

Project 404.0841

Therapeutisch, farmacokinetisch en toxicologisch onderzoek van
sulfonamiden toegediend aan varkens

Projectleider dr ir H.A. Kuiper

Rapport 90.22

November 1990

De bepaling van sulfadimethoxine,
sulfamethoxazol, trimethoprim en hun
belangrijkste metabolieten in
varkensplasma en -urine m.b.v. HPLC

ing. M.B.M. Huveneers-Oorsprong
drs M.J.B. Mengelers

Afdeling: Toxicologie

Goedgekeurd door: dr ir H.A. Kuiper

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

afdeling Toxicologie (10x)

afdeling Diergeneesmiddelen (2x)

programmabeheer en informatieverzorging

circulatie

bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden

Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

Veterinaire Dienst

Produktschap voor Vee en Vlees

Inspectie Gezondheidsbescherming Utrecht/Keuringsdienst voor Waren

(dhr H.W. van Gendt)

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Utrecht

(dr A.J. de Neeling)

Radboud Ziekenhuis Nijmegen (dr T. Vree)

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees, Kring Nijmegen

(dr J.F.M. Nouws)

Centraal Laboratorium van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en

Vlees (dhr L.M.H. Frijns) (2x)

Vakgroep Veterinaire Basiswetenschappen, Rijks Universiteit Utrecht

(dr A.G. Vulto, prof. dr A.S.J.P.A.M. v. Miert)

Vakgroep Bedrijfsdiergeneeskunde en Voortplanting, Rijks Universiteit
Utrecht (drs A. Pijpers, prof. dr J.H.M. Verheyden)

Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong, Rijks Universiteit
Utrecht (mw dr N. Haagsma)

Intervet, Boxmeer (dr M.M.L. Aerts)

dr H. van Gogh

drs E.R. van Gogh

drs P. Hougee

Agralin

ABSTRACT

De bepaling van sulfadimethoxine, sulfamethoxazol, trimethoprim en hun belangrijkste metabolieten in varkensplasma en -urine m.b.v. HPLC

The determination of sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, trimethoprim and their main metabolites in porcine plasma and urine by HPLC (in Dutch)

Report 90.22 November 1990

M.B.M. Huveneers-Oorsprong and M.J.B. Mengelers

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

2 tables, 2 figures, 7 references

A method for the determination of sulfadimethoxine (SDM), sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP) and their main metabolites, both free and conjugated, in porcine plasma and urine of treated animals is reported.

Using an uniform sample-pretreatment the sulfonamides and their metabolites can be determined separately from TMP and its metabolites by high-performance liquid chromatography.

The investigated metabolites were N₄-acetyl sulfadimethoxine (N₄SDM), N₄-acetyl sulfamethoxazole (N₄SMX), 4'-hydroxy trimethoprim (M1) and 3'-hydroxy trimethoprim (M4).

The mean recoveries for M1 were more than 80% while the mean recoveries for the other compounds were over 90%.

The limits of detection in plasma were 15 ng/ml for SDM and N₄SDM, 25 ng/ml for SMX, N₄SMX and TMP and 50 ng/ml for M1 and M4, while the estimated detection limits in urine were ten times higher.

Keywords: sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, trimethoprim, metabolites, determination, plasma, urine

()

()

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 MATERIALEN EN METHODEN	8
2.1 Chemicaliën	8
2.2 Apparatuur	8
2.3 Overige benodigdheden	8
2.4 Spiken van de monsters	9
2.4.1 Plasma spiken	9
2.4.2 Urine spiken	9
2.5 Voorzuivering van plasma	9
2.5.1 Sulfonamiden en metabolieten	9
2.5.2 TMP en metabolieten	10
2.5.3 Deglucuronideren van sulfonamiden en metabolieten	10
2.5.4 Deglucuronideren van TMP en metabolieten	11
2.6 Voorzuivering van urine	11
2.6.1 Sulfonamiden en metabolieten	11
2.6.2 TMP en metabolieten	11
2.6.3 Deglucuronideren van SDM	12
2.6.4 Deglucuronideren van TMP en metabolieten	12
2.7 HPLC-condities	13
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	14
3.1 Ontwikkeling methode	14
3.2 Lineariteit	17
3.3 Detectielimieten	17
3.4 Recovery	17
3.5 Toepassing	18
4 CONCLUSIE	18
LITERATUUR	19
BIJLAGEN	
A FIGUREN 1-2	
B TABELLEN 1-2	

()

()

SAMENVATTING

Een analysemethode is opgezet voor de bepaling van sulfadimethoxine (SDM), sulfamethoxazol (SMX), trimethoprim (TMP) en hun belangrijkste metabolieten, zowel vrij als geconjugeerd, in plasma en urine van behandelde varkens.

De onderzochte metabolieten zijn N_4 -acetylsulfadimethoxine (N_4 SDM), N_4 -acetylsulfamethoxazol (N_4 SMX), 4'-hydroxytrimethoprim (M1) en 3'-hydroxytrimethoprim (M4).

