

Projectnr.: 71.805.01  
Nitrofuranen in mestkuikens

Projectmanager: T. Zuidema

Rapport 2003. 022

september 2003

## **Adducten van nitrofuranen: metabolisme, uitscheidingskinetiek en analytiek**

T. Zuidema

Afdeling: Analyse en Ontwikkeling  
Cluster: Dierbehandelingsmiddelen

Studentnummer OUNL: 835802362

RIKILT – Instituut voor voedselveiligheid  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon: 0317 475400  
Telefax: 0317417717  
Internet: [www.rikilt.wageningen-ur.nl](http://www.rikilt.wageningen-ur.nl)

Open Universiteit Nederland (OUNL)  
Directoraat Natuur- en technische wetenschappen  
Valkenburgerweg 177, 6419 AT Heerlen  
Postbus 2960, 6401 DL Heerlen  
Telefoon: 045-576 2888  
Telefax: 045-576 2269  
Internet: [www.ou.nl](http://www.ou.nl)

Copyright 2003, RIKILT - Instituut voor voedselveiligheid

## VERZENDLIJST

### INTERN:

Directeur

Programmaleiders

Auteur

Ron Hoogenboom

Hans van Rhijn

Baukje Schat

### EXTERN:

R. Niesink (OUNL)

E. Middelbeek (OUNL)

Open Universiteit (3x)

## **Voorwoord**

Het in dit verslag beschreven afstudeeronderzoek is een onderdeel van de opleiding Voeding en Toxicologie aan de Open Universiteit Nederland. Het dier-experiment is uitgevoerd op het Zodiac, kenniseenheid Dier van Wageningen University and Research (WUR). Het analytische werk is uitgevoerd op het Rijks-Kwaliteits Instituut voor Land- en Tuinbouwproducten (RIKILT – Instituut voor voedselveiligheid) te Wageningen op de afdeling Analyse en Ontwikkeling, cluster dierbehandelingsmiddelen in de periode september 2002 t/m augustus 2003.

Via deze weg wil ik graag iedereen bedanken die mij bij het onderzoek heeft ondersteund, alle medewerkers van het Zodiac voor het uitvoeren van de dierstudie, Baukje Schat voor de begeleiding van de dierstudie, Hans van Rhijn voor de begeleiding van het analytische werk en Ron Hogeboom voor de begeleiding van het in-vitro onderzoek, alle medewerkers van het cluster dierbehandelingsmiddelen voor hun hulp en gezelligheid, Raymond Niesink en Evert Middelbeek voor hun begeleiding vanuit de OUNL en tot slot de directie van het RIKILT voor het ter beschikking stellen van de faciliteiten welke het onderzoek mogelijk maakten.

<b>Voorwoord</b>	<b>blz.</b> 1
<b>Inhoud</b>	3
<b>Abstract</b>	5
<b>Samenvatting</b>	7
<b>1. Inleiding</b>	9
<b>2. Methoden</b>	15
2.1 <i>Dierexperimentele studie</i>	15
2.1.1 <u>Berekening halfwaardetijd</u>	15
2.2 <i>Analysemethoden</i>	15
2.2.1 <u>Analyse op de aanwezigheid van furazolidon en furaltadon in voer</u>	15
2.2.2 <u>Analyse op de aanwezigheid van furazolidon en furaltadon in weefsels en bloed</u>	15
2.2.3 <u>Analyse op de aanwezigheid van metabolieten van nitrofuranen</u>	16
2.3 <i>In-vitro onderzoek</i>	17
2.3.1 <u>Verkrijgen microsomen</u>	17
2.3.2 <u>Bepaling eiwitgehalte</u>	17
2.3.3 <u>Incubatie van microsomen met nitrofuranen</u>	17
2.4 <i>Statistiek</i>	17
<b>3. Resultaten</b>	19
3.1 <i>Dierexperimentele studie</i>	19
3.1.1 <u>Furazolidon en furaltadon in voer</u>	19
3.1.2 <u>Furazolidon en furaltadon in vlees, lever, nier, gal en bloed</u>	19
3.1.3 <u>AOZ en AMOZ in vlees, lever, nier, gal en bloed</u>	20
3.2 <i>In-vitro onderzoek</i>	22
3.2.1 <u>Bepaling eiwitgehalte microsomen</u>	22
3.2.2 <u>Incubatie van microsomen met nitrofuranen</u>	22
<b>4. Discussie</b>	25
4.1 <i>Dierexperimentele studie</i>	25
4.1.1 <u>Furazolidon en furaltadon</u>	25
4.1.2 <u>Totaal residu aan AOZ en AMOZ</u>	25
4.1.3 <u>Weefselgebonden residu aan AOZ en AMOZ</u>	28
4.1.4 <u>Controle op gebruik van nitrofuranen</u>	31
4.2 <i>In-vitro onderzoek</i>	32
<b>5. Conclusie</b>	35
<b>6. Verder onderzoek</b>	37
<b>Literatuur</b>	39

<b>Tabellen</b>	<b>blz.</b>
1. Tabellen uitvoering en controle dierstudie	41
2. Tabellen uitscheidingskinetiek	41
3. Tabellen in-vitro onderzoek	45
	55

**Bijlagen:**

1. Onderzoeksvoorstel
2. Protocol + amendement
3. Resultaten monsters
4. Methode voor de analyse van metaboliëten van nitrofuranen

## Abstract

A pharmaco-kinetic study has been performed to investigate whether or not the metabolism and the formation of tissue-bound residues in broilers is similar to pigs after being fed a diet containing furazolidone or furaltadone. During the medication period the groups 1 and 2 (consisting each of 30 animals) were dosed with respectively furazolidone (group 1) and furaltadone (group 2) at a dosage of respectively 185 and 202 mg/kg feed for 7 consecutive days. A so-called control group (group 4 consisting of 10 animals) was fed non-medicated feed non-stop). At the day of cessation of medication (day 0) and day 3, 7, 14 and 21 after cessation of medication 6 animals of group 1 and 2 were slaughtered. The animals of the control group were slaughtered at day 21 after cessation of medication.

Muscle, liver, kidney, blood and bile samples were collected from each animal and were analyzed for furazolidone, furaltadone and their marker-metabolites 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) and 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ).

Results show that:

- As in pigs, tissue-bound residues are formed in broilers. The marker-metabolites AOZ and AMOZ can be detected in such concentrations that (ab)use of nitrofurans can be detected in muscle, liver, kidney as well as blood, even after 21 days after cessation of medication.
- The mean total amount in muscle, liver, kidney and blood at 21 days after cessation of medication is respectively 15, 18, 12 en 15 µg/kg of AOZ and 36, 101, 34 en 46 µg/kg of AMOZ.
- Residues of AMOZ after furaltadone medication are higher compared to residues of AOZ after furazolidone medication.
- Half-life times in the different tissues are comparable for AOZ and AMOZ, respectively 4½, 6½, 3¾ and 5½ days for AOZ and 5, 7, 4 and 6 days for AMOZ in liver, muscle, kidney and blood respectively.
- The ratio between the so-called free metabolites and the tissue-bound residue in liver is constant for AOZ as well as AMOZ. An exception is the ratio in muscle at day 0. At this time a lower percentage of tissue-bound residue can be found in comparison to the other slaughter times.
- The ratio between the free metabolites and the tissue-bound AOZ in kidney at day 0 and 7 differs significantly from the ratio at day 3, 14 and 21. The ratio between the free metabolites and the tissue-bound AMOZ in kidney at day 0 and 21 differs significantly from the ratio at day 3, 7 and 14.
- The percentage of tissue-bound AOZ in liver is higher compared to the percentage of tissue-bound AMOZ in liver. For the other tissues and blood the percentages of tissue-bound AOZ and tissue-bound AMOZ are comparable.

An in-vitro experiment has been performed to investigate the formation of tissue-bound residues of the nitrofurans furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin and nitrofurazone. Microsomes, isolated from livers of poultry, were incubated with the parent compounds as well as their marker-metabolites and their marker-metabolites AOZ, AMOZ, AHD and SEM. Results show that tissue-bound residues are formed in-vitro as well.

## Samenvatting

Om helder te krijgen of het metabolisme en de vorming van weefselgebonden residuen bij toediening van nitrofuranen aan mestkuijken vergelijkbaar is met de gegevens die bekend zijn voor varkens is er een dierexperimenteel onderzoek uitgevoerd. Hierbij heeft een groep mestkuijken gedurende 7 dagen voer gekregen waaraan furazolidon in een concentratie van 185 mg/kg was toegevoegd (groep 1) en een groep mestkuijken heeft voer gekregen waaraan furaltadon in een concentratie van 202 mg/kg was toegevoegd (groep 2). Daarnaast was er een groep welke continu niet-gemedicineerd voer kreeg toegediend. Deze groep diende als blanco groep (groep 4). Het gemedicineerde voer werd bij groepen 1 en 2 na 7 dagen vervangen door niet-gemedicineerd voer, waarna op dag 0, 3, 7, 14 en 21 na het stopzetten van de medicatie steeds 6 dieren van groep 1 en 2 werden geslacht. De blanco dieren (groep 4) zijn geslacht op dag 21 na het stopzetten van de medicatie. Van elk dier is vlees, lever, nier, bloed en gal bemonsterd, waarna de monsters zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van furazolidon, furaltadon en hun bijbehorende markermetabolieten 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) en 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ).

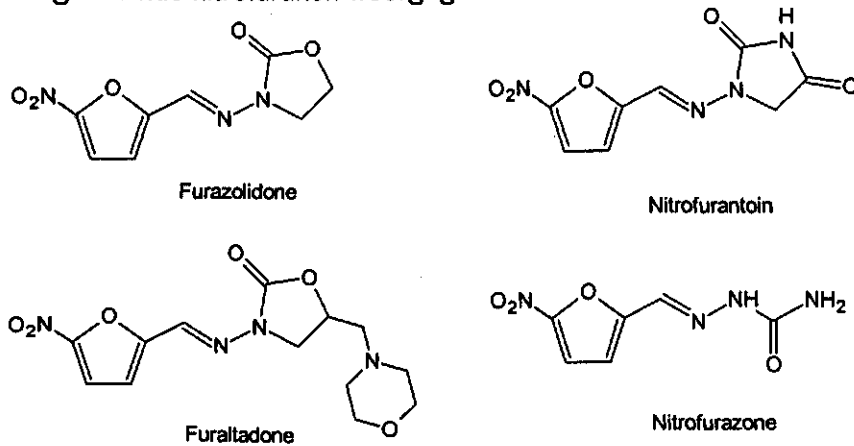
De resultaten rechtvaardigen de volgende conclusies:

- Zoals eerder aangetoond bij varkens worden ook in mestkuijken weefselgebonden residuen gevormd. De markermetabolieten van furazolidon (AOZ) en furaltadon (AMOZ) zijn ook na 21 dagen na het stopzetten van de toediening in zodanige concentraties aan te tonen in zowel vlees, lever, nier en bloed dat misbruik van nitrofuranen zeer goed aan te tonen is.
- Gemiddeld wordt er bij de gebruikte doses in vlees, lever, nier en bloed 21 dagen na het stopzetten van de toediening respectievelijk 15, 18, 12 en 15 µg/kg aan totaal residu AOZ aangetoond en 36, 101, 34 en 46 µg/kg totaal residu AMOZ.
- Vergelijking van de resultaten van de aangetroffen residuen na toediening van furazolidon (groep 1) met furaltadon (groep 2) laat zien dat het gehalte aan AMOZ (na toediening van furaltadon) over het hele tijdsinterval hoger is dan het gehalte aan AOZ (na toediening van furazolidon).
- De halfwaardetijden van AOZ en AMOZ in de verschillende matrices zijn respectievelijk 4½, 6½, 3¾ en 5½ dag voor AOZ en 5, 7, 4 en 6 dagen voor AMOZ in lever, vlees, nier en bloed.
- Het percentage aan weefselgebonden AOZ in vlees op dag 0 wijkt af van het percentage weefselgebonden AOZ op dag 3, 7, 14 en 21. Ditzelfde geldt voor het percentage weefselgebonden AMOZ in vlees.
- Het percentage aan weefselgebonden AOZ in nier op dag 0 en 7 wijkt af van het percentage weefselgebonden AOZ op dag 3, 14 en 21.
- Het percentage aan weefselgebonden AMOZ in nier op dag 0 en 21 wijkt af van het percentage weefselgebonden AMOZ op dag 3, 7 en 14.
- De verhouding tussen de vrije metabolieten en de weefselgebonden metabolieten in de loop van de tijd blijft gelijk voor zowel AOZ als voor AMOZ in lever.
- Het percentage weefselgebonden AOZ in lever is over het hele tijdsgebied hoger dan het percentage weefselgebonden AMOZ in lever, terwijl het voor de andere matrices (vlees, nier en bloed) vergelijkbaar is.

Ter onderbouwing van de vorming van weefselgebonden residuen is naast het dierexperimentele onderzoek een in-vitro onderzoek uitgevoerd. Hierbij zijn microsomen verkregen uit levers van pluimvee geïncubeerd met de verschillende nitrofuranen en hun bijbehorende markermetabolieten. Resultaten laten zien dat in de op deze manier verkregen monsters weefselgebonden residuen zijn aan te tonen.

## 1. Inleiding

De nitrofuranen, waaronder furazolidon, furaltadon, nitrofurazon en nitrofurantoin vallen, vormen een groep antibiotica die goedkoop en zeer effectief zijn voor de behandeling van bacteriële ziekten. Ze werden in het verleden veel toegepast bij pluimvee, varkens, kalveren, konijnen en vis, maar bleken een mogelijk gezondheidsrisico op te leveren voor de mens. In figuur 1 wordt de structuren van de genoemde nitrofuranen weergegeven.



*Figuur 1: Structuren van nitrofuranen*

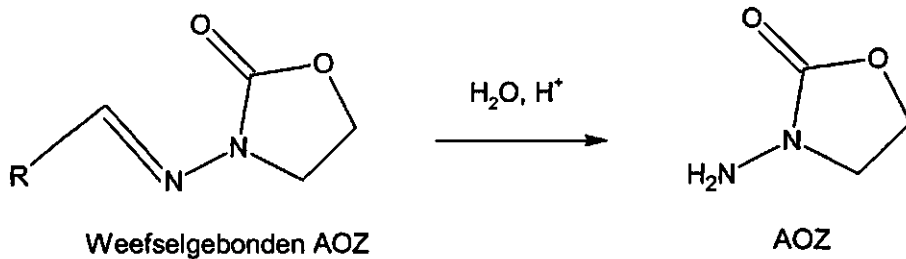
Het metabolisme en de uitscheiding van furazolidon en in mindere mate furaltadon in varkens is al onderzocht. Vroomen *et al.* (1986), Hoogenboom *et al.* (1992), McCracken *et al.* (1995) en Polman *et al.* (1994) hebben laten zien dat de uitscheiding van de "parent drug" erg snel gaat, maar dat er tegelijkertijd metabolieten ontstaan die zeer persistent zijn. Door de snelle metabolisering is het aantonen van residuen van de uitgangsstof al binnen een paar uur niet meer mogelijk. Uit een dierproef, waarbij twee varkens gedurende 10 dagen 75 mg <sup>14</sup>C gelabeld furazolidon per kg varken per dag kregen toegediend (dier 1 werd geslacht direct na het stopzetten van de toediening en dier 2 14 dagen later waarbij het dier gedurende deze 14 dagen niet-gemediceerd voer kreeg), bleek dat furazolidon als zodanig zeer snel na het stopzetten van de toediening niet meer te detecteren is, terwijl er 14 dagen na het stopzetten van de toediening nog steeds radioactiviteit overeenkomend met µg/kg-niveau kon worden gemeten in plasma en weefsels (Vroomen *et al.* 1986). Een deel van de <sup>14</sup>C-labels kon ook niet met organische oplosmiddelen uit het weefsel worden geëxtraheerd, zodat de conclusie werd getrokken dat er weefselgebonden residuen gevormd waren.

In-vitro onderzoek heeft duidelijk gemaakt dat dit afkomstig was van weefselgebonden metabolieten van furazolidon (Hoogenboom *et al.* 1992). Meestal leidt metabolisme tot de vorming van componenten, welke beter en sneller kunnen worden uitgescheiden. In sommige gevallen ontstaan er echter reactieve intermediairen die covalent kunnen binden aan DNA of eiwit. Dergelijke adducten blijven veel langer aanwezig in het lichaam en vormen daarmee een ideale marker voor het (illegale) gebruik van stoffen. Dit is eveneens het geval voor de nitrofuranen zoals aangetoond door Vroomen *et al.* (1986) en Gottschall en Wang (1995). Nog weken na toediening zijn residuen van weefselgebonden metabolieten aan te tonen in de weefsels van behandelde varkens.

Ondanks het feit dat de Food and Drug Administration (FDA) heeft laten zien dat furazolidon mutagene en carcinogene eigenschappen heeft, is het gebruik van furazolidon in het verleden toch toegestaan. Dit kwam voornamelijk voort uit het feit dat furazolidon zelf al binnen enkele uren na toediening niet meer is aan te tonen in weefsels. Een voorlopige MRL (Maximum Residue Limit) van 5 µg/kg in spier, lever, nier en vetweefsel van alle voedselproducerende diersoorten werd

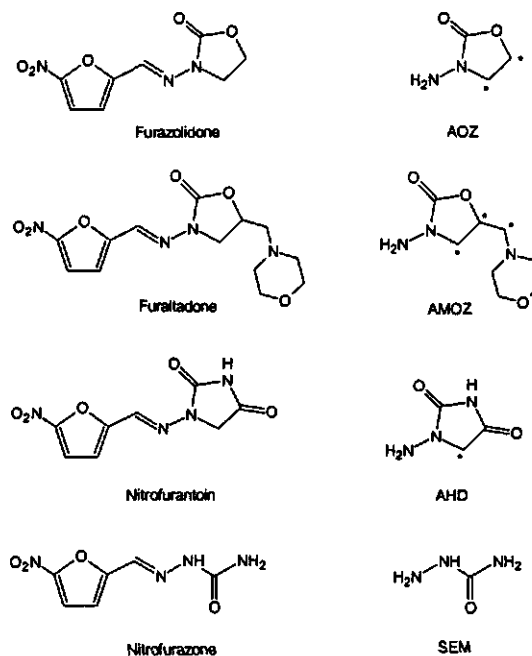


vastgesteld tot 1 juli 1995 (EG 2701/94). Een andere eigenschap van furazolidon is dat in de maag, dus onder zure condities, de intacte zijketen van furazolidon, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) kan worden afgesplitst (zie figuur 2). Hierbij wordt gebruik gemaakt van de zuurgevoeligheid van de C=N band.



*Figuur 2: Reactievergelijking van het vrijkomen van de zijketen van furazolidon.*

Aangezien AOZ ook uit weefselgebonden residuen kan worden gevormd kon het niet worden uitgesloten dat AOZ zorgt voor de mutagene en carcinogene effecten. Furazolidon en AOZ zijn goed bestudeerd met betrekking tot de toxiciteit (Angelis, 1999; FDA 1976). Andere nitrofuranen niet of in mindere mate, maar gelet op de structuren van de verschillende nitrofuranen (zie figuur 1) mag analoog metabolisme worden verwacht. Om deze reden zijn alle nitrofuranen verdacht en mede door het ontbreken van data voor bijvoorbeeld het bepalen van een No Effect Level (NoEL) zijn de nitrofuranen als groep (met uitzondering van furazolidon) in 1993 op de lijst van verboden dierbehandelingsmiddelen geplaatst. Dit is verboden op basis van het voorzorgsprincipe, met andere woorden deze zijn verboden bij gebrek aan bewijs voor hun onschadelijkheid. In 1997 is furazolidon aan deze lijst toegevoegd. Voor de controle op het misbruik van furazolidon is AOZ officieel aangemerkt als markermetaboliet. AOZ is de zijketen van furazolidon welke met behulp van zure hydrolyse kan worden vrijgemaakt onder condities die vergelijkbaar zijn met de condities in de humane maag. Hoogenboom *et al.* (1991) heeft aangetoond dat het weefselgebonden residu onder zure condities van het eiwit losgemaakt kan worden, waardoor het metaboliet kan worden gebruikt als marker voor de aanwezigheid van gebonden residuen.

