. Controleer geregeld de pH.

3.14 Standaardstoffen.
Carazolol, xylazine, azaperon, azaperol, haloperidol, acepromazine, propiopromazine, chloorpromazine.

3.15 Hoofdstandaardoplossingen tranquillizers (100 µg/ml).
Weeg ca. 10 mg (op 0,1 mg nauwkeurig) van de tranquillizer af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan met methanol tot de streep en meng.

3.16 Mengstandaardoplossing tranquillizers.
Pipetteer in een maatkolf van 100 ml 2 ml van de hoofdstandaardoplossing xylazine, 0,5 ml van die van carazolol en 1 ml van die van azaperon, haloperidol, acepromazine, propiopromazine en chloorpromazine.
Vul aan met 0,02 N zwavelzuur tot de streep en meng.

3.17 Werkstandaardoplossing.
Pipetteer van standaardoplossing 3.16 10 ml in een maatkolf van 100 ml, vul aan met 0,02 N zwavelzuur tot de streep en meng.

3.18 Werkstandaardoplossing azaperon-azaperol.
Pipetteer in een maatkolf van 100 ml 1 ml van de hoofdstandaardoplossing azaperon en azaperol, vul aan tot de streep met 0,02 N zwavelzuur en meng.
Pipetteer van deze oplossing 10 ml in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de streep met 0,02 N zwavelzuur en meng.
Deze oplossing bevat 0,1 µg/ml van beide verbindingen.

4 Apparatuur

4.1 Vleesmolen (Moulinette).

4.2 Centrifuge.

4.3 Vibro-fix.

4.4 HPLC systeem met als kolommen: guard kolom Bondapak C18 37-50 µm (10 x 2,1 mm), analytische kolom u Bondapak C18 (300 x 3,9 mm) 10 µ.
HPLC-pomp, UV-detector (Kratos 783) en fluorescentie-detector (HP 1046A).

4.5 Normaal laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen.

5 Werkwijze

De tranquillizers zijn lichtgevoelig. Werk zoveel mogelijk onder uitsluiting van daglicht.

5.1 Controlemonsters.

Neem bij elke serie monsters en blanco monster, een monster met toevoeging van 20 µg/kg en een monster met toevoeging van 50 µg/kg mee. (Zie opm. 7.1)

5.2 Voorbereiding.

Maal de nier fijn in een vleesmolen. Weeg van het gehomogeniseerde monster 5 g af in een polypropyleen centrifugebuis (inhoud 80 ml).

5.3 Zuivering en extractie.

Voeg al mengend met Vibro-fix (ca. 750 rpm) 20 ml acetonitril (3.4) toe, sluit de buis af met een bijbehorende deksel en meng nog eens 45 sec. met de Vibro-fix (1500 rpm). Plaats de buizen 2 minuten in een ultrasoonbad en centrifugeer 5 minuten bij 4000 rpm.
Activeer intussen de Seppak C-18 cartridge (3.9) met achtereenvolgens 5 ml methanol en 5 ml water. Sluit de Seppak aan op een wegwerpspuit van 50 ml, breng 50 ml natriumchloride-oplossing 10% (3.11) in de spuit en 7,5 ml van het monsterextract. Meng en druk geleidelijk het geheel door de Seppak. Verwijder de wegwerpspuit, spoel de Seppak met 1 ml 0,02 N zwavelzuur (3.12). Blaas de Seppak door met 2 ml lucht en elueer deze met 2 ml zure acetonitril (3.10). Vang het eluaat op in een gecalibreerde puntbuis van 10 ml (zie opm. 7.2).
Damp voorzichtig in onder een stikstofstroom bij $\pm$ 70 ^{o}C in een Pierce evaporator tot 350 µl. Extraheer het restant direct met 1 ml hexaan en centrifugeer gedurende 5 minuten bij 1500 rpm. Isoleer de waterige fase. Injecteer hiervan 50 µl op het HPLC-systeem.

6 Analyse-omstandigheden

De UV detector wordt ingesteld op UV-240 nm en 0,002 Aufs. De instelling van de fluorescentiedetector is : λ_{ex} =246 nm λ_{em} =351 nm; PMT-gain 12. De recorderpen voor het UV-signaal wordt ingesteld op 10 mV , voor

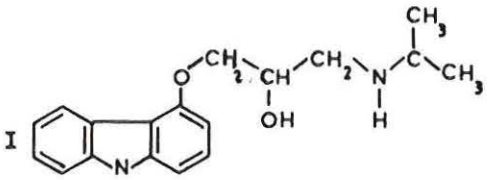
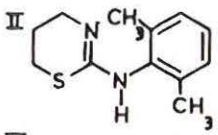
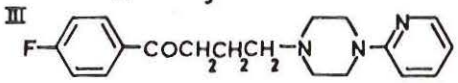
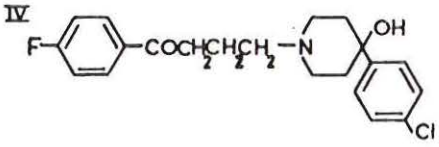
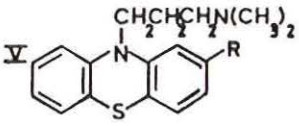
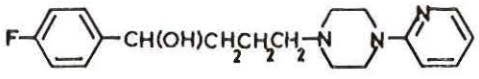
de fluorescentiedetector op 10 mV en het eluensdebiet op 1,2 ml/min. Injecteer 50 µl van de werkstandaardoplossingen (3.17 en 3.18) en monsteroplossingen verkregen bij 5.2 in het HPLC systeem. Vergelijk piekhoogten van de recovery-experimenten met eventuele pieken in chromatogrammen van monsters en bepaal het gehalte.

7 Opmerkingen

7.1 Recovery-experimenten 20 en 50 µg/kg.
Pipetteer in twee plastic centrifugebuizen welke reeds 5 g blanco nier bevatten resp. 100 en 250 µl van standaardoplossing 3.16. Vervolg de opwerking zoals beschreven staat in 5.1 en bereken de recoveries.

7.2 De buizen worden vóór gebruik gespoeld met achtereenvolgens gec. ammonia, water, alcohol en aceton en vervolgens drooggeblazen

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts
Samenstelling : H.J. Keukens

Nr.	Structuur	Naam
I		carazolol
II		xylazine
III		azaperon
IV		haloperidol
V	 R = $COCH_3$	acepromazine
VI	R = $COCH_2CH_3$	propionylpromazine
VII	R = Cl	chloorpromazine
		azaperol

Componenten getest bij de storingsanalyse

Diergeneesmiddelen

Amprolium
Arprinocid
Buquinolaat
Carbadox
Chlooramphenicol
Dapson
Decoquinaat
Dimetridazol
Dinitolamide
Ethopabaat
Fenbendazol
Furaltadon
Furazolidon
Furnicozon
Halofuginon
Ipronidazol
Methylbenzoquaat
Metichloorpindol
Nicarbazin
Nifursol
Nitrovin
Robenidine
Ronidazol
Olaquindox
Pyranteltartraat
Sulfanilamide
Sulfadiazine
Sulfadimidine
Sulfadoxine
Sulfachinoxaline
Thiofanaat

Tranquillizers

Amitriptyline
Carbamazepine
Chlorprotixene
Cyclizine
Diazepam
Hydroxyzine
Lorazepam
Methyl(2)-amino-5-choorbenzophizon
Nefopam
Nitrazepam
Oxazepam
Perphanazine
Prochlorperazine
Promazine