De plasma monsters worden, eventueel na deglucuronidatie, onteiwit met behulp van acetonitril; urine wordt door middel van centrifugeren van vaste deeltjes ontdaan. Vervolgens worden met behulp van een solid phase extractie en een terugextractie de sulfonamiden en TMP gescheiden opgewerkt. Met behulp van een "on-line" preconcentreringskolom worden de farmaca geconcentreerd en eventueel nog aanwezige polaire storende stoffen uit de extracten verwijderd. Tenslotte worden de sulfonamiden en hun metabolieten afzonderlijk van TMP en zijn metabolieten bepaald met behulp van hoge-druk vloeistofchromatografie. De gemiddelde recoveries voor M1 waren groter dan 80%, terwijl de gemiddelde recoveries van de andere verbindingen groter dan 90% waren. De detectielimieten in plasma waren 15 ng/ml voor SDM en N_4 SDM, 25 ng/ml voor SMX, N_4 SMX en TMP en 50 ng/ml voor M1 en M4. De geschatte detectielimieten in urine waren tien keer hoger.

()

()

1 INLEIDING

Zowel in de humane als de veterinaire geneeskunde worden sulfonamiden, in combinatie met trimethoprim, gebruikt als antibacterieel middel bij uiteenlopende bacteriële infecties. Onze interesse gaat uit naar de preventie en de behandeling van luchtweginfecties bij biggen met behulp van deze farmaca.

Voor de structuurformules zie fig. 1.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat sulfadimethoxine (SDM) en sulfamethoxazol (SMX) een hoge antimicrobiële activiteit in vitro vertonen tegen de luchtwegpathogenen *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* en *Haemophilus pleuropneumoniae* [Mengelers et al, 1989^a].

Bij *Haemophilus pleuropneumoniae* trad een synergisme op tussen de sulfonamiden en trimethoprim (TMP) [Mengelers et al, 1990].

Sulfonamiden en trimethoprim kunnen zowel chemisch als microbiologisch bepaald worden. De bestaande methoden vertonen een of combinaties van de volgende nadelen: er worden geen metabolieten en/of conjugaten bepaald, de detectielimiet is te hoog of de bepaling is niet reproduceerbaar.

Het doel van dit onderzoek was dan ook het ontwikkelen van een routinematig toe te passen analysemethode met een voldoende lage detectielimiet voor SDM, SMX, TMP en hun belangrijkste metabolieten in varkensplasma en -urine ten behoeve van farmacokinetisch en residu-toxicologisch onderzoek. De kwantitatieve gehaltebepaling dient betrouwbaar te zijn over een groot concentratiebereik (0,05-100 µg/ml in het geval van de sulfonamiden en 0,05-10 µg/ml in het geval van TMP) om zodoende het concentratieverloop van de farmaca en eventuele metabolieten na toediening aan biggen in de tijd te kunnen volgen. De onderzochte metabolieten zijn N₄-acetylsulfadimethoxine (N₄SDM), N₄-acetylsulfamethoxazol (N₄SMX), 4-hydroxytrimethoprim (M1) en 3-hydroxytrimethoprim (M4).

Er werd een analysemethode opgezet waarbij alle verbindingen volgens een uniforme methode kunnen worden voorgezuiverd en de sulfonamiden en hun metabolieten afzonderlijk van trimethoprim en zijn metabolieten bepaald kunnen worden met behulp van HPLC met UV-detectie.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Chemicaliën

Alle chemicaliën waren van analytische kwaliteit, triëthylamine was van de firma Fluka, en alle andere chemicaliën waren van de firma Merck.

Water werd bereid met een Milli QR waterzuiveringsinstallatie (Millipore).

SDM, SMX, TMP en glucuronidase waren afkomstig van de firma Sigma. N_4 SDM en N_4 SMX waren een gift van dr T. Vree (Radboud ziekenhuis Nijmegen), M1 was een gift van de firma Wellcome Nederland BV en M4 was een gift van de firma Hoffman-La Roche BV.

2.2 Apparatuur

Mengapparaten: Vortex-evaporator (Buchler; du Mee) en vibrofix VF1 (Janke en Kunkel).

Centrifuges: micro-rapid (Hettich) en RC-3B refrigerated centrifuge (Sorvall-instruments).

HPLC: PROMIS autosampler (Kratos); MUST kolomschakelaar (Kratos); 2 Spectroflow 400 pompen (Kratos); kolomthermostaat (Kratos); Spectroflow 783 UV-Detector (Kratos); dubbelpens recorder (Kratos); HPLC-Programmer (Kratos); 900 Series Interface integrator (Nelson Analytical) gekoppeld aan een M28 personal computer (Olivetti).

2.3 Overige benodigdheden

Buizen voor plasma-winning: Monovette (Li-heparine) (Sarstedt).

Centrifugebuizen: Polypropyleen met stop (Greiner).

Reageerbuizen: Glas (kort:100x15/16, lang:160x15/16) (Renes).

Glucuronidase-vials: β -glucuronidase (Escherichia coli) 1000 U per vial, zonder buffer (Sigma).

HPLC-vials: glas 1 ml met crimptop (ATS).

pH-papier: 4,0-7,0 en 6,5-10,0 (Merck).

Extrelut-kolom: Extrelut-kolom 0,1-1,0 ml (Merck), verbonden met een uitloopcanule (luer-naald (Terumo)), geplaatst in een lange reageerbuis.