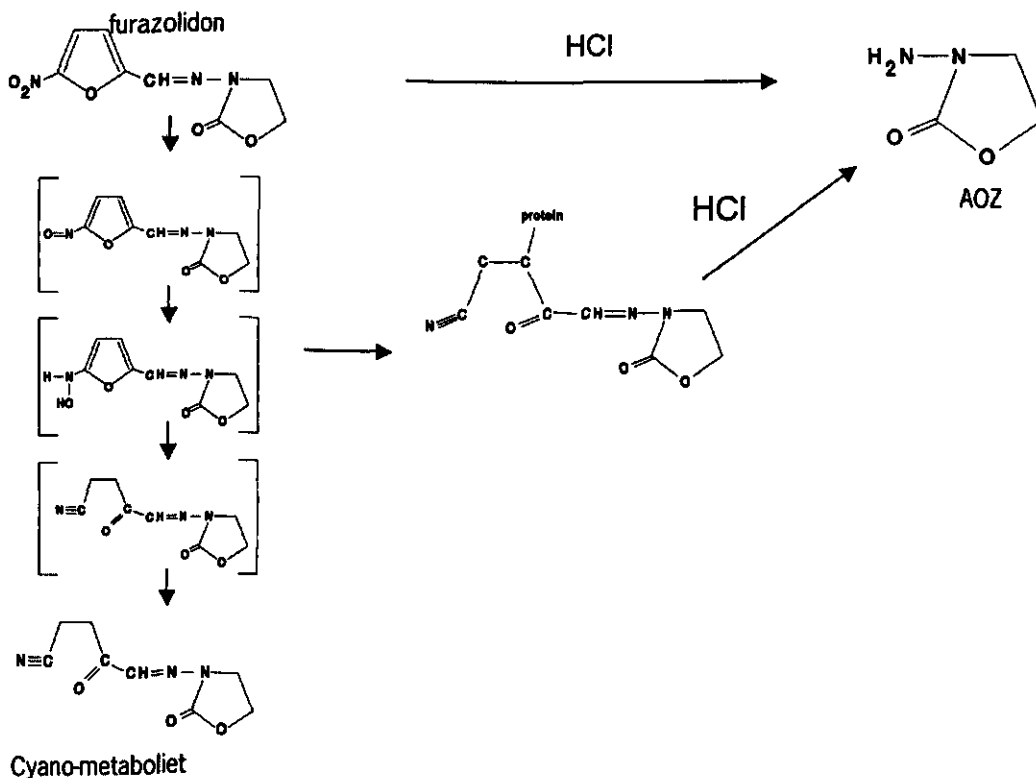


*Figuur 3: De molecuul structuren van enkele nitrofuranen en de bijbehorende marker metabolieten.*

Voor de andere nitrofuranen zijn de markermetabolieten niet officieel vastgelegd, maar gezien de reeds genoemde analogie in metabolisme is de controle ook voor deze componenten gericht op de aanwezigheid van de in figuur 3 weergegeven marker metabolieten, respectievelijk 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-amino-hydantoïne (AHD) en semicarbazide (SEM).

De vraag bleef nog altijd bestaan waar nu eigenlijk de mutagene en carcinogene eigenschappen van furazolidon door werden veroorzaakt. Werden deze nu veroorzaakt door eventuele metabolieten van furazolidon of de weefselgebonden residuen?

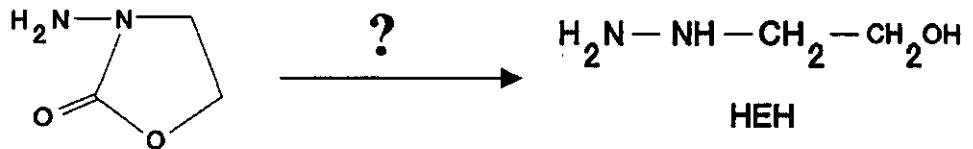
Met behulp van in-vitro onderzoek is vastgesteld dat de belangrijkste metabole route van de nitrofuranen waarschijnlijk de reductie van de nitrogroep is (zie figuur 4) (Hoogenboom *et al.* 2002).



*Figuur 4: Schematische weergave van de belangrijkste routes voor de vorming van weefselgebonden residuen van furazolidon.*

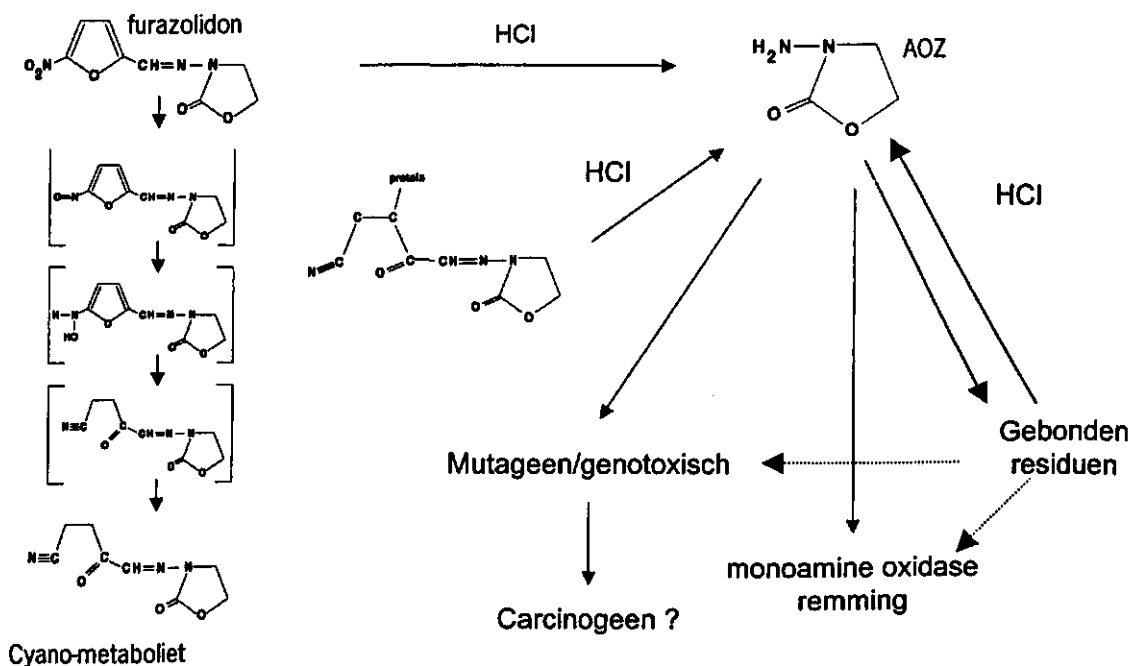
Hierbij worden verschillende tussenproducten en eindproducten gevormd. De eerste stap van de reductie leidt tot een nitro-anion radicaal, welke weer zeer snel kan worden geoxideerd tot de "parent compound" in aanwezigheid van moleculair zuurstof. Verdere reductie van het nitro-anion radicaal wordt bevorderd door de juiste omstandigheden (zuurstofarm) en leidt waarschijnlijk tot de vorming van de nitroso-, hydroxylamine en acrylonitril tussenproducten en tenslotte tot de meer stabiele producten zoals het open-ring-cyanoderivaat. De aldus gevormde reactieve tussenproducten kunnen weefselgebonden adducten gaan vormen. Daarnaast heeft onderzoek met behulp van microsomen, hepatocyten en varkenslevers aangetoond dat, evenals furazolidon, de AOZ-keten onder mild zure condities van het eiwit kan worden losgekoppeld (Hoogenboom *et al.* 1991). Aangezien de condities waaronder dit gebeurt in de menselijke maag identiek zijn heeft deze ontdekking als gevolg gehad dat de aandacht gericht werd op de AOZ-keten in plaats van op

furazolidon. Al langer was bekend dat AOZ ook verantwoordelijk is voor de remming van de activiteit van het enzym monoamine-oxidase (MAO) in weefsels van dieren behandeld met furazolidon. Dit enzym is betrokken bij het metabolisme van de neurotransmitter noradrenaline. De vraag is of de mutageniteit en de carcinogeniteit ook worden veroorzaakt door AOZ of misschien van  $\beta$ -hydroxyethylhydrazine (HEH, zie figuur 5), een component die zowel mutageen als carcinogeen is.



Figuur 5: Omzetting van AOZ naar HEH.

Uit aanvullende *in-vitro* studies is gebleken dat AOZ zelf verantwoordelijk kan worden gehouden voor de mutagene eigenschappen van furazolidon en mogelijk ook voor de carcinogene. Verder is aangetoond dat ook AOZ weefselgebonden residuen kan vormen (Hoogenboom *et al.* 2002). In figuur 6 wordt de metabole route en toxiciteit van furazolidon schematisch weergegeven.



Figuur 6: Schematische weergave van de belangrijkste routes voor de vorming van weefselgebonden residuen en de toxiciteit van furazolidon.

Tijdens een routine controle op de aanwezigheid van markermetabolieten van de nitrofuranen (uitgevoerd door het RIKILT – Instituut voor voedselveiligheid) in februari 2002 zijn residuen van nitrofuranen aangetroffen in producten (o.a. garnalen, pluimvee, konijn) afkomstig uit verschillende landen. Als reactie hierop heeft de EU de controle van importproducten uit deze landen op de aanwezigheid van residuen van nitrofuranen geïntensiveerd en in één geval is de import zelfs stopgezet. In kipproducten afkomstig uit bepaalde landen in Zuidoost-Azië en Zuid-Amerika werden frequent residuen van nitrofuranen aangetoond. Nog recenter (maart 2003) is er een toename van residu-incidentie in kipproducten gesignaleerd binnen de EU (Portugal).

Farmaco-kinetisch onderzoek waarbij het metabolisme en de vorming van weefselgebonden residuen is aangetoond is alleen verricht aan varkens en ontbreekt dus voor andere diersoorten (Gottschall *et al.* (1995), Hoogenboom *et al.* (1992), McCracken *et al.* (1995), Vroomen *et al.* (1986)). De huidige nitrofuranen problematiek laat zien dat er vooral residuen van nitrofuranen worden aangetroffen in producten van mestkuijken en garnalen. De farmaco-kinetische data van varkens worden tot nu toe zonder meer geëxtrapoleerd naar zowel mestkuijken als garnaal. De vraag is of dit terecht is. De volgende hypothesen zijn dan ook opgesteld:

*Evenals furazolidon vormen ook furaltadon, nitrofurazon en nitrofurantoïne weefselgebonden residuen*

*Evenals in varkens worden ook in mestkuijken en garnalen weefselgebonden residuen gevormd*

Om deze hypothesen te toetsen is er voor gekozen het onderzoek op twee manieren aan te pakken, een in-vivo en een in-vitro onderzoek. Aangezien het zeer moeilijk te realiseren is om een gecontroleerde dierproef op te zetten voor garnaal en de residu-incidentie van nitrofuranen momenteel voornamelijk op kipproducten van toepassing is, is er een dierexperimenteel onderzoek uitgevoerd, waarbij furazolidon en furaltadon aan mestkuijken zijn toegediend. In hoofdstuk 3 wordt dit onderzoek uitgebreid behandeld. Met behulp van de monsters verkregen uit het dierexperimentele onderzoek kon worden bepaald of er weefselgebonden residuen worden gevormd, hoe de metabolieten zich verspreiden over de verschillende weefsels en wat de halfwaardetijd is van de uitgangsstoffen en de metabolieten in de verschillende weefsels. Tevens wordt antwoord gegeven op de vraag of bij mestkuijken dezelfde weefselgebonden metabolieten gevormd als bij varkens en de extrapolatie van de beschikbare kinetiek gegevens van varkens naar kippen terecht is geweest.

Om aan te tonen dat ook de andere nitrofuranen weefselgebonden residuen vormen is daarnaast een beperkt in-vitro onderzoek uitgevoerd, waarbij microsomen zijn geïncubeerd met de verschillende nitrofuranen. In hoofdstuk 4 wordt hierop verder ingegaan.

## 2. Methoden

### 2.1 Dierexperimentele studie

70 eendagskuikens zijn op stro geplaatst en onderverdeeld in 2 groepen van 30 (groep 1 en 2) en 1 groep van 10 (groep 4) dieren. Na een periode van 14 dagen, waarbij de dieren niet-gemedicineerd startvoer kregen, kregen de dieren in groep 1 gedurende 7 dagen voer waaraan furazolidon in een concentratie van 200 mg/kg was toegevoegd, de dieren in groep 2 voer waaraan furaltadon in een concentratie van 200 mg/kg was toegevoegd. Het gemedicineerde voer is bereid bij Research Diet Services in Wijk bij Duurstede. Groep 4 diende als blanco groep. Deze groep kreeg continu niet-gemedicineerd voer toegediend. Het gemedicineerde voer werd bij groepen 1 en 2 na 7 dagen vervangen door niet-gemedicineerd voer, waarna op dag 0, 3, 7, 14 en 21 na het stopzetten van de medicatie steeds 6 dieren van groep 1 en 2 werden geslacht. De blanco dieren (groep 4) zijn geslacht op dag 21 na het stopzetten van de medicatie. In tabel 1.1 is het werkschema van het dierexperimentele onderzoek weergegeven. Het protocol met de DEC-aanvraag is te vinden in bijlage 2.

Van elk dier is vlees, lever, nier, bloed en gal bemonsterd. De monsters zijn direct na de slacht op droogijs vervoerd naar het RIKILT en daar opgeslagen bij  $<-70^{\circ}\text{C}$  totdat analyse plaatsvond. Daarnaast is ook het voer bemonsterd om het gehalte te controleren.

De monsters werden geanalyseerd op de aanwezigheid van furazolidon en furaltadon (voor de beschrijving van de analysemethode zie paragrafen 2.2.1 en 2.2.2), het totale residu aan metabolieten van nitrofuranen, het residu aan vrije metabolieten en/of het residu aan weefselgebonden metabolieten van nitrofuranen (voor de beschrijving van de analysemethode zie paragraaf 2.2.3).

#### 2.1.1 Berekening halfwaardetijd

De halfwaardetijd ( $T_{1/2}$ ) is berekend met de formule:  $\ln(2)/\beta$ , waarbij  $\beta$  staat voor de helling van het lineaire verband tussen de natuurlijke logaritme van de gemiddelde concentratie aan AOZ of AMOZ per slachttijdstip uitgezet tegen de tijd in dagen. Hierbij is het gemiddelde gehalte gecorrigeerd voor de gemiddelde groei per dag van dag 0 tot dag 21 (groep 1 101,2 gram/dier/dag; groep 2 94,7 gram/dier/dag; zie ook tabel 1.2).

### 2.2 Analysemethoden

#### 2.2.1 Analyse op de aanwezigheid van furazolidon en furaltadon in voer

Furazolidon en furaltadon werden uit het gehomogeniseerde monster geëxtraheerd met een mengsel van methanol en acetonitril (1:3 (v/v)). Na centrifugeren (3500 rpm; 10 minuten) werd een deel van het extract over een geconditioneerde aluminiumoxide kolom gebracht. Het eluaat werd voorzichtig ingedampt, waarna het residu werd opgenomen in een mengsel van 0,1% ammoniakoplossing en acetonitril (9/1 (v/v)). Na filtratie over een 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filter is het verkregen extract gereed voor analyse. Chromatografische scheiding vond plaats op een Waters Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> kolom (150 x 3,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) met behulp van een water-acetonitril gradiënt waaraan 0,1% azijnzuur is toegevoegd. Detectie en identificatie van furazolidon en furaltadon vond plaats met behulp van een massaspectrometer voorzien van een ESI interface. Hierbij worden structuurgerelateerde product ionen van het geprotoneerde molecuul ion van furazolidon en furaltadon gemeten.

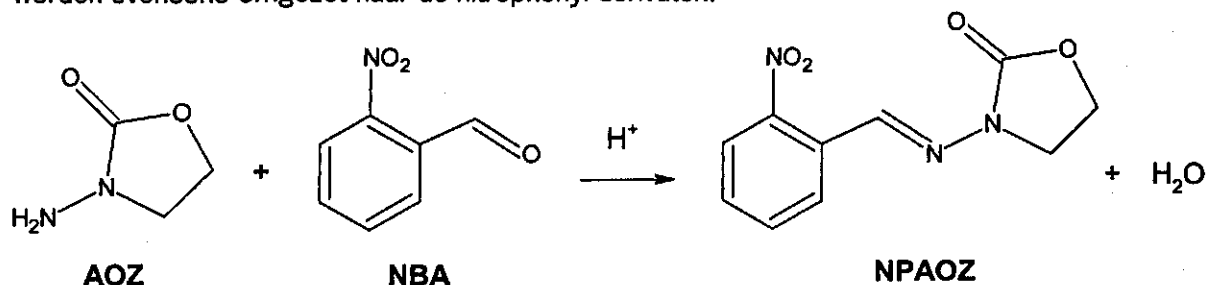
#### 2.2.2 Analyse op de aanwezigheid van furazolidon en furaltadon in weefsels en bloed

Furazolidon en furaltadon zijn uit het gehomogeniseerde monster geëxtraheerd met ethylacetaat. Na centrifugeren (3500 rpm; 10 minuten) is de ethylacetaat-fractie voorzichtig ingedampt (onder N<sub>2</sub> bij 45°C), waarna het residu is opgenomen in een mengsel van acetonitril en 0,1% azijnzuur (1/9 (v/v)). Na filtratie over een 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE filter was het verkregen extract gereed voor analyse. Chromatografische scheiding vond plaats op een Waters Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> kolom (150 x

3.0 mm, 5  $\mu$ m) met behulp van een water-acetonitril gradiënt waaraan 0,1% azijnzuur is toegevoegd. Detectie en identificatie van furazolidon en furaltadon vond plaats met behulp van een massaspectrometer voorzien van een ESI interface. Hierbij worden structuurgerelateerde product ionen van het geprotoneerde molecuul ion van furazolidon en furaltadon gemeten.

### 2.2.3 Analyse op de aanwezigheid van metabolieten van nitrofuranen

Er is een specifieke methode ontwikkeld voor de analyse van weefselgebonden metabolieten van nitrofuranen. Deze methode is zeer specifiek omdat er gebruik wordt gemaakt van de zuurgevoeligheid van de C=N band. Residuen van de metabolieten van de nitrofuranen worden met behulp van zure hydrolyse met behulp van 0,2 M HCl (16 uur bij 37°C) van de imine verbinding van het eiwit losgemaakt (zie ook figuur 2). Tegelijkertijd worden de aldus gevormde marker metabolieten met 2-nitrobenzaldehyde (NBA) omgezet in de overeenkomstige nitrophenyl (NP) derivaten NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD en NPSEM. Door toevoegen van 2-nitrobenzaldehyde vindt er condensatie van de aldehyde met de primaire amino groep van de vrijgekomen metabolieten plaats waarbij een aromatische imine verbinding wordt gevormd. In figuur 7 wordt de reactievergelijking van genoemde derivatisering gegeven voor AOZ. Voor de andere metabolieten van de desbetreffende nitrofuranen verloopt de reactie vergelijkbaar. Aanwezige vrije residuen worden eveneens omgezet naar de nitrophenyl derivaten.



*Figuur 7: Reactievergelijking van de derivatisering met NBA van AOZ.*

Na afkoelen van het monster is 0,3 M trinitiumfosfaat-oplossing toegevoegd en verder geneutraliseerd met behulp van 2 M NaOH. Vervolgens is het monster tweemaal geëxtraheerd met ethylacetaat (p.a. kwaliteit). De gecombineerde ethylacetaat lagen zijn ingedampd (onder N<sub>2</sub> bij 45°C), waarna het residu is opgenomen in een mengsel van acetonitril en 0,1% azijnzuur (1/9 (v/v)). Na filtratie over een 0,45  $\mu$ m PTFE filter was het extract gereed voor analyse. Chromatografische scheiding vond plaats op een Waters Symmetry® C<sub>18</sub> kolom (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m) met behulp van een water-acetonitril gradiënt waaraan 0,1% azijnzuur is toegevoegd. Detectie en identificatie van de nitrophenyl derivaten vindt plaats met behulp van een massaspectrometer voorzien van een ESI interface. Hierbij worden structuurgerelateerde product ionen van het geprotoneerde molecuul ion van NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD en NPSEM gemeten. De methode waarbij het totale residu aan metabolieten wordt bepaald is schematisch weergegeven in bijlage 4.

Om onderscheid te maken tussen het residu aan vrije metabolieten en het residu aan weefselgebonden metabolieten kan dezelfde procedure worden gevolgd voorafgegaan door een uitgebreide wasprocedure. Hierbij wordt het monster achtereenvolgens gewassen met ethylacetaat (p.a. kwaliteit; 2x; fractie A), water (Milli-Q; 2x; fracties B1 en B2) en methanol (p.a. kwaliteit; fractie C). De hierbij verkregen fracties en het overgebleven pellet (fractie D) worden vervolgens geanalyseerd volgens de hierboven beschreven methode.

### 2.3 In-vitro onderzoek

Om het metabolisme in het dier na te bootsen, waarbij zonder het gebruik van dieren representatieve monsters verkregen kunnen worden waarin residuen van metabolieten van nitrofuranen aanwezig zijn, is gebruik gemaakt van het incuberen van microsomen, verkregen uit levers van hanen en hennen, met de verschillende nitrofuranen.

#### 2.3.1 Verkrijgen microsomen

Direct na de slacht zijn de levers gespoeld en opgeslagen in een oplossing van fysiologisch zout en op droogijs vervoerd naar het RIKILT. Hier is de lever in een oplossing van 1,15% KCl onder stikstof gehomogeniseerd en gecentrifugeerd bij 9000 g en 4°C. Het supernatant (S9 fractie) is vervolgens gecentrifugeerd bij 105.000 g en 4°C, het pellet is opnieuw gehomogeniseerd en nogmaals gecentrifugeerd bij 105.000 g en 4°C. Het hierbij verkregen microsomale pellet is geresuspendeerd in een fosfaatbuffer (0,1N, pH 7,4) en opgeslagen in vloeibare stikstof.