HPLC-kolommen:

Preconcentreringskolommen: PLRP-S, 100 Å, 15-25 micron (Polymer Laboratories) 10 x 2.1 mm (L x I.D.), Bondapak C18/Corasil 37-50 micron (Waters) 10 x 2.1 mm (L x I.D.)

Voorkolom: RP18 (Chrompack); 10 x 2.1 mm (L x I.D.)

Analytische kolom: Chromspher C18 (Chrompack) 200 x 3.0 mm (L x I.D.)

2.4 Spiken van de monsters

2.4.1 Plasma spiken

Voor de bepaling van de recovery en de van-dag-tot-dag variatie in gemeten farmacon-gehaltenes worden aan blanco plasmamonsters 25 of 50 µl van een geconcentreerde stock-oplossing van SMX, SDM, TMP of een van hun metabolieten toegevoegd aan 975 respectievelijk 950 µl blanco plasma en vervolgens wordt gemengd op een vibrofix. Wacht 30 min. om eventuele eiwitbinding op te laten treden en werk de monsters verder op zoals beschreven onder 2.5.

2.4.2 Urine spiken

Voor de bepaling van de recovery en de van-dag-tot-dag variatie worden na centrifugeren van blanco urinemonsters gedurende 10 min. bij 10.000 x g aan 975 respectievelijk 950 µl supernatant 25 respectievelijk 50 µl van een geconcentreerde stock-oplossing van SMX, SDM, TMP of een van hun metabolieten toegevoegd. Meng dit op een vibrofix en werk de monsters verder op zoals beschreven onder 2.6.

2.5 Voorzuivering van plasma

2.5.1 Sulfonamiden en metabolieten

Voeg per ml plasma 1 ml acetonitril toe en meng dit op een vibrofix. Laat dit 10 min. staan, meng opnieuw, en centrifugeer het eiwitneerslag af in een afgesloten centrifugebuis bij 10.000 x g (10 min.). Voeg per ml supernatant 100 µl 0,5 M ammoniumacetaatbuffer pH 3,5 (op pH gebracht met gec. HCl) toe en meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu ca. 4,5). Breng hiervan zo spoedig mogelijk 1 ml op een Extrelut-kolom.

*Elueer de kolom na 10 min. met 2 keer 3 ml dichloormethaan en voeg aan het eluaat 1 ml 0,05 M KOH toe. Extraheer door 10 min. op een vortex-evaporator te mengen. De reageerbuizen worden gecentrifugeerd bij 300 x g gedurende 2 min. voor een complete fasenscheiding en de waterfase wordt afgepipetteerd en overgebracht in kleine reageerbuizen. Plaats deze buizen 10 s onder een stikstofstroom om sporen dichloormethaan te verdampen en breng 600 µl monster over in een HPLC-vial. Breng het monster op pH 4,0-5,0 met ca. 25 µl 1 M fosforzuur. Meng dit op een vibrofix en injecteer hiervan 200-500 µl op de preconcentreringskolom. Concentraties vanaf 10 µg/ml worden in de vial 10 maal verdund met preconcentreringsoplossing.

2.5.2 TMP en metabolieten

Voeg per ml plasma 1 ml acetonitril toe en meng dit op een vibrofix. Laat dit 10 min. staan, meng opnieuw, en centrifugeer het eiwitneerslag af in een afgesloten centrifugebuis bij 10.000 x g (10 min.). Voeg per ml supernatant 20 µl 0,5 M kaliumfosfaatbuffer pH 6,6 (op pH gebracht met 10 M KOH) toe en meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu ca. 8). Breng hiervan 1 ml op een Extrelut-kolom.

*Elueer de kolom na 10 min. met 2 keer 3 ml dichloormethaan/i-propanol (95/5,v/v) en voeg aan het eluaat 1 ml 0,05 M fosforzuur toe. Extraheer door 10 min. op een vortex-evaporator te mengen. De reageerbuizen worden gecentrifugeerd bij 300 x g gedurende 2 min. voor een complete fasenscheiding en de waterfase wordt afgepipetteerd en overgebracht in kleine reageerbuizen. Plaats deze buizen 10 s onder een stikstofstroom om sporen dichloormethaan/i-propanol te verdampen en breng 600 µl monster over in een HPLC-vial. Breng het monster in de vial met ca. 45 µl 1 M KOH op pH 6,0-7,0. Meng dit op een vibrofix en injecteer hiervan 200-500 µl op de preconcentreringskolom.

2.5.3 Deglucuronideren van sulfonamiden en metabolieten

Pipetteer in de glucuronidase-vials 1,2 ml plasma en 300 µl 0,5 M kaliumfosfaatbuffer pH 6,8 (op pH gebracht met 10 M KOH), meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu 6,8-7,0) en incubeer 16 uur bij 37°C. Meng dit op een vibrofix. Pipetteer het monster over in een centrifugebuis. Voeg een gelijk volume acetonitril toe en meng dit op

een vibrofix. Laat dit 10 min. staan, meng opnieuw, en centrifugeer het eiwitneerslag af in een afgesloten centrifugebuis bij 10.000 x g (10 min.). Voeg per ml ca. supernatant 32 µl 1 M fosforzuur toe en meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu ca. 4,5). Breng hiervan zo spoedig mogelijk 1 ml op een Extrelut-kolom.