#### 2.3.2 Bepaling eiwitgehalte

Voor de bepaling van het eiwitgehalte in de microsomen is gebruik gemaakt van de BCA Protein Assay Reagent Kit van Pierce. Bij deze assay wordt  $\text{Cu}^{2+}$  door het eiwit in een basisch milieu gereduceerd tot  $\text{Cu}^{1+}$ . Dit ion vormt daarna een complex met Bicinchoninic Acid (BCA) wat zichtbaar is aan de specifieke kleurreactie (paars). Colorometrische bepaling bij 562 nm wordt gebruikt voor de bepaling van het eiwitgehalte.

#### 2.3.3 Incubatie van microsomen met nitrofuranen

Aan de microsomen is een fosfaatbuffer (0,2N, pH 7,4), magnesiumchloride (8,0 mmol/l), en NADPH (20 mmol/l) toegevoegd. Na een pre-incubatie van 2 minuten bij 37°C is de te testen component toegevoegd en gedurende 6 minuten geïncubeerd bij 37°C. De reactie wordt gestopt door het toevoegen van ijskoude methanol.

De verkregen monsters zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van metabolieten van nitrofuranen zoals beschreven in paragraaf 2.2.3.

### 2.4 Statistiek

Om te bepalen of er verschil bestaat tussen de resultaten op de verschillende slachtmomenten wordt er gebruik gemaakt van variantie-analyse met één factor, oftewel de unifactoriele variantie-analyse (ANOVA single factor). Met deze toets wordt de hypothese dat gemiddelden van verschillende steekproeven gelijk zijn getoetst. Dit is hetzelfde principe als de t-toets, met het verschil dat bij de t-toets slechts 2 groepen worden onderscheiden en bij variantie-analyse 3 of meer groepen. Met behulp van deze functie in Excel kan meteen worden bepaald of de te testen groepen (oftewel resultaten op de verschillende slachtmomenten) of alle slachtmomenten tot één populatie behoren, en dat de hypothese dus klopt, of dat er meerdere populaties zijn en welke groep dan hiervan de oorzaak is.

Bij de ANOVA single factor analyse wordt de zogenaamde F-waarde bepaald met behulp van de volgende formule:

$$\text{F-waarde} = \frac{\text{Gemiddelde kwadratensom tussen de groepen}}{\text{Gemiddelde kwadratensom binnen de groepen}}$$

Door de berekende F-waarde te vergelijken met de theoretische waarde kan worden gesteld of de verschillende groepen tot één populatie behoren ( $\text{F-waarde}_{\text{berekend}} < \text{F-waarde}_{\text{theoretisch}}$ ) of juist niet ( $\text{F-waarde}_{\text{berekend}} > \text{F-waarde}_{\text{theoretisch}}$ ). Door vergelijking van de verschillende gemiddelden van de groepen kan in het geval dat er geen sprake is van één populatie worden bepaald welke groep er buiten valt. Dit wordt gecontroleerd door nogmaals de toets uit te voeren zonder de groep welke afwijkt.

### 3. Resultaten

#### 3.1 Dierexperimentele studie

##### 3.1.1 Furazolidon en furaltadon in voer

De resultaten van de analyse op furazolidon en furaltadon in de voermonsters zijn weergegeven in tabel 1.3. Een samenvatting hiervan is in onderstaande tabel weergegeven.

*Tabel 1: Gemiddelde gehalten furazolidon en furaltadon in voer in mg/kg.*

Monster	Furazolidon	Furaltadon
Blanco startvoer	<0,005	<0,001
Groeivoer met furazolidon	185	0,002
Groeivoer met furaltadon	0,26	202
Blanco groeivoer	0,005	0,005

Het streven was om de dieren voer te geven waaraan furazolidon of furaltadon met een gehalte van 200 mg/kg was toegevoegd, omdat dit in het verleden een gebruikelijk niveau van gemedicineerd voer was. Uiteindelijk is er furazolidon toegediend op een gemiddeld niveau van 185 mg/kg voer en furaltadon op 202 mg/kg. Wordt gekeken hoeveel de dieren nu eigenlijk hebben gegeten en wat het gewicht van de dieren in de verschillende groepen was, dan kan worden geconcludeerd dat de dieren in groep 1 gemiddeld een gehalte van 23,1 mg furazolidon/kg dier hebben ingenomen en de dieren in groep 2 gemiddeld een gehalte van 23,7 mg furaltadon/kg dier (zie tabellen 1.4 en 1.5). De gemiddelde inname aan furazolidon verschilt 2,9% met de gemiddelde inname van furaltadon. Gezien de fouten in de meting van het gehalte, de weging van de dieren en de voerinname kan worden gesteld dat de gemiddelde inname van furazolidon en furaltadon vergelijkbaar is geweest.

##### 3.1.2 Furazolidon en furaltadon in vlees, lever, nier, gal en bloed

De resultaten van de analyse op furazolidon en furaltadon in vlees, lever, nier, gal en bloed zijn te vinden in tabellen 2.1 en 2.2. Samenvattingen hiervan worden in tabel 2 (furazolidon) en 3 (furaltadon) weergegeven.

*Tabel 2: Gemiddelde gehalten (n=3) furazolidon in µg/kg in vlees, lever, nier, gal en bloed van mestkuijken na toediening van 185 mg/kg furazolidon in voer gedurende 7 dagen.*

Tijd na toediening (dagen)	0	3	7	14	21
Vlees	<5	<5	<5	<5	<5
Lever	<5	<5	<5	<5	<5
Nier	<5	<5	<5	<5	<5
Gal	265	<5	<5	<5	<5
Bloed	502	<5	<5	<5	<5



Tabel 3: Gemiddelde gehalten (n=3) furaltadon in µg/kg in vlees, lever, nier, gal en bloed van mestkuijens na toediening van 202 mg/kg furaltadon in voer gedurende 7 dagen.

Tijd na toediening (dagen)	0	3	7	14	21
Vlees	8,8	<5	<5	<5	<5
Lever	<5	<5	<5	<5	<5
Nier	<5	<5	<5	<5	<5
Gal	3294	<5*	<5	<5	<5
Bloed	2077	<5	<5	<5	<5

\* in 1 monster kon nog 12 µg/kg furaltadon worden aangetoond

Uit de resultaten blijkt dat zowel furazolidon als furaltadon zeer snel niet meer zijn aan te tonen in dierlijke matrices. Beide componenten worden nog wel in hoge concentraties in gal en bloed aangetroffen direct na het stopzetten van de toediening, maar op dag 3 is furazolidon niet meer aan te tonen en in maar 1 monster gal kon nog een spoor aan furaltadon (12 µg/kg) worden aangetoond. In het grootste deel van de vlees, lever en niermonsters konden ondanks een zo kort mogelijke opslag bij <-70°C geen "parent compounds" worden aangetoond. Een uitzondering hierop is furaltadon. Lage concentraties (3 – 12 µg/kg) konden op dag 0 in het vlees worden aangetoond.

### 3.1.3 AOZ en AMOZ in vlees, lever, nier, gal en bloed

De resultaten van de analyse op het totale residu aan AOZ en AMOZ in vlees, lever, nier, gal en bloed zijn te vinden in tabellen 2.3 en 2.4. Samenvattingen hiervan worden in tabel 4 (AOZ) en 5 (AMOZ) weergegeven.

Tabel 4: Gemiddelde gehalten totaal AOZ in µg/kg in vlees (n=6), lever (n=6), nier (n=3; dag 14 en 21 n=2)), gal (n=2) en bloed (n=3; dag 14 en 21 n=1) van mestkuijens na toediening van 185 mg/kg furazolidon in voer gedurende 7 dagen.

Tijd na toediening (dagen)	0	3	7	14	21
Vlees	580	160	75	41	15
Lever	1598	424	128	46	18
Nier	2333	392	151	34	12
Gal	16182	553	76	.	.
Bloed	825	217	110	48	15

\* niet geanalyseerd wegens analytische problemen

Tabel 5: Gemiddelde gehalten totaal AMOZ in µg/kg in vlees (n=6), lever (n=6), nier (n=3; dag 14 en 21 n=2)), gal (n=2) en bloed (n=3; dag 14 en 21 n=1) van mestkuijens na toediening van 202 mg/kg furaltadon in voer gedurende 7 dagen.

Tijd na toediening (dagen)	0	3	7	14	21
Vlees	1201	322	134	95	36
Lever	6220	2025	322	198	101
Nier	6697	1038	331	122	34
Gal	41201	999	244	.	.
Bloed	2236	414	228	124	46

\* niet geanalyseerd wegens analytische problemen

Naast het totale gehalte aan AOZ en AMOZ is er ook een onderscheid gemaakt tussen het gehalte aan weefselgebonden residuen en het gehalte aan de zogeheten "vrije" residuen aan AOZ en AMOZ. De resultaten hiervan zijn te vinden in tabel 2.5 en 2.6. Samenvattingen hiervan zijn in tabel 6 (AOZ) en 7 (AMOZ) weergegeven. Wegens analytische problemen is het percentage weefselgebonden residu in gal niet bepaald.

*Tabel 6: Gemiddelde percentages weefselgebonden AOZ in vlees (n=3), lever (n=3), nier (n=2) en bloed (n=3) van mestkuijens na toediening van 185 mg/kg furazolidon in voer gedurende 7 dagen.*

Tijd na toediening (dagen)	0	3	7	14	21
Vlees	59,4	76,7	81,3	76,7	77,1
Lever	47,9	63,0	60,5	55,0	62,0
Nier	31,8	63,3	74,1	57,7	53,5
Bloed	0,2	27,9	26,4	32,7	14,5

*Tabel 7: Gemiddelde percentages weefselgebonden AMOZ in vlees (n=3), lever (n=3; dag 7 en 14 n=2), nier (n=2) en bloed (n=3) van mestkuijens na toediening van 202 mg/kg furaltadon in voer gedurende 7 dagen.*

Tijd na toediening (dagen)	0	3	7	14	21
Vlees	65,0	81,3	82,6	81,0	79,3
Lever	45,0	57,8	47,5	50,7	48,0
Nier	27,9	64,8	69,7	69,8	51,2
Bloed	0,3	26,1	24,0	25,4	21,0

### 3.2 In-vitro onderzoek

#### 3.2.1 Bepaling eiwitgehalte microsomen

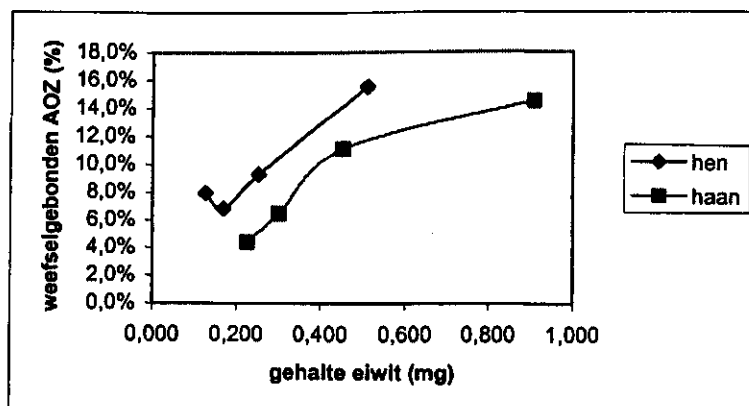
De resultaten van de bepaling van het eiwitgehalte van de verkregen microsomen zijn te vinden in tabel 3.1. een samenvatting hiervan is weergegeven in tabel 8.

Tabel 8: Gemiddelde eiwitgehalten (n=4) in microsomen verkregen uit levers van hanen en hennen in µg/ml microsomen.

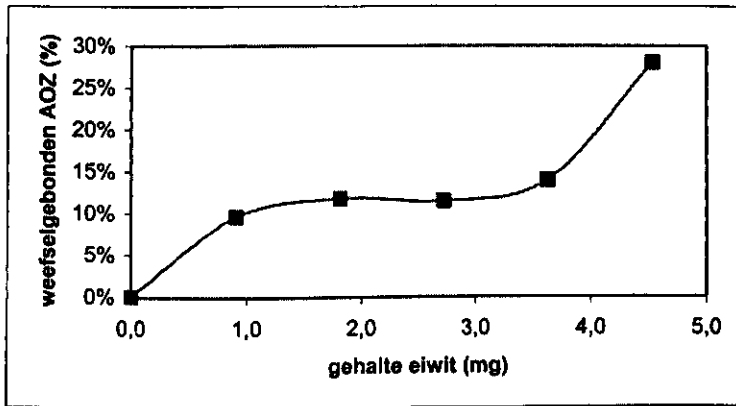
Haan	Hen
9082	5093

#### 3.2.2 Incubatie van microsomen met nitrofuranen

Voordat de microsomen geïncubeerd konden worden met de verschillende nitrofuranen is eerst bepaald of er uitgegaan diende te worden van hoeveel mg eiwit in bewerking moest worden genomen. Hiervoor is uitgegaan van incubatie met 16,5 µg furazolidon. Na incubatie met furazolidon is het weefselgebonden residu aan AOZ bepaald met behulp van de methode beschreven in paragraaf 2.2.3. In figuur 8 is het resultaat hiervan weergegeven. Er blijkt dat hoe meer eiwit aanwezig is des te meer weefselgebonden AOZ wordt gevormd. Hoewel het eiwit aanwezig in de microsomen van hennen procentueel meer residuen lijkt te geven is er voor gekozen de verdere experimenten met microsomen van hanen uit te voeren aangezien deze meer eiwit bevatten. Met deze microsomen zijn dan ook verdere optimalisatie experimenten uitgevoerd. Ook deze resultaten leverden dezelfde conclusie op namelijk hoe meer eiwit aanwezig is des te meer weefselgebonden AOZ wordt gevormd (zie figuur 9). Omdat de voorraad microsomen niet onbeperkt is en het incuberen van 500 µl microsomen de vorming van een goed meetbare hoeveelheid weefselgebonden AOZ oplevert zijn verdere experimenten uitgevoerd met 500 µl microsomen van hanen, oftewel 4,5 mg eiwit.



Figuur 8: Gevormd weefselgebonden AOZ uitgedrukt als percentage van het totaal gevormde AOZ na incubatie van microsomen met 16,5 µg furazolidon.



*Figuur 9: Gevormd weefselgebonden AOZ uitgedrukt als percentage van het totaal gevormde AOZ na incubatie van microsomen van hanen met 16,5 µg furazolidon.*

Nadat de hoeveelheid te incuberen eiwit was vastgesteld zijn verdere experimenten met de nitrofuranen en de metabolieten van de nitrofuranen uitgevoerd om op deze manier vast te stellen of er überhaupt weefselgebonden residuen kunnen ontstaan in pluimvee. Met de eerste test is dit al waargenomen voor furazolidon, maar de vraag is of dit ook geldt voor de andere nitrofuranen welke voor de controle op pluimvee van belang zijn, te weten furaltadon, nitrofurantoin en nitrofurazon. De resultaten van de incubatie van microsomen met deze componenten alsmede met de metabolieten AOZ, AMOZ, AHD en SEM zijn weergegeven in tabel 3.2 en zijn samengevat in tabel 9.

*Tabel 9: Gevormd percentage weefselgebonden metabolieten na incubatie van microsomen.*

Toegevoegd Gevormd metaboliet* % weefselgebonden		
Furazolidon	Eiwit-AOZ	5,4%
Furaltadon	Eiwit-AMOZ	4,2%
Nitrofurantoin	Eiwit-AHD	4,1%
Nitrofurazon	Eiwit-SEM	5,4%
AOZ	Eiwit-AOZ	1,3%
AMOZ	Eiwit-AMOZ	1,4%
AHD	Eiwit-AHD	2,1%
SEM	Eiwit-SEM	1,3%

\* bepaald via de weer vrij gemaakte zijketen

## 4. Discussie

### 4.1 Dierexperimentele studie

#### 4.1.1 Furazolidon en furaltadon

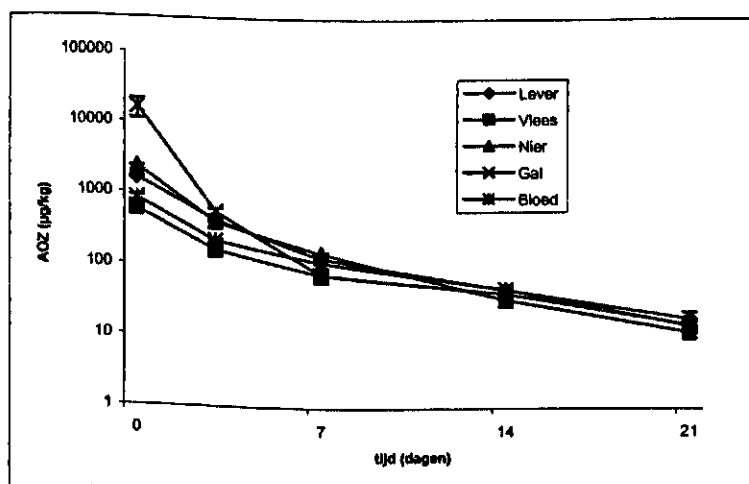
Uit de resultaten van de analyse op furazolidon en furaltadon blijkt dat al op dag 0 geen residuen meer zijn aan te tonen in lever en nier. Alleen bij vlees is na toediening van furaltadon op dag 0 een lage residuen furaltadon aan te tonen (3 – 12 µg/kg).

Voor furazolidon en furaltadon is het onmogelijk om de  $T_{1/2}$  te berekenen en ook niet van belang, aangezien deze componenten alleen in op slachttijdstip I in gal en bloed worden aangetroffen. Klaarblijkelijk is de  $T_{1/2}$  voor furazolidon en furaltadon dus uitermate kort.

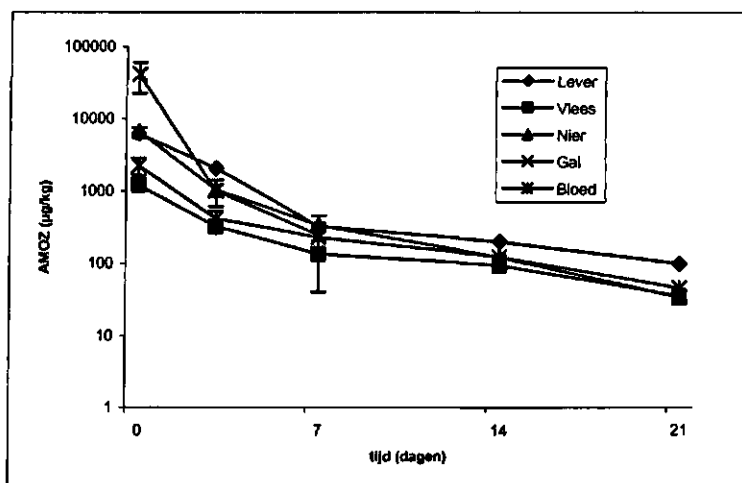
Het feit dat de "parent compounds" zeer snel na toediening niet meer zijn te traceren in het dier komt overeen met de gegevens die bekend zijn voor het voorkomen van nitrofuranen in varkens, zoals Vroomen *et al.* (1986), Hoogenboom *et al.* (1992), McCracken *et al.* (1995) en Polman *et al.* (1994) hebben laten zien. Evenals in varkens worden furazolidon en furaltadon dus zeer snel gemetaboliseerd in mestkuijken.

#### 4.1.2 Totaal residu aan AOZ en AMOZ

Met behulp van het totaal gehalte van de metabolieten, oftewel weefselgebonden en vrij metaboliet werd de uitscheiding van AOZ en AMOZ in mestkuijken bestudeerd. In figuur 10 en 11 zijn de uitscheidingscurves van respectievelijk AOZ en AMOZ in de verschillende matrices weergegeven. Alle resultaten laten een identiek verloop zien, namelijk een hoog gehalte aan AOZ en AMOZ op dag 0 en een relatief langzame afname in de loop van de tijd, zeker in vergelijking met de "parent compounds". Gemiddeld wordt er in vlees, lever, nier en bloed na 21 dagen na het stopzetten van de toediening respectievelijk 15, 18, 12 en 15 µg/kg aan AOZ aangetoond en 36, 101, 34 en 46 µg/kg AMOZ.



Figuur 10: Uitscheidingsprofiel van het totale residu aan AOZ in vlees, lever, nier, gal en bloed op verschillende tijdstippen na het stopzetten van de toediening.



Figuur 11: Uitscheidingsprofiel van het totale residu aan AMOZ in vlees, lever, nier, gal en bloed op verschillende tijdstippen na het stopzetten van de toediening.

Opvallend is dat het gehalte aan AMOZ over het hele tijdsgebied hoger is dan het gehalte aan AOZ. Dit kan worden veroorzaakt door:

- Furaltadon metaboliseert naast AMOZ tot minder verschillende metabolieten dan furazolidon.
- Een groter percentage van furaltadon wordt gemetaboliseerd terwijl een groter percentage van furazolidon direct wordt uitgescheiden.

Om een antwoord te kunnen geven op de oorzaak is verder dierexperimenteel onderzoek nodig waarbij ook de uitscheiding van de "parent compounds" en de metabolieten in de urine en feces wordt bekeken. Er zijn wel data bekend van de uitscheiding van furazolidon in urine van varkens, maar er is geen vergelijkingsmateriaal voor furaltadon en mestkuikens.

Daarnaast laten de gegevens zien dat het gehalte aan zowel AOZ als AMOZ op dag 0 in gal het hoogst is, daarna volgen nier, lever, bloed en vlees.

De afname van het gehalte AOZ en AMOZ wordt deels veroorzaakt door een toename in gewicht van de dieren. Het gemiddelde gewicht van de dieren op slachtmoment I lag op ongeveer 1 kg en op slachtmoment V op ongeveer 3 kg. De verdunningsfactor veroorzaakt door het toenemen van het gewicht met een factor 3 is echter niet zodanig groot dat dit een verklaring kan zijn voor de afname van het gehalte in het dier in de loop van de tijd. Voor het bepalen van de halfwaardetijden is het echter wel van belang.

De halfwaardetijden van AOZ en AMOZ in de verschillende matrices zijn te vinden in tabellen 10 en 11.

Tabel 10: Halfwaardetijden voor AOZ in verschillende matrices van mestkuikens na toediening van 185 mg/kg furazolidon gedurende 7 dagen.

Dagen na stopzetten toediening	0 - 21	0 - 7	7 - 21
Lever	4½	2½	7
Vlees	6½	3¼	9½
Nier	3¾	2¼	5
Gal	*	1	*
Bloed	5½	3¼	6¾

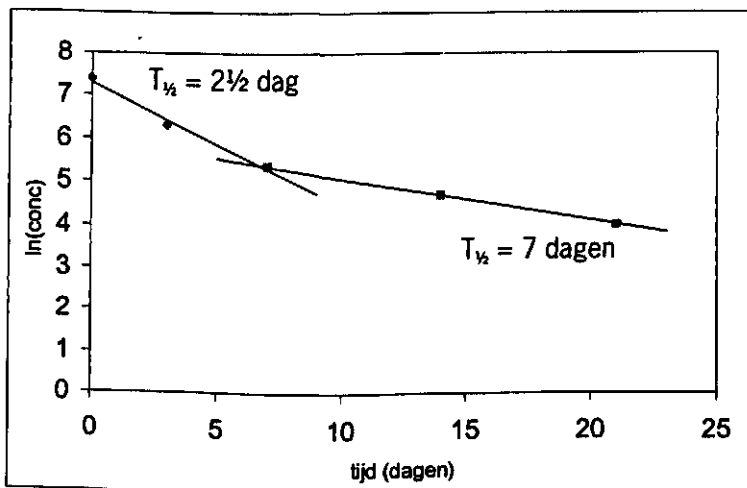
\* door analytische problemen niet bepaald

Tabel 11: Halfwaardetijden voor AMOZ in verschillende matrices van mestkuikens na toediening van 202 mg/kg furaltadon gedurende 7 dagen.

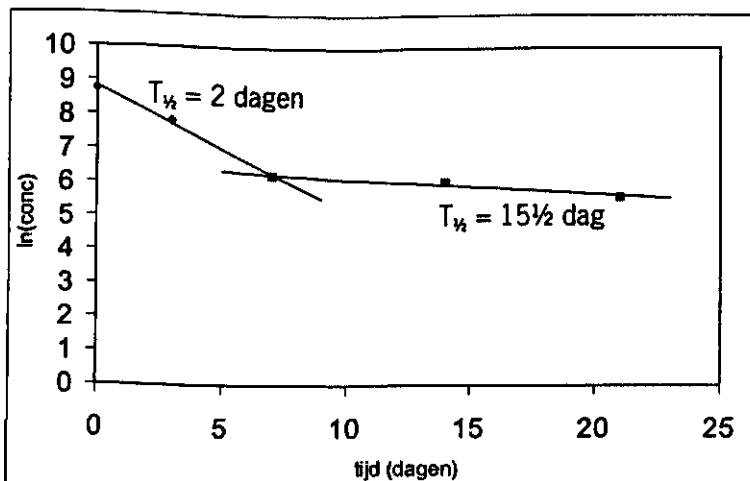
Dagen na stopzetten toediening	0 - 21	0 - 7	7 - 21
Lever	5	2	15½
Vlees	7	3	12½
Nier	4	2	5½
Gal	*	1	*
Bloed	6	2¾	9¾

\* door analytische problemen niet bepaald

Als eerste valt op dat de halfwaardetijden van AMOZ voor alle matrices net iets hoger zijn dan de halfwaardetijden voor AOZ. Daarnaast is er een verschil in afnamesnelheid te zien gedurende de eerste dagen na het stopzetten van de medicatie in vergelijking met de latere dagen. In figuren 12 en 13 is dit weergegeven voor respectievelijk AOZ en AMOZ in lever door een lineair verband voor de periode 0-7 dagen en voor de periode 7 tot 21 dagen grafisch weer te geven. Lever is hierbij als voorbeeld gebruikt, hetzelfde fenomeen kan worden waargenomen voor de andere matrices. Hierbij is de natuurlijke logaritme van het gemiddelde gehalte aan AOZ in lever uitgezet tegen het tijdstip na stoppen van toedienen. De  $T_{1/2}$  van dag 0 tot 7 (2½ dag voor AOZ en 2 dagen voor AMOZ) is duidelijk lager dan tijdens periode van dag 7 tot dag 21 (7 dagen voor AOZ en 15½ dag voor AMOZ).



Figuur 12:  $T_{1/2}$  van AOZ in lever



Figuur 13:  $T_{1/2}$  van AMOZ in lever

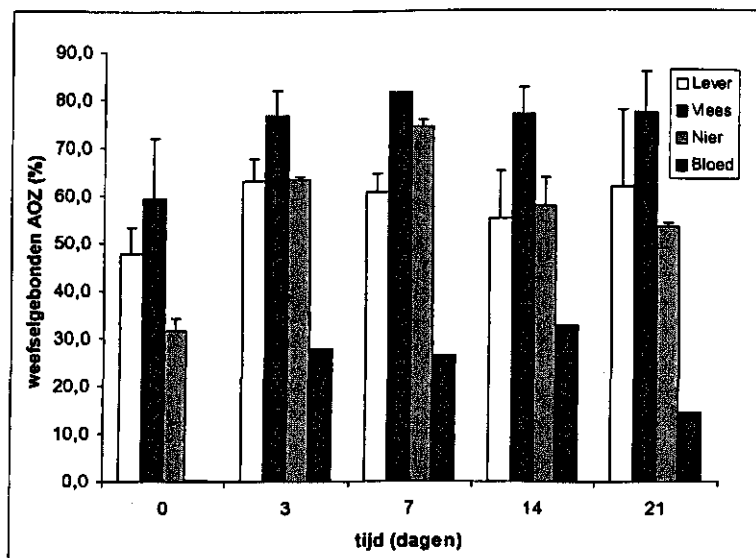
Als we de  $T_{1/2}$  van bijvoorbeeld doxycycline bekijken dan zien we dat hier de  $T_{1/2}$  voor lever, vlees en nier respectievelijk 2, 4 en 6 dagen is. Deze  $T_{1/2}$  is bepaald in een studie waarbij mestkuijken gedurende een periode van 4 dagen 20 mg doxycycline/kg/dag via het drinkwater kregen toegediend en de dieren werden geslacht 2, 3, 4, 5 en 8 dagen na stopzetten van toediening (Zuidema et al. 2000). Hoewel de vergelijking moeilijk te maken is aangezien de manier van toediening (gemedicineerd drinkwater t.o.v. gemedicineerd voer), de duur van de toediening (4 dagen t.o.v. 7 dagen) en de slachttijdstippen (2, 3, 4, 5 en 8 dagen t.o.v. 0, 3, 7, 14 en 21 dagen) afwijken is ter illustratie in tabel 12 de vergelijking gemaakt tussen halfwaardetijden van de in dit rapport beschreven studie en de studie van doxycycline in mestkuijken.

*Tabel 12: Halfwaardetijden voor AOZ (berekend over de periode 3 – 7 en 3 – 14 dagen na stopzetten van toediening) en doxycycline (berekend over de periode 2 – 8 dagen na stopzetten van toediening) in verschillende matrices van mestkuijken.*

	AOZ		Doxycycline
	3-7	3-14	2-8
Lever	3	5	2
Vlees	5½	10¼	4
Nier	4	4¼	6

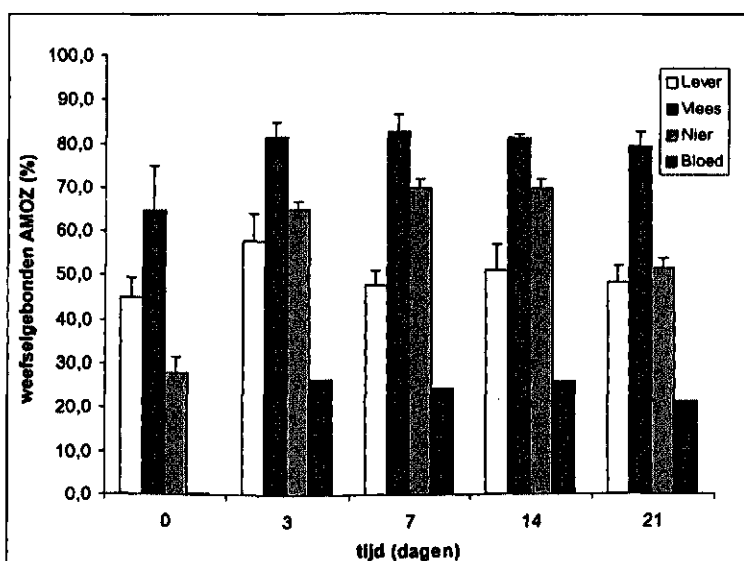
#### 4.1.3 Weefselgebonden residu aan AOZ en AMOZ

Het totaal gehalte aan residuen kan worden opgesplitst in een gehalte aan vrije metabolieten en een gehalte aan weefselgebonden residuen. In figuren 14 en 15 is het gemiddelde percentage aan weefselgebonden AOZ en AMOZ in lever, vlees, nier en bloed weergegeven. Voor bloed is dit percentage per slachtgroep in enkelvoud bepaald, omdat er maar geen monsters meer beschikbaar waren.



*Figuur 14: Percentage weefselgebonden AOZ t.o.v. het totale residu in lever, vlees en nier op verschillende tijdstippen na het stopzetten van de toediening.*





Figuur 15: Percentage weefselgebonden AMOZ t.o.v. het totale residu in lever, vlees en nier op verschillende tijdstippen na het stopzetten van de toediening.

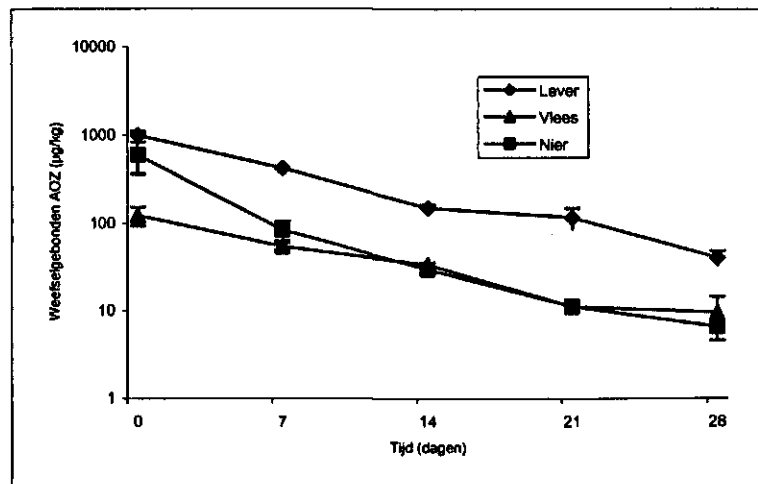
Wordt de verhouding tussen de vrije metabolieten en de weefselgebonden metabolieten in de loop van de tijd bekeken dan zien we dat zowel voor AOZ als voor AMOZ het percentage in de lever per slachtmoment niet significant afwijkt. Toetsing met behulp van de ANOVA single factor (zie paragraaf 2.4) laat zien dat het percentage aan weefselgebonden AOZ in vlees op dag 0 afwijkt van het percentage weefselgebonden AOZ op dag 3, 7, 14 en 21. Ditzelfde geldt voor het percentage weefselgebonden AMOZ in vlees. Voor nier geldt zowel voor weefselgebonden AOZ als voor weefselgebonden AMOZ dat er meerdere groepen afwijken. Uit de ANOVA toets blijkt dat voor nier dag 0 en dag 7 voor weefselgebonden AOZ afwijken en dag 0 en dag 21 voor weefselgebonden AMOZ.

Een lager percentage weefselgebonden residu op dag 0 is conform de verwachting aangezien het toedienen van furazolidon en furaltadon net voor de slacht is stopgezet en er naar verwachting nog de meeste vrije metabolieten aanwezig zijn. Deze worden vervolgens of snel uitgescheiden of vormen alsnog weefselgebonden residuen en ontstaat er dus een evenwicht.

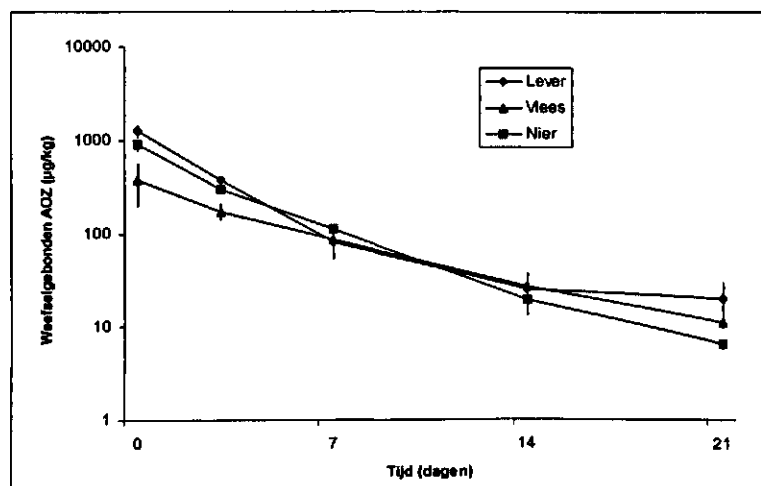
Verder kan worden opgemerkt dat het percentage weefselgebonden metaboliet (zowel AOZ als AMOZ) voor elke matrix verschillend is, het hoogste percentage weefselgebonden residu wordt gevonden in vlees en daarna in respectievelijk nier, lever en bloed. Dat het percentage weefselgebonden residu in bloed het laagst is, kon ook worden verwacht aangezien bloed in verhouding het laagste gehalte aan eiwit heeft. Het percentage weefselgebonden residu is aan de resultaten te zien niet afhankelijk van het gehalte aan totaal residu, aangezien het totale residu in nier hoger is dan in lever en in lever hoger is dan in vlees. Waarschijnlijk is het soort eiwit voornamelijk van belang. Vroomen (1986) heeft bijvoorbeeld laten zien dat bij in-vitro experimenten, waarbij de afzonderlijke aminozuren zijn toegevoegd alleen cysteïne een negatief effect heeft op de vorming van weefselgebonden residuen. Hieruit zou kunnen worden geconcludeerd dat het metaboliet voornamelijk bindt aan thiol groepen, echter de gevormde metabolieten lijken zeer instabiel dus harde bewijzen zijn hier niet voor.

Een ander opvallende waarneming is dat het percentage weefselgebonden AOZ in lever over het hele tijdsgebied hoger is dan het percentage weefselgebonden AMOZ in lever, terwijl het voor vlees vergelijkbaar is (statistisch getoetst). Dit terwijl het totale gehalte aan AMOZ in lever zoals eerder vermeld over het hele tijdsgebied hoger is dan het totale gehalte aan AOZ in lever. Dit zou betekenen dat ook al is er in vergelijking met AOZ meer AMOZ voorhanden om aan het weefsel te binden, AOZ (of furazolidon) eerder bindt aan het weefsel in de lever dan AMOZ (of furaltadon).

Uit een dierstudie waarbij 10 varkens (12 weken oud) gedurende 7 dagen voer waaraan furazolidon (300 mg/kg) was toegevoegd werden de uitscheidingsprofielen voor weefselgebonden AOZ in lever, vlees en nier bepaald (zie figuur 16; Hoogenboom *et al.* 1992).



*Figuur 16: Uitscheidingsprofiel van weefselgebonden AOZ in vlees, lever en nier van varkens op verschillende tijdstippen na het stopzetten van toediening van 300 mg/kg furazolidon.*



*Figuur 17: Uitscheidingsprofiel van weefselgebonden AOZ in vlees, lever en nier van mestkuikens op verschillende tijdstippen na het stopzetten van toediening van 185 mg/kg furazolidon.*

Vergelijken we het uitscheidingsprofiel van weefselgebonden AOZ in matrices van varkens (figuur 16) met het uitscheidingsprofiel van weefselgebonden AOZ in matrices van mestkuikens (figuur 17) dan valt op dat de gehalten aan weefselgebonden AOZ in lever van varkens over het hele tijdspad hoger zijn dan in vlees en nier van varken. Voor mestkuikens liggen de gehalten in de verschillende weefsels dicht bij elkaar. Het verloop van het gehalte aan weefselgebonden AOZ in varkensmatrices en kippenmatrices is wel vergelijkbaar, namelijk een hoog gehalte op dag 0 en een relatief langzame afname in de loop van de tijd.

In tabel 13 worden de resultaten verkregen uit de varkensstudie (Hoogenboom *et al.* (1992)) en de kippenstudie (dit rapport) naast elkaar gezet. Hierbij zijn de gehalten aan weefselgebonden AOZ gecorrigeerd voor groei van de dieren in de loop van de tijd. Om dit voor de varkens toe te passen is gebruik gemaakt van gegevens uit de literatuur (Berende 1997). Bij deze correctie is geen rekening gehouden met een eventueel verschil in groeisnelheid voor de verschillende weefsels.

*Tabel 13: Gemiddelde gehalten weefselgebonden AOZ in weefsels van varkens (na toediening van 300 mg/kg furazolidon gedurende 7 dagen) en mestkuijens (na toediening van 200 mg/kg furazolidon gedurende 7 dagen) in µg/kg gecorrigeerd voor lichaamsgewicht.*

Tijd na stopzetten toediening (dagen)	Vlees		Lever		Nier	
	Varken	Mestkuijens	Varken	Mestkuijens	Varken	Mestkuijens
0	124	375	993	1251	600	896
3		223		475		384
7	58	140	451	134	90	182
14	38	60	168	56	33	43
21	13	31	138	55	13	18
28	12		51		8,2	

Uit de tabel blijkt dat het gehalte aan weefselgebonden AOZ in de verschillende weefsels van mestkuijens op dag 0 hoger zijn dan de gehalten in matrices van varkens. Deze vergelijking kan echter niet zomaar worden gemaakt, aangezien de doseringen welke de mestkuijens en de varkens toegediend hebben gekregen niet vergelijkbaar zijn. Beter is het om de halfwaardetijden te vergelijken. In tabel 14 zijn de halfwaardetijden uit de 2 studies naast elkaar gezet.

*Tabel 14: Halfwaardetijden in dagen voor AOZ in verschillende matrices van varkens (na toediening van 300 mg/kg furazolidon gedurende 7 dagen) en mestkuijens (na toediening van 200 mg/kg furazolidon gedurende 7 dagen) berekend over de periode van 0 – 21 dagen na het stopzetten van de toediening.*

	Varken	Mestkuijens
Vlees	6¾	6
Lever	7	4¾
Nier	4	3¾

Uit de tabel blijkt dat de halfwaardetijd voor AOZ in weefsels van varkens hoger is dan de halfwaardetijd voor AOZ in weefsels van mestkuijens. Zoals al gezegd is er geen rekening gehouden met eventuele verschillen in groeisnelheid van de verschillende weefsels. Het is niet bekend of bijvoorbeeld een lever in verhouding sneller groeit dan bijvoorbeeld een nier bij zowel het varken als het mestkuijen. Het is dan ook de vraag of de verschillen in halfwaardetijden tussen de verschillende diersoorten hierdoor worden veroorzaakt of dat AOZ in varken werkelijk sneller wordt uitgescheiden dan in mestkuijens.

#### 4.1.4 Controle op gebruik van nitrofuranen

Zoals blijkt uit de resultaten van de analyse op furazolidon en furaltadon (paragraaf 3.1.2) kan controle op gebruik of misbruik evenals bij varkens ook bij mestkuijens niet worden toegespitst op de analyse op de "parent compounds", maar vergt de analyse van de metabolieten. De gehalten aan AOZ en AMOZ, zowel het gehalte aan totaal residu als aan weefselgebonden residu, zijn op dag 21 nog zodanig dat gebruik of misbruik van nitrofuranen zonder problemen gedurende een lange tijd na toediening is aan te tonen. Zeker in verhouding tot de detectiegrens van de toegepaste analysemethode (0,1 µg/kg) en de levensduur van mestkuijens (7 weken). Aangezien de uitscheiding van AOZ en AMOZ steeds langzamer verloopt in de loop van de tijd zal ook na een langere periode dan 21 dagen na toediening van furazolidon en furaltadon residuen van AOZ en AMOZ kunnen worden aangetroffen in de verschillende matrices van mestkuijens.