Werk de monsters verder op zoals beschreven onder 2.5.1, vanaf *.

2.5.4 Deglucuronideren van TMP en metabolieten

Pipetteer in de glucuronidase-vials 1,2 ml plasma en 300 µl 0,5 M kaliumfosfaatbuffer pH 6,8 (op pH gebracht met 10 M KOH), meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu 6,8-7,0) en incubeer 16 uur bij 37°C. Meng dit op een vibrofix. Pipetteer het monster over in een centrifugebuis. Voeg een gelijk volume acetonitril toe en meng dit op een vibrofix. Laat dit 10 min. staan, meng opnieuw, en centrifugeer het eiwitneerslag af in een afgesloten centrifugebuis bij 10.000 x g (10 min.). Voeg per ml supernatant 9 µl 1 M KOH toe en meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu ca. 8). Breng hiervan 1 ml op een Extrelut-kolom.

Werk de monsters verder op zoals beschreven onder 2.5.2, vanaf *.

2.6 Voorzuivering van urine

2.6.1 Sulfonamiden en metabolieten

Centrifugeer de urine 10 min. bij 10.000 x g. Voeg aan 0,5 ml supernatant 1 ml water, 1,5 ml 1 M kaliumfosfaatbuffer pH 6,6 (op pH gebracht met 10 M KOH) en ca. 100 µl 7,5 M fosforzuur toe en meng dit op een vibrofix (de pH van het monster is nu ca. 4,5). Breng hiervan 1 ml op een Extrelut-kolom.

Werk de monsters verder op zoals beschreven voor plasma (zie 2.5.1 vanaf *).

2.6.2 TMP en metabolieten

Centrifugeer de urine 10 min. bij 10.000 x g. Voeg aan 0,5 ml supernatant 1 ml water, 1,5 ml 1 M kaliumfosfaatbuffer pH 6,6 (op pH gebracht met 10 M KOH) en ca. 60 µl 10 M KOH toe en meng dit op een vibrofix

(de pH van het monster is nu ca. 8). Breng hiervan 1 ml op een Extre-
lut-kolom.

Werk de monsters verder op zoals beschreven voor plasma (zie 2.5.2
vanaf *).

2.6.3 Deglucuronideren van SDM

Centrifugeer de urine 10 min. bij 10.000 x g. Pipetteer in de glucuro-
nidase-vial 0,5 ml van het supernatant, 1 ml water en 1,5 ml 1 M
kaliumfosfaatbuffer pH 6,6 (op pH gebracht met 10 M KOH), meng dit op
een vibrofix (de pH van het monster is nu 6,8-7,0) en incubeer 16 uur
bij 37°C. Voeg ca. 100 µl 7,5 M fosforzuur toe en meng dit op een
vibrofix (de pH van het monster is nu ca. 4,5). Breng hiervan 1 ml op
een Extrelut-kolom.

Werk de monsters verder op zoals beschreven voor plasma (zie 2.5.1
vanaf *).

2.6.4 Deglucuronideren van TMP en metabolieten

Centrifugeer de urine 10 min. bij 10.000 x g. Pipetteer in de
glucuronidase-vials 0,5 ml van het supernatant, 1 ml water en 1,5 ml 1
M kaliumfosfaatbuffer pH 6,6 (op pH gebracht met 10 M KOH), meng dit
op een vibrofix (de pH van het monster is nu 6,8-7,0) en incubeer 16
uur bij 37°C. Voeg ca. 60 µl 10 M KOH toe en meng dit op een vibrofix
(de pH van het monster is nu ca. 8). Breng hiervan 1 ml op een
Extrelut-kolom.

Werk de monsters verder op zoals beschreven voor plasma (zie 2.5.2
vanaf *).

2.7 HPLC-condities

Tijdschema:

t(min.)	actie
0	inj. van 200-500 µl monster op de preconcentreringskolom, start recorder en auto zero.
4	omschakeling van de kraan (MUST) waardoor het monster van de preconcentreringskolom wordt geëluëerd in de backflush mode, (injectie-)markering, auto zero en start integrator.
6	kraan schakelen (MUST) in oorspronkelijke positie.
19	stop integrator.
26	einde run.

Preconcentratie:

De monsters worden d.m.v. fosfaat-oplossingen met een flow van 1,0 ml per min. bij kamertemperatuur op de preconcentreringskolom gebracht. In het geval van de bepaling van sulfonamiden en metabolieten wordt 0,05 M kaliumdiwaterstoffosfaat (pH 4,6) gebruikt en in het geval van TMP en metabolieten 0,05 M dikaliumwaterstoffosfaat (op pH 8,2 gebracht met 0,05 M kaliumdiwaterstoffosfaat).

Voor de preconcentratie wordt een pakkingsmateriaal, gebaseerd op een co-polymeer (PLRP-S), gebruikt.