#### 4.2 In-vitro onderzoek

De eerste indruk van de resultaten van de incubatie van microsomen met de nitrofuranen en de marker metabolieten is dat er bij de incubatie met de nitrofuranen zelf meer weefselgebonden residuen van de metabolieten worden gevormd dan bij incubatie met de metabolieten. De nitrofuranen waarmee de incubatie is uitgevoerd waren echter opgelost in aceton en de metabolieten in methanol. De vraag kan dan ook worden gesteld of de observatie dat er meer weefselgebonden residuen ontstaan bij incubatie met de nitrofuranen dan bij incubatie met de metabolieten wordt veroorzaakt door het soort oplosmiddel wat gebruikt wordt. Om de invloed van het oplosmiddel te bepalen zijn er incubaties uitgevoerd met furaltadon en AMOZ in aanwezigheid van verschillende oplosmiddelen, namelijk aceton, methanol en water. Uit deze resultaten (zie tabel 15 en tabel 3.3) wordt duidelijk dat het oplosmiddel in het geval van furaltadon en AMOZ wel degelijk effect heeft op de vorming van weefselgebonden residuen. Er moet wel worden opgemerkt dat het hierbij om enkelvoudige incubaties gaat.

*Tabel 15: Gevormd percentage weefselgebonden AMOZ na incubatie van microsomen (2,5 mg eiwit) met furaltadon en AMOZ.*

Toegevoegd	Oplosmiddel	% weefselgebonden AMOZ*
-	Aceton	
Furaltadon	Aceton	0,4%
AMOZ	Aceton	0,4%
-	Methanol	
Furaltadon	Methanol	0,8%
AMOZ	Methanol	0,7%
-	Water	
Furaltadon	Water	1,0%
AMOZ	Water	0,6%

\* gecorrigeerd voor aantal nmol waarmee is geïncubeerd

De experimenten zijn alleen voor furaltadon uitgevoerd, en de uitkomst zou dus eventueel kunnen afwijken voor de andere componenten. Uit dierproeven uitgevoerd in Ierland is gebleken dat semicarbazide (SEM) toegediend via het drinkwater tot lagere weefselgebonden residuen leidt dan door toediening van nitrofurazon via het voer (Kennedy, mondelinge mededeling). Voor nitrofurazon zouden misschien dus wel hele andere resultaten uit in-vitro experimenten kunnen worden verkregen in vergelijking met furaltadon. Nu is het wel moeilijk om in-vivo en in-vitro onderzoek in kwantitatief opzicht te vergelijken aangezien het compleet verschillende technieken zijn, maar om een indruk te krijgen wat er kan ontstaan is in-vitro onderzoek een goed alternatief.

Hoewel het geen effect heeft op het al of niet ontstaan van weefselgebonden residuen van nitrofuranen is er tijdens het in-vitro onderzoek opgevallen dat er bij alle incubaties die zijn uitgevoerd altijd een percentage weefselgebonden SEM wordt aangetroffen. Analyse van de S9 fracties van de verschillende levers die gebruikt zijn om de microsomen uit te isoleren laat zien dat hierin geen semicarbazide is aan te tonen. Hieruit kon worden geconcludeerd dat dit tijdens de incubatie ontstaat.

Om de oorzaak van de aanwezigheid van SEM te achterhalen zijn er enkele incubaties uitgevoerd, waarbij SEM,  $^{15}\text{N}_2$ - $^{13}\text{C}$ -SEM in aan- en afwezigheid van NADPH is toegevoegd en een incubatie in afwezigheid van de microsomen. In tabel 3.4 en in tabel 16 zijn hiervan de resultaten weergegeven.

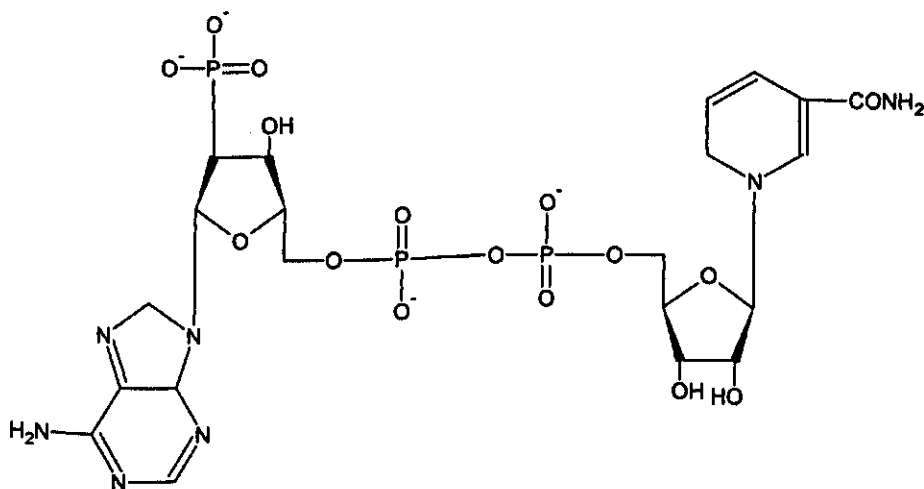
Tabel 16: Gevormd percentage weefselgebonden AMOZ na incubatie van microsomen (2,5 mg eiwit) met furaltadon en AMOZ.

Toegevoegd	Microsomen/NADPH aanwezig	SEM
Methanol	+/+	+
Methanol	+/-	-
SEM	+/+	++
SEM	+/-	+
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> <sup>13</sup> C-SEM	+/+	+
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> <sup>13</sup> C-SEM	+/-	-
Niets	-/+	+
Niets	-/-	-

+ aanwezig

- afwezig

Hieruit blijkt dat naar alle waarschijnlijkheid het ontstaan van SEM niet veroorzaakt wordt door de microsomen of door het toevoegen van een nitrofuraan of zijn metaboliet, maar door de aanwezigheid van NADPH. NADPH wordt toegevoegd om de aanwezige enzymen, welke nodig zijn voor de metabolisering van de nitrofuranen, te activeren. In figuur 18 is de structuur van NADPH weergegeven.



Figuur 18: Structuur NADPH

Zo op het eerste gezicht kan er niet direct een stukje worden geïdentificeerd wat overeen komt met SEM, maar misschien door het ontstaan van omlieggingen in het molecuul zou het toch mogelijk kunnen zijn dat het aangetroffen SEM bij de incubaties van de microsomen van NADPH afkomstig is. Dit zou nog kunnen worden geverifieerd door de enzymen met een andere stof dan NADPH te activeren. Daarnaast zou het massaspectrum van zowel gederivatiseerd als niet-gederivatiseerd NADPH op de aanwezigheid van fragmenten vergelijkbaar met fragmenten van SEM kunnen worden gecontroleerd. Een andere optie is nog dat de aanwezigheid van SEM veroorzaakt wordt door een verontreiniging in de NADPH. Het gebruik van een andere batch of andere leverancier zou dit kunnen oplossen.

## 5. Conclusie

Uit de uitgevoerde dierstudie kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Zoals eerder aangetoond bij varkens worden ook in mestkuijken weefselgebonden residuen gevormd.
- Gemiddeld wordt er bij de gebruikte doses in vlees, lever, nier en bloed 21 dagen na het stopzetten van de toediening respectievelijk 15, 18, 12 en 15 µg/kg aan totaal residu AOZ aangetoond en 36, 101, 34 en 46 µg/kg totaal residu AMOZ.
- Vergelijking van de resultaten van de aangetroffen residuen na toediening van furazolidon (groep 1) met furaltadon (groep 2) laat zien dat het gehalte aan AMOZ (na toediening van furaltadon) over het hele tijdsinterval hoger is dan het gehalte aan AOZ (na toediening van furazolidon).
- De halfwaardetijden van AOZ en AMOZ in de verschillende matrices zijn respectievelijk 4½, 6½, 3¾ en 5½ dag voor AOZ en 5, 7, 4 en 6 dagen voor AMOZ in lever, vlees, nier en bloed.
- Het percentage aan weefselgebonden AOZ in vlees op dag 0 wijkt af van het percentage weefselgebonden AOZ op dag 3, 7, 14 en 21. Ditzelfde geldt voor het percentage weefselgebonden AMOZ in vlees.
- Het percentage aan weefselgebonden AOZ in nier op dag 0 en 7 wijkt af van het percentage weefselgebonden AOZ op dag 3, 14 en 21.
- Het percentage aan weefselgebonden AMOZ in nier op dag 0 en 21 wijkt af van het percentage weefselgebonden AMOZ op dag 3, 7 en 14.
- De verhouding tussen de vrije metabolieten en de weefselgebonden metabolieten in de loop van de tijd blijft gelijk voor zowel AOZ als voor AMOZ in lever.
- Het percentage weefselgebonden AOZ in lever is over het hele tijdsgebied hoger dan het percentage weefselgebonden AMOZ in lever, terwijl het voor de andere matrices (vlees, nier en bloed) vergelijkbaar is.

Uit het in-vitro onderzoek blijkt dat naast furazolidon er ook gebonden residuen ontstaan bij incubatie met furaltadon. Daarnaast is gebleken dat ook bij incubatie van microsomen met nitrofurantoin, nitrofurazon, AOZ, AMOZ, SEM en AHD gebonden residuen kunnen worden aangetoond.

Kortom de in hoofdstuk 1 gestelde hypothesen

*Evenals furazolidon vormen ook furaltadon, nitrofurazon en nitrofurantoin weefselgebonden residuen*

en

*Evenals in varkens worden ook in mestkuijken en garnalen weefselgebonden residuen gevormd*

worden door het uitgevoerde onderzoek in mestkuijken, zowel het in-vivo als het in-vitro, bevestigd. Voor garnalen blijft de vraag nog bestaan of er weefselgebonden residuen worden gevormd. Analyse van regulier monsteronderzoek wijst er wel op dat weefselgebonden residuen gevormd kunnen worden, maar aanvullend onderzoek d.m.v. dierexperimenteel onderzoek is nog nodig.

## 6. Verder onderzoek

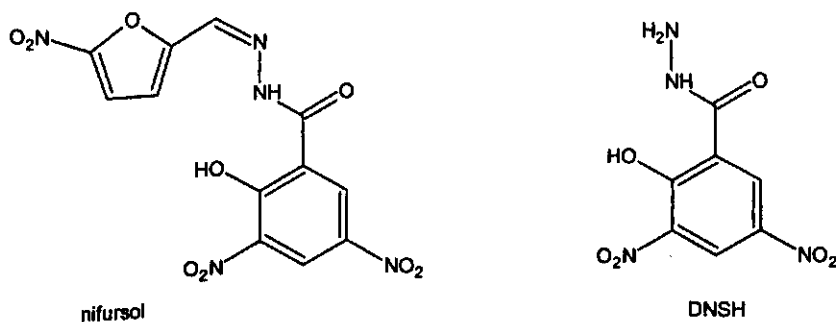
Zoals omschreven stond in het onderzoeksvoorstel (bijlage 1) zou er ook onderzoek plaatsvinden om de identiteit van de verbinding die daadwerkelijk het weefselgebonden residu vormt te bepalen. Dit was echter wel zeer ambitieus om binnen de gestelde termijn uit te voeren. In de komende tijd zal dit echter de volgende stap zijn. Hierbij wordt de volgende strategie gevolgd:

- Incubatie van microsomen met bijv. furazolidon in aanwezigheid van een bekend targeteiwit, bijv. ovalbumine.
- Isolatie van de weefselgebonden residuen en intacte eiwit-metaboliet adducten m.b.v. antilichamen tegen zowel ovalbumine als AOZ.
- Tryptic digest maken van het eiwit met adduct.
- Analyse van het gemaakte tryptic digest, waarbij een vergelijking wordt gemaakt met een tryptic digest van ovalbumine zonder adduct. Bij dat stukje eiwit wat een adduct bevat zal er een massaverschil zichtbaar zijn met het "blanco" tryptic digest. Dit massaverschil kan wat zeggen over de identiteit van het adduct.

Pas als de identiteit duidelijk is en deze werkwijze zodanig van aard is dat het ook kan worden toegepast op de "incurred samples" kan er een antwoord worden gegeven op de vraag of het mogelijk is om direct adducten in eiwitten en eiwithydrolysaten te analyseren.

Zoals ook te lezen is in het protocol van het dier-experimentele onderzoek (bijlage 2) heeft er ook een groep mestkuijken voer gekregen waaraan nifursol is toegevoegd.

Nifursol is een nitrofuraan welke nog steeds werd toegepast als preventiemiddel voor "blackhead" bij pluimvee. De veiligheid van nifursol kan echter niet worden gegarandeerd zodat met ingang van 31 maart 2003 het gebruik van nifursol is verboden (Council regulation EC 1756/2002). De laatste maanden is er op het RIKILT een analysemethode opgezet voor de analyse van nifursol en zijn markermetaboliet dinitro-salicylhydrazide (DNSH). In figuur 19 zijn de structuren weergegeven. Met behulp van de ontwikkelde analysemethode zullen de verkregen monsters worden geanalyseerd, waarbij kan worden vastgesteld of ook nifursol weefselgebonden residuen vormt.



*Figuur 19: Structuren van nifursol en zijn markermetaboliet DNSH.*

## Literatuur

- Angelis, I. De, L. Rossi, J.Z. Pedersen, A.L. Vignoli, O. Vincentini, L.A.P. Hoogenboom, T.H.G. Polman, A. Stamatii and F. Zucco, 1999, Metabolism of furazolidone: alternative pathways and modes of toxicity in different cell lines, *Xenobiotica*, 11, 1157-1169.
- Annex IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90.
- Berende, P.L.M., 1997, Praktische kengetallen over fokkerij, huisvesting, voeding, lichaamssamenstelling, urine- en fecesproductie en toediening van diergeneesmiddelen bij het varken, RIKILT rapport 97.33.
- Council Regulation (EC) No 1756/2002, 23 September 2002.
- European Food Law, nr 135, March 2003.
- EG 2701/94, Verordening (EG) van de Commissie van 7 november 1994 tot wijziging van de bijlage I tot en met IV bij Verordening (EEG) nr. 2377/90 van de Raad houdende een communautaire procedure tot vaststelling van maximumwaarden voor residuen van geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik in levensmiddelen van dierlijke oorsprong.
- Food and Drug Administration, 1976, Part V. New Animal Drugs. Furazolidon (NF-180), Fed. Register 41, 19906.
- Gottschall, D.W. and R. Wang, 1995, Depletion and Bioavailability of [<sup>14</sup>C]Furazolidone Residues in Swine Tissues, *J. Agric. Food Chem.* 43, 2520.
- Hoogenboom, L.A.P., M. van Kammen, M.C.J. Berghmans, J.H. Koeman and H.A. Kuiper, 1991, The use of pig hepatocytes to study the nature of protein-bound metabolites of furazolidone; a new analytical method for their detection. *Food Chem. Toxic.* 29, 321.
- Hoogenboom, L.A.P., M.C.J. Berghmans, R. Parker and I.C. Shaw, 1992, Depletion kinetics of protein-bound furazolidone metabolites containing an intact side-chain. *Food Add. Contam.* 9, 623.
- Hoogenboom L.A.P, G.D. van Bruchem, K. Sonne, I.C. Enninga, J.A. van Rhijn, H. Heskamp, M.B.M. Huveneers-Oorsprong, J.C.M. van der Hoeven and H.A. Kuiper, 2002 Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone, *Environm. Toxicol. Pharmacol.* 11, 273.
- McCracken, R.J., W.J. Blanchflower, C. Rowan, M.A. McCoy and D.G. Kennedy 1995, Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray LC-MS and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues, *Analyst*, 120, 2347.
- McCracken, R.J., 1996, A study of furazolidone residues in pigs, Thesis.
- Polman, Th.H.G., Berende, P.L.M., and Hoogenboom, L.A.P. 1994 In vivo study on the biotransformation of furaltadone in pigs, RIKILT-report 94.04, Wageningen, The Netherlands.
- Rhijn, J.A. van, P.P.J. Mulder, P.Zomer, I.J.W. Elbers, D.G. Kennedy, Confirmatory analysis of tissue-bound residues of nitrofurans, in preparation.
- Rhijn, J.A. van, T. Zuidema, B. Schat, P.P.J. Mulder, P.J.F. Kooij, Y.J.C. Bolck, L.A.P. Hoogenboom and D.G. Kennedy, 2003, Depletion study of furazolidone and furaltadone and their tissue-bound metabolites in broilers, to be presented on Euro Food Chem XII, Strategies for Safe Food, Brugge, 24-26 September 2003.
- Vroomen, L.H.M., M.C.J. Berghmans, P. van Leeuwen, T.D.B. van der Struijs, P.H.U. de Vries and H.A. Kuiper, 1986, Kinetics of <sup>14</sup>C-furazolidone in piglets upon oral administration during 10 days and its interaction with tissue macro-molecules, *Food Add. Contam.* 3, 331.
- [www.emea.eu.int](http://www.emea.eu.int), Furazolidone summary report 1997.
- Zuidema, T., J.F.M. Nouws, M.J.H. Tomassen, C.A. Kan, 2000, Pharmacokinetic and residue aspects of doxycycline in broilers following oral administration of the product Doxymix 50% (Vetimex Animal Health B.V., Bladel) via drinking water, Confidential Study RIK.TZU.99.05.



## 1. Tabellen uitvoering en controle dierstudie

Tabel 1.1: Werkschema dierproef

	Datum	Dag	Week	Groep 1 en 2 (medicatie)	Groep 3 (blanco controle groep)
Maandag	6 jan	1			
Dinsdag	7 jan	2			
Woensdag	8 jan	3			
Donderdag	9 jan	4		Aankomst dieren; wegen voer	Aankomst dieren; wegen voer
Vrijdag	10 jan	5			
Zaterdag	11 jan	6			
Zondag	12 jan	7			
Maandag	13 jan	8	Week 1		
Dinsdag	14 jan	9			
Woensdag	15 jan	10			
Donderdag	16 jan	11			
Vrijdag	17 jan	12			
Zaterdag	18 jan	13			
Zondag	19 jan	14			
Maandag	20 jan	15	Week 2	Wegen dieren en voer	Wegen dieren en voer
Dinsdag	21 jan	16			
Woensdag	22 jan	17			
Donderdag	23 jan	18			
Vrijdag	24 jan	19			
Zaterdag	25 jan	20			
Zondag	26 jan	21			
Maandag	27 jan	22	Week 3	<b>Start gemedicineerd voer</b> Wegen dieren en voer	Wegen dieren
Dinsdag	28 jan	23		<b>Gemedicineerd voer</b>	
Woensdag	29 jan	24		<b>Gemedicineerd voer</b>	
Donderdag	30 jan	25		<b>Gemedicineerd voer</b>	
Vrijdag	31 jan	26		<b>Gemedicineerd voer</b>	
Zaterdag	1 feb	27		<b>Gemedicineerd voer</b>	
Zondag	2 feb	28		<b>Gemedicineerd voer</b>	

	Datum	Dag	Week	Groep 1 en 2 (medicatie)	Groep 3 (blanco controle groep)
Maandag	3 feb	29	Week 4	Einde gemediceerd voer Wegen dieren en voer Slacht incl. verzamelen bloedmonsters moment I (dag 0)	Wegen dieren
Dinsdag	4 feb	30			
Woensdag	5 feb	31			
Donderdag	6 feb	32		Slacht incl. verzamelen bloedmonsters moment II (dag 3)	
Vrijdag	7 feb	33			
Zaterdag	8 feb	34			
Zondag	9 feb	35			
Maandag	10 feb	36	Week 5	Slacht incl. verzamelen bloedmonsters moment III (dag 7)	
Dinsdag	11 feb	37			
Woensdag	12 feb	38			
Donderdag	13 feb	39			
Vrijdag	14 feb	40			
Zaterdag	15 feb	41			
Zondag	16 feb	42			
Maandag	17 feb	43	Week 6	Slacht incl. verzamelen bloedmonsters moment IV (dag 14)	
Dinsdag	18 feb	44			
Woensdag	19 feb	45			
Donderdag	20 feb	46			
Vrijdag	21 feb	47			
Zaterdag	22 feb	48			
Zondag	23 feb	49			
Maandag	24 feb	50	Week 7	Slacht incl. verzamelen bloedmonsters moment V (dag 21) Wegen voer	Slacht incl. verzamelen bloedmonsters

Tabel 1.2: Groei mestkuikens en verbruik gemedicineerd voer

	Groep 1	Groep 2
Gemiddelde gewicht mestkuikens (n=30) start van medicatieperiode (g)	608,6	647,9
Gemiddelde gewicht mestkuikens (n=30) eind van medicatieperiode (g)	1133,1	1195,5
Gemiddelde gewicht mestkuikens (n=6) op dag 21 (g)	3258,3	3183,3
Gemiddelde groei per mestkuiken per dag tijdens medicatieperiode (g)	74,9	78,2
Gemiddelde groei per mestkuiken per dag na medicatieperiode (dag 0 tot dag 21) (g)	101,2	94,7
Verbruik gemedicineerd voer (kg)	23,18	23,12
Verbruik gemedicineerd voer per dag (kg)	3,31	3,30

Tabel 1.3: Resultaten analyse van furazolidon en furaltadon in voer

Monster	Datum	Furazolidon (mg/kg)	Furaltadon (mg/kg)
blanco start	17-jan	<0,005	<0,001
furazolidon	2-jan	183	0,002
furazolidon	27-jan	186	0,001
furaltadon	2-jan	0,34	209
furaltadon	27-jan	0,19	194
blanco groei	2-jan	0,005	0,007
blanco groei	27-jan	0,005	0,005
blanco groei	3-feb	<0,005	0,004

Tabel 1.4: Gewichtsbalans furazolidon medicatie (groep 1)

	27 jan	28 jan	29 jan	30 jan	31 jan	1 feb	2 feb	3 feb
Gemiddelde gewicht kuiken (g)	608,6	683,6	758,5	833,4	908,3	983,3	1058,2	1133,1
Verbruik voer (kg)		3,31	3,31	3,31	3,31	3,31	3,31	3,31
Aantal kuikens	30	30	30	30	30	30	30	30
Gebruik voer per kg kuiken (kg)		0,16	0,15	0,13	0,12	0,11	0,10	0,10
Gehalte furazolidon in voer (mg/kg)		185	185	185	185	185	185	185
Inname furazolidon in mg per kg kuiken per dag		29,79	26,85	24,44	22,42	20,71	19,25	17,97
Gemiddelde inname furazolidon in mg per kg kuiken								<b>23,1</b>

Tabel 1.5: Gewichtsbalans furaltadon medicatie (groep 2)

	27 jan	28 jan	29 jan	30 jan	31 jan	1 feb	2 feb	3 feb
gemiddelde gewicht kuiken (g)	647,9	726,1	804,3	882,6	960,8	1039,0	1117,2	1195,5
verbruik voer (kg)		3,30	3,30	3,30	3,30	3,30	3,30	3,30
aantal kuikens	30	30	30	30	30	30	30	30
gebruik voer per kg kuiken (kg)		0,15	0,14	0,12	0,11	0,11	0,10	0,09
gehalte furaltadon in voer (mg/kg)		202	202	202	202	202	202	202
inname furaltadon in mg per kg kuiken per dag		30,55	27,58	25,14	23,09	21,35	19,86	18,56
Gemiddelde inname furaltadon in mg per kg kuiken								<b>23,7</b>

## 2. Tabellen uitscheidingskinetiek

Tabel 2.1: Resultaten analyse van furazolidon in mestkuikens uit groep 1 (furazolidon medicatie) in  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Slachtmoment I (dag 0)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	<5	<5	231	127	<5
2	<5	<5	*	1217	<5
3	<5	<5	299	161	<5
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	nb
6	nb	nb	nb	nb	nb
Gemiddelde			265	502	
SD			48	620	
VC%			18%	124%	

\* geen monster

Slachtmoment II (dag 3)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	<5	<5	<5	<5	<5
2	<5	<5	<5	<5	<5
3	<5	<5	<5	<5	<5
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	nb
6	nb	nb	nb	nb	nb

Slachtmoment III (dag 7)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	<5	<5	<5	<5	<5
2	<5	<5	<5	<5	<5
3	<5	<5	<5	<5	<5
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	nb
6	nb	nb	nb	nb	nb

nb: niet bepaald

Tabel 2.2: Resultaten analyse van furaltadon in mestkuijens uit groep 2 (furaltadon medicatie) in  $\mu\text{g}/\text{kg}$

<b>Slachtmoment I (dag 0)</b>					
Mestkuijens	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	<5	12	7779	2508	<5
2	<5	11	348	2046	<5
3	<5	3	1754	1678	<5
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	nb
6	nb	nb	nb	nb	nb
Gemiddelde		8,8	3294	2077	
SD		4,6	3948	416	
VC%		53%	120%	20%	

<b>Slachtmoment II (dag 3)</b>					
Mestkuijens	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	<5	<5	12	<5	<5
2	<5	<5	<5	<5	<5
3	<5	<5	<5	<5	<5
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	nb
6	nb	nb	nb	nb	nb

<b>Slachtmoment III (dag 7)</b>					
Mestkuijens	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	<5	<5	<5	<5	<5
2	<5	<5	<5	<5	<5
3	<5	<5	<5	<5	<5
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	nb
6	nb	nb	nb	nb	nb

nb: niet bepaald

Tabel 2.3: Resultaten analyse van totaal AOZ in mestkuikens uit groep 1 (furazolidon medicatie) in  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Slachtmoment I (dag 0)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	1532	602	nb	nb	nb
2	1766	634	nb	nb	nb
3	1582	649	nb	nb	nb
4	1558	515	12601	893	2305
5	1511	646	19762	839	2318
6	1639	432	nb	743	2376
Gemiddelde	1598	580	16182	825	2333
SD	93	88	5064	76	38
VC%	6%	15%	31%	9%	2%

Slachtmoment II (dag 3)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	475	136	nb	nb	nb
2	432	210	nb	nb	nb
3	388	166	nb	nb	nb
4	429	126	512	228	318
5	416	138	595	204	440
6	402	183	nb	220	418
Gemiddelde	424	160	553	217	392
SD	30	32	59	12	65
VC%	7%	20%	11%	5%	17%

Slachtmoment III (dag 7)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	137	71	nb	nb	nb
2	111	63	nb	nb	nb
3	126	80	nb	nb	nb
4	162	62	71	92	nb
5	126	68	81	126	148
6	105	104	nb	114	154
Gemiddelde	128	75	76	110	151
SD	20	16	7,1	17	4,6
VC%	16%	22%	9%	16%	3%

nb: niet bepaald

Slachtmoment IV (dag 14)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	43	34	nb	nb	nb
2	44	50	nb	nb	nb
3	45	47	nb	nb	nb
4	42	39	nb	nb	nb
5	55	41	nb	nb	36
6	50	35	nb	48	31
Gemiddelde	46	41		48	34
SD	5,0	6,3			3,3
VC%	11%	15%			10%

Slachtmoment V (dag 21)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	13	14	nb	nb	nb
2	20	15	nb	nb	nb
3	16	17	nb	nb	nb
4	14	16	nb	nb	nb
5	25	14	nb	nb	12
6	20	14	nb	15	11
Gemiddelde	18	15		15	12
SD	4,6	1,1			0,7
VC%	25%	8%			6%

Tabel 2.4: Resultaten analyse van totaal AMOZ in mestkuikens uit groep 2 (furaltadon medicatie) in  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Slachtmoment I (dag 0)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	7442	1181	nb	nb	nb
2	7356	1136	nb	nb	nb
3	5276	1234	nb	nb	nb
4	5839	1465	27943	1785	6687
5	5505	1001	54459	2029	5895
6	5904	1189	nb	2895	7508
Gemiddelde	6220	1201	41201	2236	6697
SD	941	152	18749	584	807
VC%	15%	13%	46%	26%	12%

nb: niet bepaald

Slachtmoment II (dag 3)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	2509	373	nb	nb	nb
2	1842	335	nb	nb	nb
3	2462	227	nb	nb	nb
4	2157	375	715	442	1118
5	1531	386	1283	510	1156
6	1649	237	nb	291	839
Gemiddelde	2025	322	999	414	1038
SD	415	72	401	112	173
VC%	21%	22%	40%	27%	17%

Slachtmoment III (dag 7)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	296	115	nb	nb	nb
2	339	155	nb	nb	nb
3	353	156	nb	nb	nb
4	292	126	388	301	nb
5	234	113	100	187	313
6	415	140	nb	195	350
Gemiddelde	322	134	244	228	331
SD	62	19	204	64	26
VC%	19%	14%	83%	28%	8%

Slachtmoment IV (dag 14)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	220	76	nb	nb	nb
2	221	89	nb	nb	nb
3	188	94	nb	nb	nb
4	165	113	nb	nb	nb
5	233	88	nb	nb	116
6	161	108	nb	124	128
Gemiddelde	198	95		124	122
SD	31	14			8,1
VC%	16%	14%			7%

nb: niet bepaald



Slachtmoment V (dag 21)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	78	41	nb	nb	nb
2	86	29	nb	nb	nb
3	98	43	nb	nb	nb
4	111	34	nb	nb	nb
5	105	39	nb	nb	32
6	126	30	nb	46	36
Gemiddelde	101	36		46	34
SD	17	5,7			2,5
VC%	17%	16%			7%

Tabel 2.5: Resultaten analyse van weefselgebonden AOZ in matrices van mestkuikens uit groep 1 (furazolidon medicatie) in %

Slachtmoment I (dag 0)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	46,5	50,1	nb	nb	nb
3	43,4	54,7	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	33,5
6	53,8	73,5	nb	0,2	30,1
Gemiddelde	47,9	59,4			31,8
SD	5,3	12,4			2,4
VC%	11%	21%			7,4%

Slachtmoment II (dag 3)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	63,9	75,0	nb	nb	nb
3	57,6	72,5	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	63,7
6	67,4	82,5	nb	27,9	63,0
Gemiddelde	63,0	76,7			63,3
SD	5,0	5,2			0,4
VC%	7,9%	6,8%			0,7%

nb: niet bepaald

Slachtmoment III (dag 7)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	61,7	81,4	nb	nb	nb
3	56,1	81,3	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	73,1
6	63,8	81,1	nb	26,4	75,1
Gemiddelde	60,5	81,3			74,1
SD	4,0	0,1			1,4
VC%	6,5%	0,2%			1,9%

Slachtmoment IV (dag 14)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	58,2	80,4	nb	nb	nb
3	43,9	70,4	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	53,6
6	63,0	79,4	nb	32,7	61,9
Gemiddelde	55,0	76,7			57,7
SD	10,0	5,5			5,9
VC%	18%	7,2%			10%

Slachtmoment V (dag 21)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	48,3	70,2	nb	nb	nb
3	79,4	86,6	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	52,7
6	58,2	74,5	nb	14,5	54,2
Gemiddelde	62,0	77,1			53,5
SD	15,9	8,5			1,1
VC%	26%	11%			2,0%

nb: niet bepaald

Tabel 2.6: Resultaten analyse van vrij en weefselgebonden AMOZ in vlees en lever van mestkuijken uit groep 2 (furaltadon medicatie) in %

Slachtmoment I (dag 0)					
Mestkuijken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	47,7	71,9	nb	nb	nb
3	47,4	69,8	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	30,5
6	39,7	53,3	nb	0,3	25,3
Gemiddelde	45,0	65,0			27,9
SD	4,5	10,2			3,7
VC%	10%	16%			13%

Slachtmoment II (dag 3)					
Mestkuijken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	57,1	79,2	nb	nb	nb
3	52,0	85,1	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	63,6
6	64,2	79,7	nb	26,1	66,0
Gemiddelde	57,8	81,3			64,8
SD	6,1	3,3			1,7
VC%	11%	4,1%			2,7%

Slachtmoment III (dag 7)					
Mestkuijken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	45,2	87,0	nb	nb	nb
3	*	80,9	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	68,3
6	49,9	80,0	nb	24,0	71,2
Gemiddelde	47,5	82,6			69,7
SD	3,3	3,8			2,1
VC%	7,0%	4,6%			2,9%

\* analyse mislukt

nb: niet bepaald

Slachtmoment IV (dag 14)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	*	80,0	nb	nb	nb
3	46,3	82,2	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	71,2
6	55,0	80,6	nb	25,4	68,4
Gemiddelde	50,7	81,0			69,8
SD	6,1	1,1			2,0
VC%	12%	1,4%			2,9%

Slachtmoment V (dag 21)					
Mestkuiken	Lever	Vlees	Gal	Bloed	Nier
1	nb	nb	nb	nb	nb
2	51,6	75,5	nb	nb	nb
3	48,3	82,3	nb	nb	nb
4	nb	nb	nb	nb	nb
5	nb	nb	nb	nb	49,4
6	44,0	80,0	nb	21,0	53,1
Gemiddelde	48,0	79,3			51,2
SD	3,8	3,5			2,6
VC%	8,0%	4,4%			5,1%

\* analyse mislukt

nb: niet bepaald

### 3. Tabellen in vitro onderzoek

Tabel 3.1: Resultaten eiwitbepaling in microsomen in µg/ml

	haan 100x	haan 10x	kip 100x	kip 10x
	100,94	874,62	60,28	521,84
	92,81	807,52	48,08	513,71
	93,83	840,05	44,01	509,64
	101,96	848,19	49,09	514,72
gemiddelde	97,38	842,60	50,36	514,98
Stdev	4,73	27,65	6,96	5,07
VC%	4,9%	3,3%	13,8%	1,0%
gehalte in onverdund	9738	8426	5036	5150
gemiddeld gehalte	9082		5093	

Tabel 3.2: Gevormd percentage weefselgebonden metabolieten na incubatie van microsomen (4,5 mg eiwit) met de verschillende nitrofuranen en de bijbehorende metabolieten

Toegevoegd	nmol	Gevormd metaboliet*	% weefselgebonden	% weefselgebonden SEM
Furazolidon	73,3	Eiwit-AOZ	5,4%	
Furaltadon	72,0	Eiwit-AMOZ	4,2%	0,3%
Nitrofurantoin	58,8	Eiwit-AHD	4,1%	0,3%
Nitrofurazon	83,2	Eiwit-SEM	5,4%	5,4%
AOZ	49,0	Eiwit-AOZ	1,3%	0,9%
AMOZ	24,9	Eiwit-AMOZ	1,4%	0,7%
AHD	43,5	Eiwit-AHD	2,1%	0,5%
SEM	66,7	Eiwit-SEM	1,3%	1,3%

\* bepaald via de weer vrij gemaakte zij-keten

Tabel 3.3: Gevormd percentage weefselgebonden AMOZ na incubatie van microsomen (2,5 mg eiwit) met furaltadon en AMOZ

Toegevoegd	Oplosmiddel	nmol	% weefselgebonden AMOZ
	Aceton	-	
Furaltadon	Aceton	15,4	0,4%
AMOZ	Aceton	24,9	0,6%
	Methanol	-	
Furaltadon	Methanol	15,4	0,8%
AMOZ	Methanol	24,9	1,1%
	Water	-	
Furaltadon	Water	15,4	1,0%
AMOZ	Water	24,9	0,9%

Tabel 3.4: Resultaat incubaties met SEM en gelabeld SEM in aan- en afwezigheid van microsomen en NADPH

<b>Toegevoegd</b>	<b>Microsomen</b>	<b>NADPH</b>	<b>SEM</b>
Methanol	+	+	+
Methanol	+	-	-
SEM	+	+	++
SEM	+	-	+
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C-SEM	+	+	+
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> - <sup>13</sup> C-SEM	+	-	-
Niets	-	+	+
Niets	-	-	-

# **Bijlage 1**

**Onderzoeksvoorstel Adducten van nitrofuranen:  
metabolisme, kinetiek en analytiek**

# Adducten van nitrofuranen: metabolisme, kinetiek en analytiek

Tina Zuidema

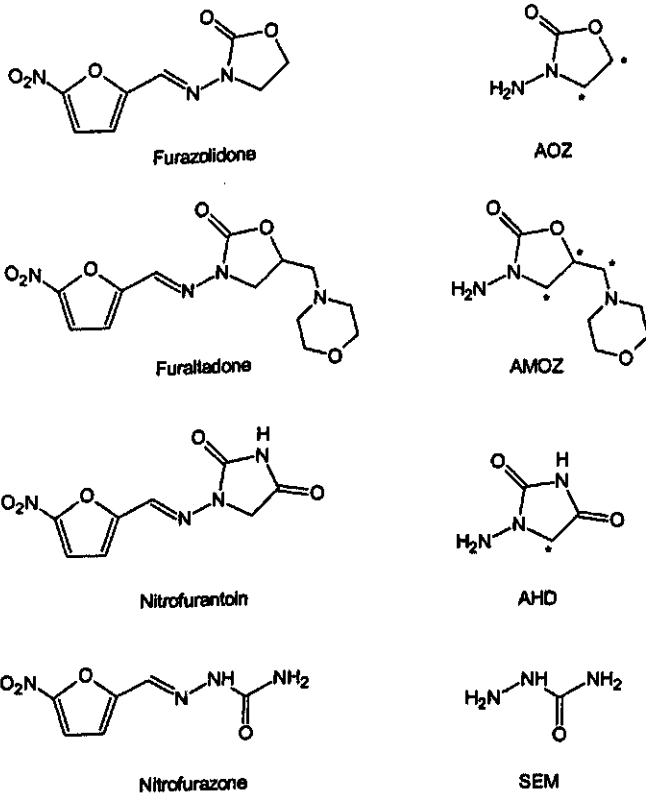
Student nr: 835802362

## 1 Probleem- en vraagstelling

Tijdens een routine controle in februari 2002 zijn residuen van nitrofuranen aangetroffen in producten afkomstig uit verschillende landen. Als respons op dit aantreffen heeft de EU de controle van importproducten uit deze landen op de aanwezigheid van residuen van nitrofuranen geïntensiveerd en in één geval is de import zelfs stopgezet.

Het gebruik van nitrofuranen als dierbehandelingsmiddel is in de EU sinds 1995 verboden als gevolg van mogelijke gezondheidsrisico's die met nitrofuranen en diens metabolieten geassocieerd worden.

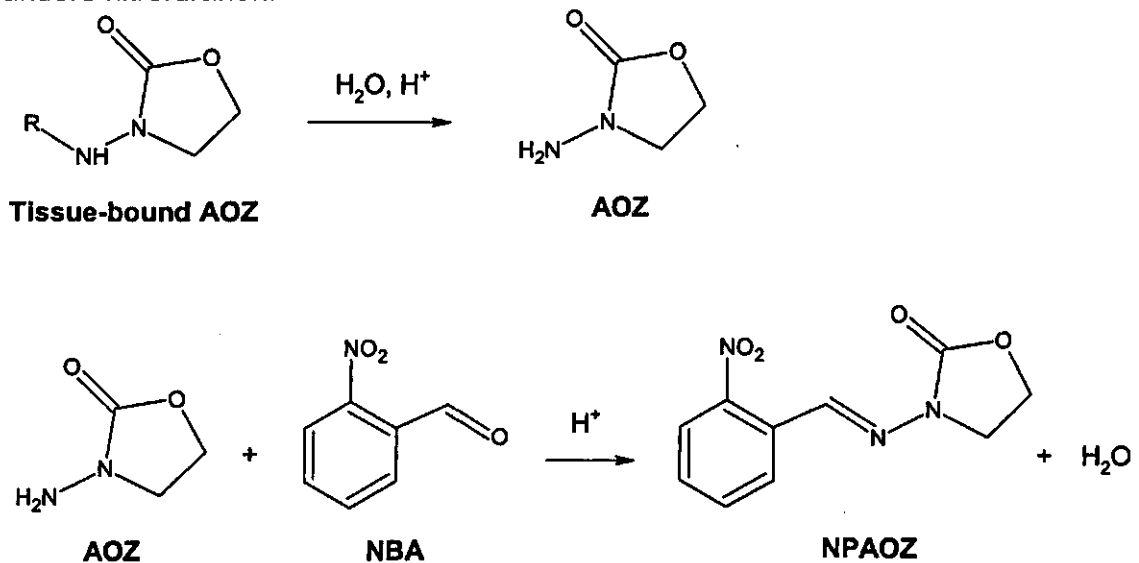
Nitrofuranen worden na opname zeer snel gemetaboliseerd, waardoor het aantonen van residuen van de uitgangsstof al binnen een paar uur niet meer mogelijk is. Meestal leidt metabolisme tot de vorming van componenten, welke beter en sneller kunnen worden uitgescheiden. In sommige gevallen ontstaan er echter reactieve intermediëren die covalent kunnen binden aan DNA of eiwit. Dergelijke adducten blijven veel langer aanwezig in het lichaam en vormen daarmee een ideale marker voor het (illegale) gebruik van stoffen. Dit is eveneens het geval voor de nitrofuranen. Er is inmiddels een specifieke methode ontwikkeld voor de analyse van eiwit-gebonden metabolieten van nitrofuranen. In figuur 1 zijn de structuren weergegeven van furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin en nitrofurazon met hun bijbehorende marker metaboliet, respectievelijk 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-amino-hydantoin (AHD) en semicarbazide (SEM).



Figuur 1: de moleculaire structuren van enkele nitrofuranen en de bijbehorende marker metabolieten.



De methode die is ontwikkeld voor nitrofuranen is zeer specifiek voor deze stofklasse omdat er gebruik wordt gemaakt van de zuurgevoeligheid van de C=N band. Residuen van de metabolieten van de nitrofuranen worden met behulp van zure hydrolyse van de imine verbinding van het eiwit losgemaakt. Door toevoegen van 2-nitrobenzaldehyde vindt er condensatie van de aldehyde met de primaire amino groep van de vrijgekomen metabolieten plaats waarbij een aromatische imine verbinding wordt gevormd. In figuur 2 wordt deze reactie weergegeven voor AOZ. Vergelijkbare reacties vinden plaats voor de andere nitrofuranen.



*Figuur 2: reactievergelijking van de hydrolyse en derivatisering van AOZ.*

Gezien het feit dat ook andere stoffen de eigenschap hebben om adducten te vormen met eiwitten is het interessant om na te gaan of adducten ook direct kunnen worden bepaald in eiwitten of eiwithydrolysaten. Dit heeft als voordeel dat er een meer algemene methode beschikbaar komt voor de bepaling van eiwit-gebonden residuen en dat is nuttig voor:

- Niet zuur hydrolyseerbare nitrofuranen
- Andere adducten van bijvoorbeeld nitroimidazolen, benzimidazolen, hormonen.