Analyse:

Voor de eluentia worden mengsels van 0,05 M kaliumdiwaterstoffosfaat (opl. A) met acetonitril gebruikt bij een flow van 0,8 ml per min. en een kolomtemperatuur van 30°C. Triëthylamine (TEA) wordt gebruikt als competitieve base en om alle eluentia op de gewenste pH te brengen. De samenstelling van de eluentia is als volgt:

	pH	opl. A/ acetonitril
SDM, N ₄ SDM	6,5	85/15
SMX, N ₄ SMX	5,6	88/12
TMP, M1, M4	6,0	90/10

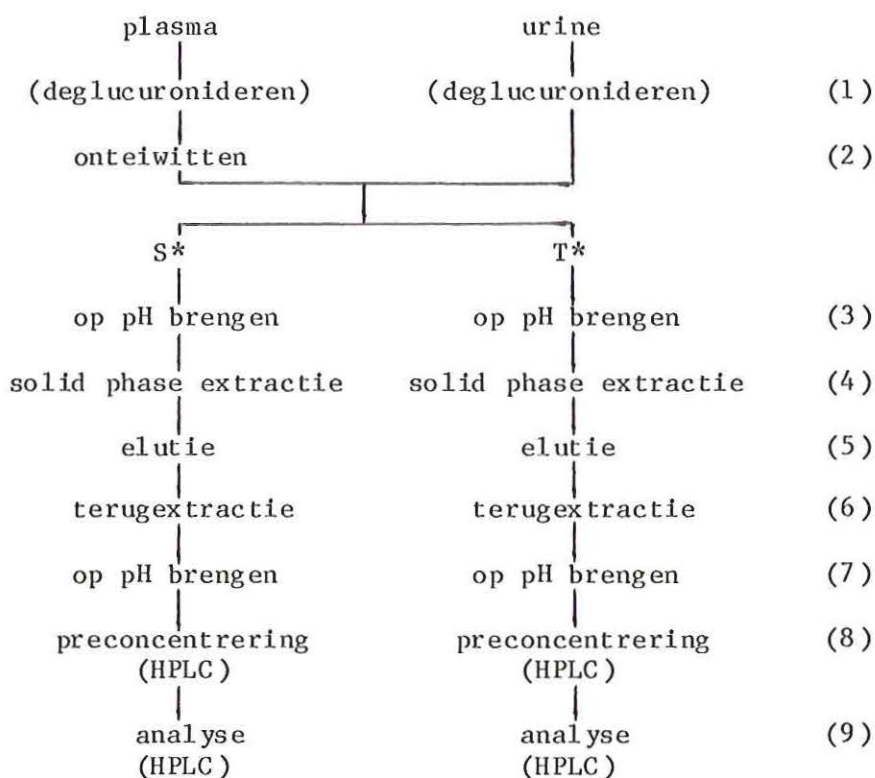
Detectie:

De sulfonamiden en metabolieten worden bij een golflengte van 270 nm gedetecteerd, TMP en metabolieten bij 230 nm.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Ontwikkeling methode

Schematisch ziet de methode er als volgt uit:



* S: sulfonamiden en acetyl-metabolieten.
T: trimethoprim en hydroxy-metabolieten.

- (1) In sommige gevallen werden de monsters gedeglucuronideerd. De onderzochte verbindingen zijn stabiel tijdens de incubatie.
(2) Plasma werd onteiwit met behulp van acetonitril. Gezien de hoge recovery en de goede reproduceerbaarheid was het niet nodig het pellet te wassen. Verschillende methoden voor onteiwitten zijn onderzocht.

1. Fosforzuur gaf geen eiwitneerslag en een slechte recovery.
 2. Methanol gaf een fijn eiwitneerslag, wat moeilijk af te centrifugeren was, bovendien was de recovery laag.
 3. Perchloorzuur gaf een grof eiwitneerslag en een lage, niet reproduceerbare recovery. Vermoedelijk vindt hier insluiting plaats.
- (3) Het monster werd daarna op een pH gebracht, waarbij het geneesmiddel niet geïoniseerd is en bij extractie met dichloormethaan in de organische fase over zou gaan. Voor de sulfonamiden (pK_a SDM=6,3, pK_a SMX=6,0 [Rieder, 1963]) bleek een pH van ca. 4,5 een goed resultaat te geven; voor TMP en metabolieten (pK_a TMP=7,2 [Clarke, 1986]) was dit een pH van ca. 8.
- (4) De Extrelut-kolom hield nog polaire storende stoffen vast omdat bij weglaten van de kolom (monster/acetonitril-mengsel indampen, opnemen in zuur of base, wassen met dichloormethaan) meer storende pieken in het begin van het chromatogram voorkomen.
- (5) De farmaca werden met dichloormethaan geëluëerd, waarbij de in acetonitril oplosbare componenten gedeeltelijk meegeëluëerd werden. Als elutiemiddel is ook ethylacetaat onderzocht, maar hierbij werden te veel (polaire) storende stoffen meegeëluëerd. In verband met de extractie van de polaire hydroxy-metabolieten van TMP is de polariteit van de dichloormethaan met behulp van i-propanol verhoogd.
- (6) Vervolgens werden de sulfonamiden/TMP (en metabolieten) teruggeëxtraheerd in een basisch respectievelijk zuur milieu waarin ze in geïoniseerde vorm voorkomen.
- (7) In de HPLC-vial werden de monsters die sulfonamiden en metabolieten bevatten weer op een pH gebracht, waarbij de farmaca in ongeïoniseerde vorm voorkomen. De monsters die TMP en metabolieten bevatten werden op pH 6,0-7,0 gebracht in verband met de instabiliteit van M1 bij hogere pH.
- (8) De preconcentreringskolom werd gebruikt om de farmaca te concentreren en om nog aanwezige polaire storende stoffen te verwijderen. De wasvloeistof was van een zodanige pH dat de farmaca op de preconcentreringskolom in ongeïoniseerde vorm voorkomen. Voor de preconcentratie werden twee verschillende soorten pakkingsmateriaal en effectieve wasvolumes van 1, 2, 4 en 6 ml getest.

Een type materiaal is gebaseerd op silicagel, gecoat met octadecylgroepen (Bondapak C18/corasil), waardoor TMP en zijn metabolieten niet geconcentreerd konden worden met een bufferoplossing van pH 8,2 aangezien het materiaal daar niet tegen bestand is. Preconcentratie met water gaf een doorslag van de metabolieten van TMP na een wasvolume van meer dan 1 ml. De preconcentratie van de sulfonamiden en hun metabolieten werd uitgevoerd met een bufferoplossing van pH 4,6. SDM en N_4 SDM werden kwantitatief geconcentreerd met een wasvolume van 1 ml. Na 2, 4 en 6 ml echter was het percentage verlies aan SDM respectievelijk 4,3, 18,4 en 40,4. N_4 SDM vertoonde een doorbraak na een wasvolume van 6 ml. SMX en N_4 SMX vertoonden al doorbraak na 1 ml.

Het andere onderzochte pakkingsmateriaal (PLRP-S) is gebaseerd op polymeer-materiaal. Aangezien dit materiaal bestand is tegen hoge pH konden TMP en zijn metabolieten bij pH 8,2 geconcentreerd worden. Voor de preconcentratie van de sulfonamiden en hun metabolieten werd een bufferoplossing van pH 4,6 gebruikt. Alle onderzochte verbindingen vertoonden complete retentie op het PLRP-S materiaal, zelfs na een wasvolume van 6 ml. Preconcentrerings van geëxtraheerde plasmamonsters toonde aan dat met een wasvolume van 4 ml storende matrix-componenten werden verwijderd. Verhoging van het wasvolume verwijderde geen extra storende matrix-componenten. De verbindingen werden al volledig geëluëerd met een backflush-periode van 1-2 minuten met een eluens met minimaal 10% acetonitril.

(9) Tenslotte werden de componenten op de analytische kolom gescheiden. Als eluens is ook methanol/fosfaatbuffer onderzocht, maar hiermee werd een minder goede scheiding van de componenten verkregen.

TMP vertoonde een sterke tailing welke verminderd kon worden door triëthylamine aan het eluens toe te voegen. Vervolgens is deze base gebruikt om alle eluentia op pH te brengen.

Eventuele onvoorziene stoorpieken konden steeds worden gescheiden van de te bepalen componenten door kleine variaties in de pH en/of het percentage acetonitril.

Sulfonamiden en hun metabolieten vertoonden fronting bij zeer hoge concentraties (b.v. 100 µg/ml). Dit is naar alle waarschijnlijkheid te wijten aan het feit dat de analyt zich niet meer vooraan op het preconcentreringskolommetje bevindt maar over de gehele lengte van het kolommetje is verdeeld. Zodoende kan in de "backflush-mode", mede

dankzij de grove korrel van het pakkingsmateriaal, een gedeelte van de analyt eerder elueren dan de rest.

Daarom werden monsters met hoge concentraties verdund tot een concentratie kleiner of gelijk aan 10 µg/ml.

3.2 Lineariteit

De ijklijnen bleken lineair in het onderzochte concentratiegebied (0,05-100 µg/ml). De correlatie-coëfficiënt was over het algemeen hoger dan 0,999.

3.3 Detectielimieten

De detectielimiet werd gedefinieerd als de hoeveelheid analyt die resulteerde in een piekoppervlakte van drie keer de ruis in de basislijn van een blanco monster. De detectielimieten voor plasma zijn weergegeven in tabel 1.

Dit zijn conservatieve normen voor de detectielimieten vergeleken met de procedure die voorgesteld wordt door het IUPAC [IUPAC, 1976] waarbij de detectielimiet gedefinieerd wordt als het gemiddelde van de gemeten hoeveelheid in representatieve blanco monsters ($n > 20$) plus drie keer de standaardafwijking van het gemiddelde. Dit komt overeen met een betrouwbaarheidsinterval van 90 %. In ons geval vertoonden blanco plasmamonsters ($n > 20$) weinig variatie in de ruis in de basislijn (mits alle varkens hetzelfde niet-gemedicineerde voer kregen gedurende het experiment). Als bovenstaande definitie toegepast zou worden, zouden de berekende detectielimieten lager zijn dan bovengenoemde waarden.

De detectielimieten in urine zijn schattingen en niet gebaseerd op de resultaten uit een recovery experiment. De detectielimieten zijn ongeveer tien keer zo hoog als in plasma.