Nitrofuranen zijn in 1995 op de lijst van niet-toegelaten middelen geplaatst doordat uit uitgevoerde toxicologische studies bleek dat er geen NOEL kon worden vastgesteld en vooral omdat de belangrijkste metaboliet AOZ mutageen bleek te zijn. Farmaco-kinetisch onderzoek is alleen verricht aan varkens. De huidige nitrofuranen problematiek laat zien dat er vooral problemen zijn met kip en garnaal. De farmaco-kinetisch data van varken worden tot nu toe zonder meer geëxtrapoleerd naar zowel kip als garnaal. De vraag is of dit terecht is. De uitgelezen methode om dit te bepalen is door middel van dier-experimenteel onderzoek. Aangezien zo'n studie in tropische garnaal niet eenvoudig is te realiseren, zal hierbij de aandacht worden gericht op kip.

De aldus verkregen monsters kunnen dienen voor het beantwoorden van de volgende vragen:

- Worden bij kip dezelfde eiwitgebonden metabolieten gevormd als bij varken en is de extrapolatie van de beschikbare kinetiek gegevens van varkens naar kippen terecht?
- Wat is de identiteit van de verbinding (parent component of metaboliet) die daadwerkelijk het eiwitgebonden residu vormt?
- Is het mogelijk om direct adducten in eiwitten en eiwithydrolysaten te analyseren?

## 2 Onderzoeksmethoden

Het onderzoek zal bestaan uit een in-vivo en een in-vitro onderzoek.

### 2.1 In-vivo

Twee farmaco-kinetische studies zullen parallel worden uitgevoerd waarbij mestkuikens furazolidon en furaltadon toegediend zullen krijgen. Furazolidon ter vergelijking van de farmaco-kinetiek van varkens en furaltadon, omdat er tot 6 mei jl. nog een toelating bestond voor deze component in o.a. Brazilië. De aldus verkregen monsters zullen worden geanalyseerd met de op het RIKILT beschikbare analytische methode voor de bepaling van metabolieten van nitrofurane. Hierdoor zal een beter beeld van de kinetiek en het metabolisme van furazolidon en furaltadon in kip ontstaan. Daarnaast kunnen de verkregen monsters worden gebruikt voor het werk beschreven in paragraaf 2.2.

### 2.2 In-vitro

Met de monsters verkregen in de in-vivo studies en reeds aanwezige praktijkmonsters kan worden nagegaan of adducten direct bepaald kunnen worden in eiwitten of eiwithydrolysaten. Door behandeling met enzymen zouden eiwitten reproduceerbaar kunnen worden gesplitst in kleinere fragmenten, die dan m.b.v. analytische technieken kunnen worden onderzocht. Mogelijk moet daarbij een voorzuivering plaatsvinden van een bepaald targeteiwit al dan niet in combinatie met immuno-affiniteitskolommen. Voor de bepaling van het target-eiwit kan gebruik worden gemaakt van een combinatie van <sup>14</sup>C-gelabelde nitrofurane en in vitro methoden, waarna identificatie kan worden uitgevoerd met behulp van massaspectrometrie (time of flight).

Daarnaast bestaat er de mogelijkheid om met behulp van antilichamen (beschikbaar voor AOZ en AHD) te onderzoeken of adducten direct aangetoond kunnen worden. Door het gebruik van antilichamen vindt er tegelijkertijd met de isolatie van de doelcomponent al een zuivering plaats, waardoor de opwerking van de monsters minder bewerkelijk kan worden. Verder kunnen in-vitro studies worden uitgevoerd met microsomen van kippen, omdat daarmee:

1. grotere hoeveelheden adducten worden verkregen,
2. de ideale controlemonsters kunnen worden gegenereerd en
3. gestart wordt met een zuiverder monster.

Dit laatste zou nog versterkt kunnen worden door tijdens de incubatie albumines toe te voegen, die dan via centrifugatie kunnen worden gescheiden van de microsomale eiwitten.

## 3 Werkplan

Onderdeel	Planning
Schrijven (definitief) onderzoeksvoorstel	September 2002
In vitro onderzoek	Oktober 2002 – Februari 2003
Identiteit bepaling	Oktober 2002 – Februari 2003
Pharmaco-kinetische studie (praktijk)	Januari – Februari 2003
Analyseren monsters studie	Februari – Maart 2003
Bewerken en analyseren van de gegevens	Maart – April 2002
Schrijven eerste versie verslag	April – Mei 2003
Schrijven definitieve versie verslag	Juni – Juli 2003
Houden van een voordracht	Augustus 2003

## 4 Literatuur

- Summary reports EMEA, 1997
- Hoogenboom et al., Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidon, Env. Tox. and Pharm. 11, 2002, 273 – 287.

## 5 Samenstelling afstudeercommissie

Drs. J.A. van Rhijn (analytische ondersteuning)  
RIKILT  
Bornsesteeg 45  
6708 PD Wageningen  
tel: 0317-475597  
e-mail: [j.a.vanrhijn@rikilt.wag-ur.nl](mailto:j.a.vanrhijn@rikilt.wag-ur.nl)

Dr. L.A.P. Hoogenboom (toxicologische ondersteuning)  
RIKILT  
Bornsesteeg 45  
6708 PD Wageningen  
tel: 0317-475623  
e-mail: [l.a.p.hoogenboom@rikilt.wag-ur.nl](mailto:l.a.p.hoogenboom@rikilt.wag-ur.nl)

Dr. R.J.M. Niesink  
OUNL  
Van Speijkstraat 12  
3572 XD Utrecht  
Tel: 030-2711041  
e-Mail: [rniesink@wish.net](mailto:rniesink@wish.net)

Dr. E.J. Middelbeek  
OUNL  
Directoraat Natuur- en technische wetenschappen  
Postbus 2960  
6401 DL Heerlen  
Tel. 045-5762541  
e-mail: [evert.middelbeek@ou.nl](mailto:evert.middelbeek@ou.nl)

## **Bijlage 2**

**Protocol dier-experimenteel onderzoek: Collecting incurred samples (liver, kidney, muscle, bile and plasma) of broilers after oral administration of furazolidon, furaltadon and nifursol via feed**

**Amendment op het protocol**

**Toestemming DEC**

**CONFIDENTIAL**

**FINAL PROTOCOL**

**COLLECTING INCURRED SAMPLES (LIVER, KIDNEY, MUSCLE, BILE AND PLASMA) OF BROILERS  
AFTER ORAL ADMINISTRATION OF FURAZOLIDON, FURALTADON AND NIFURSOL VIA FEED**

Project : Nitrofuran broiler study  
Project number : 71.782.01  
Authors : T. Zuidema, B. Schat  
Study period : January 2003 – February 2003

**IDENTIFICATION OF THE SPONSOR**

Sponsor : RIKILT  
Contact person for analysis : T. Zuidema, BSc.  
Investigator : B. Schat, DVM, BSc, MSc (Veterinary Surgeon)  
Company address : Bornsesteeg 45  
PO Box 230  
6700 AE WAGENINGEN  
Phone : 0031 317 47 55 80 (T. Zuidema)  
: 0031 317 47 54 08 ( B. Schat)  
Fax : 0031 317 41 77 17

**TESTING FACILITIES**

Animal Section : Zodiac Animal Facilities  
Contact Person : P. Mekking BSc.  
Local investigator : R. Terluin  
Adress : Marijkeweg 40  
PO Box 338  
6700 AH WAGENINGEN  
The Netherlands  
Phone : 0031 317 48 39 52  
Fax : 0031 317 48 39 62

RIKILT  
WAGENINGEN, 18 Nov. 2002

## TABLE OF CONTENTS

<b>GENERAL SUMMARY</b>	3
<b>OBJECTIVE FOR THIS STUDY</b>	3
<b>MATERIALS</b>	4
Test Products	4
<b>ANIMALS, HOUSING, FEEDING AND HEALTH</b>	6
Animals	6
Housing	6
Feed	7
Water	7
Animal Health	7
<b>EXPERIMENTAL DESIGN</b>	9
Randomization and allocation	9
Study design	9
Preparation of medicated feed (resp. furazolidon, furaltadon, nifursol)	9
Sampling and labelling	9
Identification of the samples	10
Animal and sample disposal	10
Relevant records	10
<b>GENERAL SECTION</b>	11
Final report	11
Sample storage	11
Maintenance of records	11
Changes or revisions	11
Unforeseen occurrences	11
Approval of study protocol	12
Appendix 1:	Indicative study schedule
Appendix 2:	DEC

## **GENERAL SUMMARY**

For the purpose of the determination of the metabolism and kinetics of nitrofurans (viz. furazolidon, furaltadon and nifursol) in poultry, guaranteed blank materials (liver, kidney, muscle, bile and plasma) as well as materials containing incurred residues of furazolidon, furaltadon and nifursol need to be available. Since those materials are not readily available, they need to be prepared in a controlled animal experiment.

Broilers will be treated with furazolidon, furaltadon and nifursol. The therapeutics will be administered via the usually route that is, via the feed. Dosage regime will be identical to (previously) registered application. Materials (liver, kidney, muscle, bile and plasma) will be collected at selected time intervals.

## **OBJECTIVE FOR THIS STUDY**

- Collection of incurred residue containing muscle, kidney, liver, bile and plasma samples from broilers for furazolidon, furaltadon and nifursol for determination of the kinetics and metabolism of furazolidon, furaltadon and nifursol.

## MATERIALS

### Test Products

#### *General*

After performance of the animal phase, the test substances will be retained at RIKILT for a period of 1 month after the completion of the whole study.

Toxicity of the test substances : not for human use  
Special handling required : avoid direct skin and eye contact with the drugs

#### *Identification and use of test product 1: FURAZOLIDON*

Name : Furazolidon  
International Non-proprietary Name : To be included in the final report  
Purity : "  
Registration number : "  
Batch number : "  
Expiry date : "  
Storage conditions : 4 – 8 °C  
Manufacturer : Sigma  
Certificate of analysis : available  
Route/method of administration : oral via feed during 7 consecutive days  
The recommended dosage : 200 mg furazolidon per kg feed during 7 days  
To supply : 10 g

#### *Identification and use of test product 2: FURALTADON*

Name : Furaltadon  
International Non-proprietary Name : To be included in the final report  
Purity : "  
Registration number : "  
Batch number : "  
Expiry date : "  
Storage conditions : 4 – 8 °C  
Manufacturer : Sigma  
Certificate of analysis : available  
Route/method of administration : oral via feed during 7 consecutive days  
The recommended dosage : 200 mg furaltadon per kg feed during 7 days  
To supply : 25 g



*Identification and use of test product 3: NIFURSOL*

Name	:	Nifursol
International Non-proprietary Name	:	To be included in the final report
Purity	:	"
Registration number	:	"
Batch number	:	"
Expiry date	:	"
Storage conditions	:	"
Manufacturer	:	"
Certificate of analysis	:	oral via feed during 7 consecutive days
Route/method of administration	:	200 mg nifursol per kg feed
The recommended dosage	:	during 7 days
To supply	:	10 g

## ANIMALS, HOUSING, FEEDING AND HEALTH

### Animals

#### *Species, strain and suppliers*

Species : Chickens: Broilers  
Strain : Ross  
Supplier : to be included in final report

#### *Specification*

Number : 100 (50 male and 50 female), divided at random into 3 groups of 30 (15 male and 15 female) and 1 blank (control) group of 10 animals (5 male and 5 female)  
Sex : male and female (equally divided), the birds will be sexed at hatching  
Health history : animals must be healthy by clinical look at arrival  
Start of the study : Day of arrival

#### *Identification*

All animals will be identified by a wing tag number at the start of experiment and assigned to a pen. Each pen will be identified with a pen number, wing tag numbers and treatment group-number.

#### *Body weight*

The birds will be weighed at fixed times during the study (see indicative study schedule, annex 1)

### Housing

At start of the study the birds will be held in floor pens after identification and randomisation. The first day of the week the animals arrive is regarded as day 1 of the study (see section experimental design).

Each pen will have separate drinking water and feed supplies.

During the study the housing will be as follows:

Type of housing : floor pens  
Number of animals per pen : maximal 30  
Water supply : free access  
Access to feed : free access

### Environmental conditions

During the whole study period the daily photoperiod will be 23 hours of light and 1 hour darkness. The temperature scheme will be according to the age of the animals. The room temperature will be recorded throughout the study.

### Feed

Each group will have separate feed supplies.

During the study the broilers will be fed a standard ration (starter feed the first 2 weeks of life and grower feed from week 3 till end) ad libitum. The birds will receive feed without nitrofurans other than those include in the study or growth promotants.

Name of diet	:	to be quoted in final report
Supplier/mixer	:	Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, The Netherlands.
Contact persons of mixer	:	G. Beelen or P. Roeleveld (phone 0343 59 22 43)
Certificate	:	Declaration of feed composition will be included in final report.
Group 1	:	medicated feed furazolidon (see annex 1)
Group 2	:	medicated feed furaltadon (see annex 1)
Group 3	:	medicated feed nifursol (see annex 1)
Group 4 = control group	:	blank feed (see annex 1)

### Water

Broilers will receive fresh drinking water ad libitum. Each group will have separate water supplies. There will be no known contaminants in the water that could adversely affect the results of the study.

### Animal Health

#### General observations

From the moment of arrival from the hatchery until the termination of the study the animals (flock) will be monitored daily for their general health by qualified zootechnicians supervised by a veterinarian. At the start of the study the birds will be visually examined for their health by a veterinarian on individual basis and selected for this study on basis of uniformity. The health status records will be included in the study file. Also the medication and vaccination history of the animals will be recorded in this file. The animals to be used for the study should be in good health and free from any apparent abnormalities or malformations. Non-healthy broilers will be excluded from the study and humanely terminated.

At any time during the course of the study, animals displaying disease symptoms or injuries will be excluded from the study.

All animals that have died will be destructed. In case abnormalities occur, the veterinarian, investigator and project leader will be notified immediately. Any clinical abnormalities will be recorded.

#### *Concomitant medication and vaccination*

Broilers will be vaccinated for Infectious Bronchitis and Newcastle's Disease (and Gumboro) at the hatchery prior to shipping to the test facility. Animals will receive the second NCD vaccination at onset of the premedication period. No other medication from the moment of arrival until termination of the animals will be applied.

#### *Inclusion criteria*

The broilers should meet the following criteria: animals have to be in good health and free from any apparent abnormalities and malformations, diagnosed by a veterinarian. In addition, no medication might be administered to the animals for at least 7 days prior to the start of treatment (including medicated feed).

#### *Drop-outs*

In the event that animals are culled from the study due to death, illness or injury, they will not be replaced.

## EXPERIMENTAL DESIGN

### Randomization and allocation

At hatch 100 birds will be randomly assigned to 4 groups (3 x 30 (15 male and 15 female) animals and 1 x 10 (5 male and 5 female) animals (control group)) and given wing tag numbers.

### Study design

The birds will be weighed at fixed times, according to the indicative study schedule (annex 1). During the medication period the groups 1, 2 and 3 (consisting each of 30 animals) will be dosed with respectively furazolidon (group 1), furaltadon (group 2) and nifursol (group 3) at a dosage of respectively 200, 200 and 200 mg/kg feed for 7 consecutive days.

The indicative study schedule is included in annex 1.

### Preparation of medicated feed (resp. furazolidon, furaltadon, nifursol)

Medicated feed will be prepared in a specialised small-scale facility. Measures will be taken to avoid carry-over of the feed additives in the subsequent production batches. Both the medicated and the non-medicated batches of feed will have the same composition. Feeds will be prepared using the pure substance, dosed at a concentration that was previously registered as feed additive for broilers.

### Sampling and labelling

#### *Feed sampling*

The medicated feed will be sampled after preparation and transported to RIKILT for analysis of the content of the active ingredient.

#### *Tissue and blood sampling (see study schedule, annex 1)*

Animals of groups 1, 2 and 3 will be slaughtered by decapitation at the day of cessation of medication (day 0) and day 3, 7, 14 and 21 after cessation of medication. Per slaughter moment 6 animals (3 male and 3 female) will be slaughtered. The animals of the blank group will be slaughtered by decapitation at day 37. The animals will be decapitated. Heparinised blood samples will be taken. Immediately after collection the heparinised samples will be frozen using liquid nitrogen. The animals will be slaughtered and liver, kidney, muscle (breast) and bile will be collected as soon as possible after slaughter without mutual contamination, appropriately labelled and deep frozen using liquid nitrogen in plastic containers. All samples will be immediately transported to RIKILT. At RIKILT the samples will be kept deep frozen at < -70 °C until further preparation for analysis. The procedure for preparation will be described in the final report.

### Identification of the samples

The plastic containers containing feed, tissue and plasma samples will be identified with a label stating the project number, species, treatment group, animal (wing tag) number, sample type (matrix) and (study) date.

### Animal and sample disposition

Animals (and carcasses remaining) after sample collection will be disposed of according to national requirements.

### Relevant records

RSV A0845: Registration forms for the use of animals at GLP studies (registratieformulieren voor proefdiergebruik bij GLP studies)

The final list of records will be specified in the final report and for use collected in a stable book per study.

## **GENERAL SECTION**

### Final report

After completion of the study a report including clinical data, assays results and plots will be made. The data concerning the animal phase will be included in an Appendix.

### Sample storage

The biological samples will be stored at  $< -70$  °C for at least 6 months after completion of the study.

### Maintenance of records

All protocols, operating procedures, raw data, reports, modifications and correspondence will be maintained in a central file. These records will be filed under RIKILT project number according to RIKILT standard operation procedure (RSV).

### Changes or revisions

All changes in or revisions of the approved protocol and the reasons therefore will be fully documented, signed by the investigator, dated, and maintained with the protocol. The project leader should agree in writing with any change or revision.

### Unforeseen occurrences

Any unforeseen occurrences will be fully documented and brought to the attention of the project leader.

## APPROVAL OF STUDY PROTOCOL

Signatures represent approval of the study protocol

### Zodiac (Animal section)

\_\_\_\_\_  
P. Mekking BSc  
(contact person)

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
R. Terluin  
(Local investigator)

\_\_\_\_\_  
Date

### RIKILT (sponsor)

\_\_\_\_\_  
C.D. de Gooijer Phd, MSc.  
Director

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
T. Zuidema, BSc.  
Project leader

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
B. Schat DVM, BSc., MSc.  
Investigator/ article 9

\_\_\_\_\_  
Date

### ID-LELYSTAD (DEC, Animal Experiment Committee)

\_\_\_\_\_  
P.S. Kroon MSC., DVM  
DEC art. 14 responsible

\_\_\_\_\_  
Date



## ANNEX 1

## INDICATIVE STUDY SCHEDULE

	Date	Day	Week	Groups 1, 2 and 3 (feed medication)	Group 4 (blank, control group)	Signature
Monday	6 jan	1				
Tuesday	7 jan	2				
Wednesday	8 jan	3				
Thursday	9 jan	4		Arrival; weighing feed	Arrival; weighing feed	
Friday	10 jan	5				
Saturday	11 jan	6				
Sunday	12 jan	7				
Monday	13 jan	8	Week 1			
Tuesday	14 jan	9				
Wednesday	15 jan	10				
Thursday	16 jan	11				
Friday	17 jan	12				
Saturday	18 jan	13				
Sunday	19 jan	14				
Monday	20 jan	15	Week 2	Weighing animals and feed	Weighing animals and feed	
Tuesday	21 jan	16				
Wednesday	22 jan	17				
Thursday	23 jan	18				
Friday	24 jan	19		Weighing animals and feed	Weighing animals and feed	
Saturday	25 jan	20				
Sunday	26 jan	21				
Monday	27 jan	22	Week 3	Start medicated feed 08:00 weighing feed Collection of feed samples		
Tuesday	28 jan	23		<b>Medicated feed</b>		
Wednesday	29 jan	24		<b>Medicated feed</b>		
Thursday	30 jan	25		<b>Medicated feed</b>		
Friday	31 jan	26		<b>Medicated feed</b> Weighing animals and feed	Weighing animals	
Saturday	1 feb	27		<b>Medicated feed</b>		
Sunday	2 feb	28		<b>Medicated feed</b>		

	Date	Day	Week	Groups 1, 2 and 3 (feed medication)	Group 4 (blank, control group)	Signature
Monday	3 feb	29	Week 4	<b>End of medicated feed;</b> Weighing animals and feed Slaughter incl. collection of bloodsamples moment I (day 0)	Weighing animals	
Tuesday	4 feb	30				
Wednesday	5 feb	31				
Thursday	6 feb	32		Slaughter incl. collection of bloodsamples moment II (day 3)		
Friday	7 feb	33				
Saturday	8 feb	34				
Sunday	9 feb	35				
Monday	10 feb	36	Week 5	Slaughter incl. collection of bloodsamples moment III (day 7)		
Tuesday	11 feb	37				
Wednesday	12 feb	38				
Thursday	13 feb	39				
Friday	14 feb	40				
Saturday	15 feb	41				
Sunday	16 feb	42				
Monday	17 feb	43	Week 6	Slaughter incl. collection of bloodsamples moment IV (day 14)		
Tuesday	18 feb	44			Slaughter incl. collection of bloodsamples all blank animals	
Wednesday	19 feb	45				
Thursday	20 feb	46				
Friday	21 feb	47				
Saturday	22 feb	48				
Sunday	23 feb	49				
Monday	24 feb	50	Week 7	Slaughter incl. collection of bloodsamples moment V (day 21)		

Tuesday	25 feb	51		Weighing feed		
---------	--------	----	--	---------------	--	--

Per slaughter moment 6 animals (3 females and 3 males) will be slaughtered

**Extra gegevens t.b.v. de registratie dierproeven en proefdieren:**

*a. Is er naar uw mening sprake van een wettelijke dierproef, d.w.z. ondervinden de dieren of een aantal daarvan naar verwachting ongerief (beïnvloeding van gedrag, welzijn, gezondheid, pijn, lijden of ongemak)*

***Er is naar mijn mening sprake van een wettelijke dierproef, maar het te verwachten ongerief voor de dieren is minimaal. De dieren worden gevoerd met nitrofuranen in een dosering die is toegestaan of in tijden van toelating op de markt was toegestaan. De slachtkuikens worden gedood d.m.v decapitatie.***

*b. Dierproefcodering (zie bijlagen 1 en 2 in de Toelichting*

*(L:\KWALITEITSAZAKEN\Huisstijl\InterneSjablonen\Toelichtingen\toelichting proefplan.doc)*

1. Bijzonderheid dier	1	8. Toxicologisch onderzoek	01
2. Diersoort	51	9. Bijzondere technieken	02
3. Herkomst dieren	5	10. Anaesthesie	1
4. Aantal dieren	100	11. Pijnbestrijding	1
5. Doel van de proef	07	12. Mate van ongerief	1
6. Belang van de proef	1	13. Toestand dier na beëindiging proef	1
7. Wettelijke bepalingen	7		

*c. Specificatie van het ongerief*

**Het voeren van diervoeder met nitrofuranen levert geen ongerief op. Slachtkuikens worden gedood d.m.v. decapitatie.**

- d. Zijn er alternatieven bekend : **Nee**  
 Welke : nvt  
 Waarom wordt van alternatief geen gebruik gemaakt : nvt
- e. Aanmelding COGEM : **Nee**  
 Zo ja, inschaling : (DI / DII)

## Werkelijk ongerief

Alleen invullen door afdeling diervozorging, na afloop van de proef, indien doorgemaakt ongerief afwijkt van opgegeven ongerief.