3.4 Recovery

De recoveries van de onderzochte verbindingen zijn weergegeven in tabel 2. In het onderzochte concentratiegebied waren de recoveries constant (C.V. < 7%, behalve voor M1).

De gemiddelde recoveries waren groter dan 80% voor M1 en groter dan 90% voor alle andere verbindingen.

Representatieve chromatogrammen van blanco varkensplasma en spikes (0,1 µg/ml voor alle verbindingen) zijn weergegeven in fig. 2.

3.5 Toepassing

De beschreven methode is toegepast om in plasma- en urinemonsters, verkregen uit farmacokinetische experimenten, de concentraties van farmaca en metabolieten te bepalen [Mengers et al, 1989^b]. Per dag kan 1 persoon ca. 20 plasma's (in duplo) voorzuiveren.

4 CONCLUSIE

Een analysemethode is opgezet voor de bepaling van sulfadimethoxine (SDM), sulfamethoxazol (SMX), trimethoprim (TMP) en hun belangrijkste metabolieten, zowel vrij als geconjugeerd, in plasma en urine van behandelde varkens.

Er is een methode ontwikkeld waarbij de bovengenoemde verbindingen volgens een uniforme methode kunnen worden voorgezuiverd en de sulfonamiden en hun metabolieten afzonderlijk van trimethoprim en zijn metabolieten bepaald kunnen worden m.b.v. hoge-druk vloeistofchromatografie.

De onderzochte metabolieten zijn N₄-acetylsulfadimethoxine (N₄SDM), N₄-acetylsulfamethoxazol (N₄SMX), 4'-hydroxytrimethoprim (M1) en 3'-hydroxytrimethoprim (M4).

De gemiddelde recoveries voor M1 waren groter dan 80%, terwijl de gemiddelde recoveries van de andere verbindingen groter dan 90% waren. De detectielimieten in plasma waren 15 ng/ml voor SDM en N₄SDM, 25 ng/ml voor SMX, N₄SMX en TMP en 50 ng/ml voor M1 en M4. De geschatte detectielimieten in urine waren tien keer hoger.

Per dag kan één persoon ca. 20 plasma's (in duplo) voorzuiveren.

LITERATUUR

Clarke, E.G.C., 1986. Isolation and Identification of drugs; in pharmaceutical, body fluids and post-mortem material. 2e editie, Londen, The Pharmaceutical Press.

Martindale, 1982. The Extra Pharmacopoeia. 28e editie, Londen, The Pharmaceutical Press.

Mengelers, M.J.B., B. van Klingereren, A.S.J.P.A.M. van Miert, 1989^a. Am. J. Vet. Res., Vol. 50. 1022-1028.

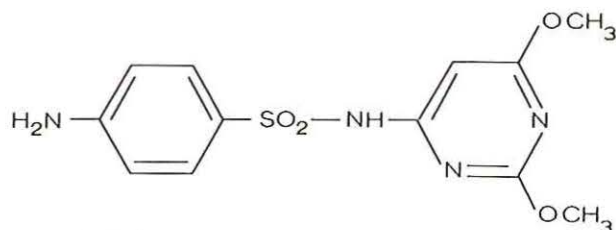
Mengelers, M.J.B., M.B.M. Oorsprong, H.A. Kuiper, M.M.L. Aerts, E.R. van Gogh, A.S.J.P.A.M. van Miert, 1989^b. J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 7, 1765-1776.

Mengelers, M.J.B., B. van Klingereren, A.S.J.P.A.M. van Miert 1990. Geaccepteerd voor publikatie Am. J. Vet. Res.

Rieder, J., 1963. Arzneim. Forsch. / Drug Res. Vol. 13. 81-88.

International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division, 1976. Anal. Chem. 48, 2294-2296.

Figuur 1.1



Sulfadimethoxine (SDM)

$N^-(2,6\text{-dimethoxypyrimidine-4-yl})\text{sulfanilamide}$ [Clarke, 1986].

Belangrijkste metaboliet: $N_4\text{-acetylsulfadimethoxine}$ ($N_4\text{SDM}$).

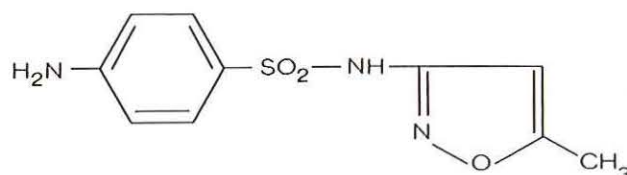
pKa: 6,3 [Rieder, 1963].

Oplosbaarheid: slecht oplosbaar in water, 1:200 in ethanol, oplosbaar in verdunde minerale zuren en oplossingen van alkalische hydroxiden en carbonaten [Clarke, 1986].

UV-absorptie: verdund zuur: 275 nm, verdunde base: 269 nm [Clarke, 1986].

Donker bewaren [Martindale, 1982].

Figuur 1.2



Sulfamethoxazol (SMX)

$N_4\text{-(5-methylisoxazol-3-yl)sulfanilamide}$ [Clarke, 1986].