Projectnummer-proefplannummer: Nitrofurán broiler study

Onderzoeker B. Schat

Proefgroep	Aantal dieren	opgegeven ongerief	werkelijk ongerief	opmerkingen

Naam medewerker diervozorging:

Handtekening:

---

Als er wijzigingen zijn in mate van ongerief, dan alleen deze pagina inzenden naar:

P.S. Kroon  
Afdeling DB  
Artikel 14 functionaris  
telefoon (2)38561

---

## Amendment to protocol

<b>STUDY NR:</b> 71.782.01	<b>PROTOCOL DATE:</b> 18-11-02	<b>PAGE 1 OF 2</b>
-------------------------------	-----------------------------------	--------------------

<b>No.</b>	<b>Protocol page</b>	<b>Protocol section</b>
<b>1</b>		

The recommended dosage for Nifursol will be 50 mg nifursol per kg feed during 7 days, instead of 200 mg nifursol per kg feed. This dosage is identical to registered application.

The text of Materials, Test products (page 5) has changed in:

### *Identification and use of test product 3: NIFURSOL*

<i>Name</i>	:	<i>Nifursol</i>
<i>International Non-proprietary Name</i>	:	<i>To be included in the final report</i>
<i>Purity</i>	:	<i>10 g/kg</i>
<i>Registration number</i>	:	<i>"</i>
<i>Batch number</i>	:	<i>"</i>
<i>Expiry date</i>	:	<i>"</i>
<i>Storage conditions</i>	:	<i>"</i>
<i>Manufacturer</i>	:	<i>"</i>
<i>Certificate of analysis</i>	:	<i>"</i>
<i>Route/method of administration</i>	:	<i>oral via feed during 7 consecutive days</i>
<i>The recommended dosage</i>	:	<i>50 mg nifursol per kg feed during 7 days</i>
<i>To supply</i>	:	<i>150 g</i>

The text of EXPERIMENTAL DESIGN, Study design (page 90) has changed in:

### *Study design*

*The birds will be weighed at fixed times, according to the indicative study schedule (annex 1). During the medication period the groups 1, 2 and 3 (consisting each of 30 animals) will be dosed with respectively furazolidon (group 1), furaltadon (group 2) and nifursol (group 3) at a dosage of respectively 200, 200 and 50 mg/kg feed for 7 consecutive days.*

*The indicative study schedule is included in annex 1.*

<b>STUDY NR:</b> 71.782.01	<b>PROTOCOL DATE:</b> 18-11-02	<b>PAGE 2 OF 2</b>
-------------------------------	-----------------------------------	--------------------

<b>No.</b> 1	<b>Protocol page</b>	<b>Protocol section</b>
<p>During handling the medicated feed all the necessary precautions have to be taken to prevent skin contact. Pregnant women should not have any contact with the medicated feed, because nitrofurans are known to be teratogenic.</p>		
<b>Date</b>	<b>Sign Project leader</b>	
<b>Date</b>	<b>Sign Zodiac</b>	

DIEREXPERIMENTEN COMMISSIE ID-LELYSTAD B.V.  
erkend dd. 11 augustus 1997 onder nr. GZB/WB 974700

Aan: Dr. B. Schat

Div: RIKILT

Van: P.S. Kroon

kenmerk  
DEC0215

Plaats, datum  
Lelystad, 2 december 2002

onderwerp  
beoordeling proefplan

Geachte heer/ mevrouw

Tijdens de DEC-vergadering van 29 november 2002 is uw proefplan 71.782.01: collecting incurred samples (liver, kidney, muscle, bile and plasma) of broilers after oral administration of furazolidone, furaltadon and nifursol via feed, besproken. Het betreft een onderzoek naar de kinetiek en metabolisme van nitrofuranen en de residuvorming in organen en vlees van slachtkippen. Naar het oordeel van de DEC weegt het belang van het onderzoek op tegen het ongerief van de betrokken dieren en zijn voor het bereiken van dit doel geen alternatieven beschikbaar. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen met betrekking tot het gebruik van proefdieren.

Advies:

De Commissie adviseert positief. Het advies kent een geldigheidsduur van een jaar.

Indien zich wijzigingen voordoen in de aard van het onderzoek, waarbij het met name gaat om de gebruikte experimentele technieken, aantal dieren, soort dieren en dergelijke, verzoekt de commissie u dit te melden aan de Art. 14 functionaris



## **Bijlage 3**

### **Resultaten**

Tabel 3.1: Resultaten monsters groep 1

Rikiltnummer	Matrix	Dag	Totaal AOZ (µg/kg)	Totaal vrij AOZ (A+B+C) (µg/kg)	Gebonden AOZ (D) (µg/kg)	Furazolidon (µg/kg)
RIK0082405	plasma	0				127
RIK0082406	lever	0	1532			<5
RIK0082407	nier	0				<5
RIK0082408	vlees	0	602			<5
RIK0082409	gal	0				231
RIK0082410	plasma	0				1217
RIK0082411	lever	0	1766	1615	1406	<5
RIK0082412	nier	0				<5
RIK0082413	vlees	0	634	451	452	<5
RIK0082415	plasma	0				161
RIK0082416	lever	0	1582	1382	1059	<5
RIK0082417	nier	0				<5
RIK0082418	vlees	0	649	415	501	<5
RIK0082419	gal	0				299
RIK0082420	plasma	0	893			
RIK0082421	lever	0	1558			
RIK0082422	nier	0	2305			
RIK0082423	vlees	0	515			
RIK0082424	gal	0	12601			
RIK0082425	plasma	0	839			
RIK0082426	lever	0	1511			
RIK0082427	nier	0	2318	1948	979	
RIK0082428	vlees	0	646			
RIK0082429	gal	0	19762			
RIK0082430	plasma	0	743	673	70	
RIK0082431	lever	0	1639	1107	1289	
RIK0082432	nier	0	2376	1888	813	
RIK0082433	vlees	0	432	62	173	
RIK0082435	plasma	3				<5
RIK0082436	lever	3	475			<5
RIK0082437	nier	3				<5
RIK0082438	vlees	3	136			<5
RIK0082439	gal	3				<5
RIK0082440	plasma	3				<5
RIK0082441	lever	3	432	213	377	<5
RIK0082442	nier	3				<5
RIK0082443	vlees	3	210	60	180	<5
RIK0082444	gal	3				<5
RIK0082445	plasma	3				<5
RIK0082446	lever	3	388	248	336	<5

Rikilnummer	Matrix	Dag	Totaal AOZ (µg/kg)	Totaal vrij AOZ (A+B+C) (µg/kg)	Gebonden AOZ (D) (µg/kg)	Furazolidon (µg/kg)
RIK0082447	nier	3				<5
RIK0082448	vlees	3	166	53	141	<5
RIK0082449	gal	3				<5
RIK0082450	plasma	3	228			
RIK0082451	lever	3	429			
RIK0082452	nier	3	318			
RIK0082453	vlees	3	126			
RIK0082454	gal	3	512			
RIK0082455	plasma	3	204			
RIK0082456	lever	3	416			
RIK0082457	nier	3	440	168	295	
RIK0082458	vlees	3	138			
RIK0082459	gal	3	595			
RIK0082460	plasma	3	220	159	61	
RIK0082461	lever	3	402	199	411	
RIK0082462	nier	3	418	183	311	
RIK0082463	vlees	3	183	44	208	
RIK0082465	plasma	7				<5
RIK0082466	lever	7	137			<5
RIK0082467	nier	7				<5
RIK0082468	vlees	7	71			<5
RIK0082469	gal	7				<5
RIK0082470	plasma	7				<5
RIK0082471	lever	7	111	49	80	<5
RIK0082472	nier	7				<5
RIK0082473	vlees	7	63	13	59	<5
RIK0082474	gal	7				<5
RIK0082475	plasma	7				<5
RIK0082476	lever	7	126	55	71	<5
RIK0082477	nier	7				<5
RIK0082478	vlees	7	80	18	80	<5
RIK0082479	gal	7				<5
RIK0082480	plasma	7	92			
RIK0082481	lever	7	162			
RIK0082483	vlees	7	62			
RIK0082484	gal	7	71			
RIK0082485	plasma	7	126			
RIK0082486	lever	7	126			
RIK0082487	nier	7	148	40	108	
RIK0082488	vlees	7	68			
RIK0082489	gal	7	81			

Rikiltnummer	Matrix	Dag	Totaal AOZ (µg/kg)	Totaal vrij AOZ (A+B+C) (µg/kg)	Gebonden AOZ (D) (µg/kg)	Furazolidon (µg/kg)
RIK0082490	plasma	7	114	84	30	
RIK0082491	lever	7	105	55	97	
RIK0082492	nier	7	154	38	116	
RIK0082493	vlees	7	104	28	121	
RIK0082496	lever	14	43			
RIK0082498	vlees	14	34			
RIK0082501	lever	14	44	11	16	
RIK0082503	vlees	14	50	6,7	28	
RIK0082506	lever	14	45	27	21	
RIK0082508	vlees	14	47	13	30	
RIK0082511	lever	14	42			
RIK0082513	vlees	14	39			
RIK0082516	lever	14	55			
RIK0082517	nier	14	36	17	19	
RIK0082518	vlees	14	41			
RIK0082520	plasma	14	48	32	16	
RIK0082521	lever	14	50	23	38	
RIK0082522	nier	14	31	12	19	
RIK0082523	vlees	14	35	5,9	23	
RIK0082526	lever	21	13			
RIK0082528	vlees	21	14			
RIK0082531	lever	21	20	12	11	
RIK0082533	vlees	21	15	4,1	10	
RIK0082536	lever	21	16	7,5	29	
RIK0082538	vlees	21	17	1,9	12	
RIK0082541	lever	21	14			
RIK0082543	vlees	21	16			
RIK0082546	lever	21	25			
RIK0082547	nier	21	12	5,8	6,5	
RIK0082548	vlees	21	14			
RIK0082550	plasma	21	15	12	2,1	
RIK0082551	lever	21	20	12	17	
RIK0082552	nier	21	11	5,2	6,2	
RIK0082553	vlees	21	14	3,5	10	

Tabel 3.2: Resultaten monsters groep 2

Rikilnummer	Matrix	Dag	Totaal AMOZ (µg/kg)	Totaal vrij AMOZ (A+B+C) (µg/kg)	Gebonden AMOZ (D) (µg/kg)	Furaltadon (µg/kg)
RIK0082555	plasma	0				2508
RIK0082556	lever	0	7442			<5
RIK0082557	nier	0				<5
RIK0082558	vlees	0	1181			12
RIK0082559	gal	0				7779
RIK0082560	plasma	0				2046
RIK0082561	lever	0	7356	6916	6312	<5
RIK0082562	nier	0				<5
RIK0082563	vlees	0	1136	560	1432	11
RIK0082564	gal	0				348
RIK0082565	plasma	0				1678
RIK0082566	lever	0	5276	4728	4268	<5
RIK0082567	nier	0				<5
RIK0082568	vlees	0	1234	670	1549	3,5
RIK0082569	gal	0				1754
RIK0082570	plasma	0	1785			
RIK0082571	lever	0	5839			
RIK0082572	nier	0	6687			
RIK0082573	vlees	0	1465			
RIK0082574	gal	0	27943			
RIK0082575	plasma	0	2029			
RIK0082576	lever	0	5505			
RIK0082577	nier	0	5895	4757	2092	
RIK0082578	vlees	0	1001			
RIK0082579	gal	0	54459			
RIK0082580	plasma	0	2895	2762	133	
RIK0082581	lever	0	5904	5279	3476	
RIK0082582	nier	0	7508	8523	2888	
RIK0082583	vlees	0	1189	865	988	
RIK0082585	plasma	3				<5
RIK0082586	lever	3	2509			<5
RIK0082587	nier	3				<5
RIK0082588	vlees	3	373			<5
RIK0082589	gal	3				12
RIK0082590	plasma	3				<5
RIK0082591	lever	3	1842	1011	1345	<5
RIK0082592	nier	3				<5
RIK0082593	vlees	3	335	107	406	<5
RIK0082594	gal	3				<5
RIK0082595	plasma	3				<5

Rikiltnummer	Matrix	Dag	Totaal AMOZ (µg/kg)	Totaal vrij AMOZ (A+B+C) (µg/kg)	Gebonden AMOZ (D) (µg/kg)	Furaltadon (µg/kg)
RIK0082596	lever	3	2462	1564	1697	<5
RIK0082597	nier	3				<5
RIK0082598	vlees	3	227	65	373	<5
RIK0082599	gal	3				<5
RIK0082600	plasma	3	442			
RIK0082601	lever	3	2157			
RIK0082602	nier	3	1118			
RIK0082603	vlees	3	375			
RIK0082604	gal	3	715*			
RIK0082605	plasma	3	510			
RIK0082606	lever	3	1531			
RIK0082607	nier	3	1156	487	851	
RIK0082608	vlees	3	386			
RIK0082609	gal	3	1283			
RIK0082610	plasma	3	291	215	76	
RIK0082611	lever	3	1649	804	1444	
RIK0082612	nier	3	839	272	530	
RIK0082613	vlees	3	237	83	327	
RIK0082615	plasma	7				<5
RIK0082616	lever	7	296			<5
RIK0082617	nier	7				<5
RIK0082618	vlees	7	115			<5
RIK0082619	gal	7				<5
RIK0082620	plasma	7				<5
RIK0082621	lever	7	339	350	288	<5
RIK0082622	nier	7				<5
RIK0082623	vlees	7	155	38	253	<5
RIK0082624	gal	7				<5
RIK0082625	plasma	7				<5
RIK0082626	lever	7	353		354	<5
RIK0082627	nier	7				<5
RIK0082628	vlees	7	156	39	166	<5
RIK0082629	gal	7				<5
RIK0082630	plasma	7	301			
RIK0082631	lever	7	292			
RIK0082633	vlees	7	126			
RIK0082634	gal	7	388			
RIK0082635	plasma	7	187			
RIK0082636	lever	7	234			
RIK0082637	nier	7	313	99	214	
RIK0082638	vlees	7	113			

Rikilnummer	Matrix	Dag	Totaal AMOZ (µg/kg)	Totaal vrij AMOZ (A+B+C) (µg/kg)	Gebonden AMOZ (D) (µg/kg)	Furaltadon (µg/kg)
RIK0082639	gal	7	100			
RIK0082640	plasma	7	195	148	47	
RIK0082641	lever	7	415	135	533	
RIK0082642	nier	7	350	101	249	
RIK0082643	vlees	7	140	58	234	
RIK0082646	lever	14	220			
RIK0082648	vlees	14	76			
RIK0082651	lever	14	221		121	
RIK0082653	vlees	14	89	13	51	
RIK0082656	lever	14	188	120	104	
RIK0082658	vlees	14	94	16	75	
RIK0082661	lever	14	165			
RIK0082663	vlees	14	113			
RIK0082666	lever	14	233			
RIK0082667	nier	14	116	34	83	
RIK0082668	vlees	14	88			
RIK0082670	plasma	14	124	92	31	
RIK0082671	lever	14	161	78	95	
RIK0082672	nier	14	128	40	87	
RIK0082673	vlees	14	108	26	109	
RIK0082676	lever	21	78			
RIK0082678	vlees	21	41			
RIK0082681	lever	21	86	39	41	
RIK0082683	vlees	21	29	6,8	21	
RIK0082686	lever	21	98	59	55	
RIK0082688	vlees	21	43	6,3	29	
RIK0082691	lever	21	111			
RIK0082693	vlees	21	34			
RIK0082696	lever	21	105			
RIK0082697	nier	21	32	16	16	
RIK0082698	vlees	21	39			
RIK0082700	plasma	21	46	36	9,7	
RIK0082701	lever	21	126	72	57	
RIK0082702	nier	21	36	17	19	
RIK0082703	vlees	21	30	8,8	35	

\* Hele gal in bewerking genomen

Tabel 3.3: Resultaten monsters groep 4

Rikiltnummer	Matrix	Totaal metabolieten (µg/kg)	Furazolidon (µg/kg)	Furaltadon (µg/kg)
RIK0082855	plasma		<5	<5
RIK0082856	lever		<5	<5
RIK0082857	nier		<5	<5
RIK0082858	vlees		<5	<5
RIK0082859	gal		<5	<5
RIK0082860	plasma		<5	<5
RIK0082861	lever		<5	<5
RIK0082862	nier		<5	<5
RIK0082863	vlees		<5	<5
RIK0082864	gal		<5	<5
RIK0082866	lever	<0,5		
RIK0082867	nier	<0,5		
RIK0082868	vlees	<0,5		
RIK0082869	gal	<0,5		
RIK0082870	plasma	1,28 (AM0Z)		
RIK0082871	lever	<0,5		
RIK0082872	nier	<0,5		
RIK0082873	vlees	<0,5		
RIK0082874	gal	<0,5		
RIK0082875	plasma	<0,5		

Tabel 3.4: Resultaten voermonsters

Rikiltnummer	Datum	Soort voer	Zaknr.	Furazolidon (mg/kg)	Furaltadon (mg/kg)
RIK0097376	17-jan	blanco start	7	<0,005	<0,001
RIK0097377	2-jan	furazolidon		183	0,002
RIK0097378	27-jan	furazolidon	1	186	0,001
RIK0097379	2-jan	furaltadon		0,34	209
RIK0097380	27-jan	furaltadon	1	0,19	194
RIK0097383	2-jan	blanco groei		0,005	0,007
RIK0097384	27-jan	blanco groei	26	0,005	0,005
RIK0097385	3-feb	blanco groei	27	<0,005	0,004



## **Bijlage 4**

**Schematische weergave van de procedure voor het bepalen van de metabolieten van nitrofuranen**

## Schematische weergave van de procedure

- weeg in een 14 ml centrifugebuis  $1.0 \pm 0.05$  g af van een gehomogeniseerd monster
- voeg  $40 \mu\text{L}$  IS mengsel ( $50 \mu\text{g/l}$ ) toe
- equilibreer gedurende 15 min

- voeg 5 ml 0.2 M HCl en  $50 \mu\text{L}$  100 mM NBA in methanol toe
- homogeniseer dmv krachtig schudden
- incubeer 16 h at  $37^\circ\text{C}$
- af laten koelen tot kamertemperatuur

- voeg  $250 \mu\text{L}$  0.3 M trinitiumfosfaat oplossing toe en meng
- voeg 2 M NaOH-oplossing toe tot  $\text{pH } 7 \pm 0.5$
- schud krachtigen check pH with pH-stick

- voeg 4 ml ethylacetaat toe
- extraheer gedurende 20 min
- centrifugeer 10 min bij 2000 rpm
- decanteer de ethylacetaatfractie in een 14 ml buis
- voeg 4 ml ethylacetaat toe
- extraheer gedurende 20 min
- centrifugeer 10 min bij 3500 rpm
- decanteer de ethylacetaatfractie en voeg deze samen met de 1<sup>o</sup> fractie
- damp de verzamelde fracties droog onder  $\text{N}_2$

- neem op in  $500 \mu\text{L}$  acetonitril / 0.1% azijnzuur (1/9)
- filtreer mbv  $0,45 \mu\text{m}$  Acrodisc filter
- breng extract over in een LC-vial