Belangrijkste metaboliet: $N_4\text{-acetylsulfamethoxazol}$ ($N_4\text{SMX}$).

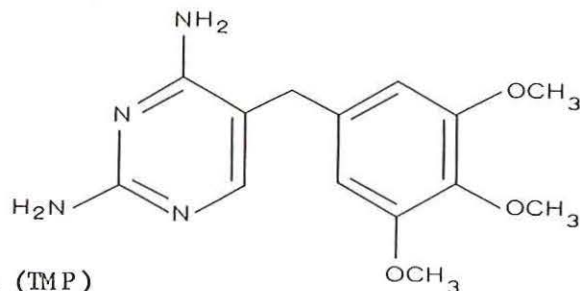
pKa: 6,0 [Rieder, 1963].

Oplosbaarheid: slecht oplosbaar in water, 1:50 in ethanol, oplosbaar in oplossingen van alkalische hydroxiden [Clarke, 1986].

UV-absorptie: verdund zuur: 265 nm, verdunde base 256 nm [Clarke, 1986].

Donker bewaren [Martindale, 1982].

Figuur 1.3



Trimethoprim (TMP)

$5\text{-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidine-2,4-diyldiamine}$ [Clarke, 1986].

Belangrijkste metabolieten: $4\text{-hydroxytrimethoprim}$ (M1),

$3\text{-hydroxytrimethoprim}$ (M4).

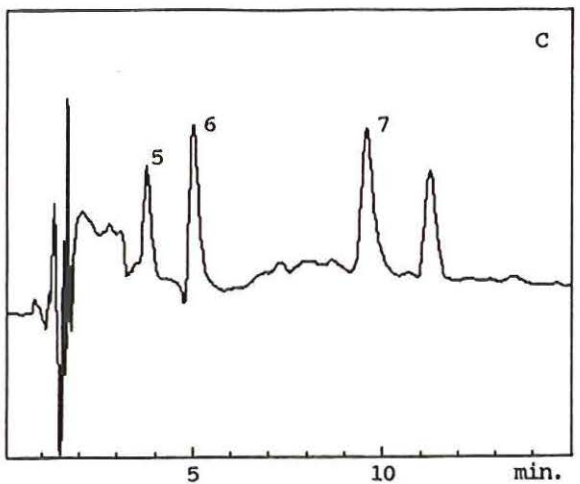
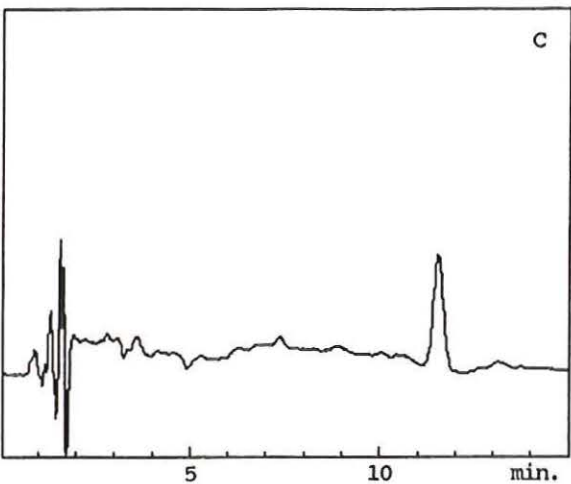
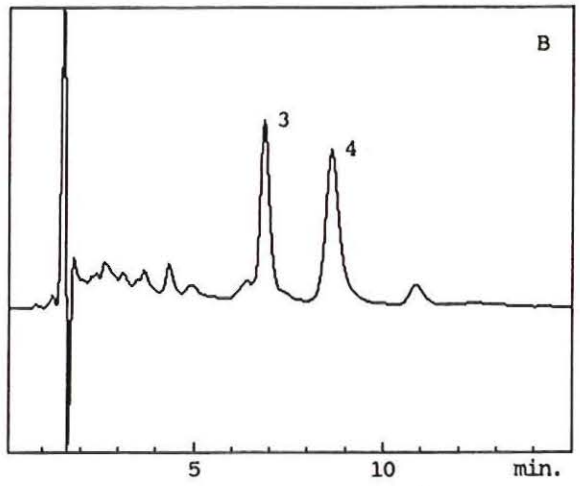
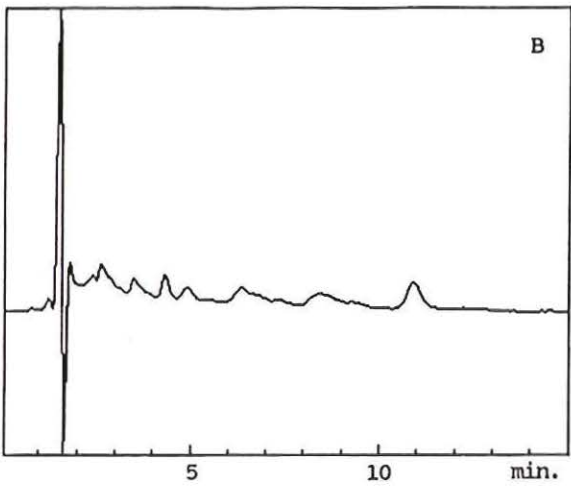
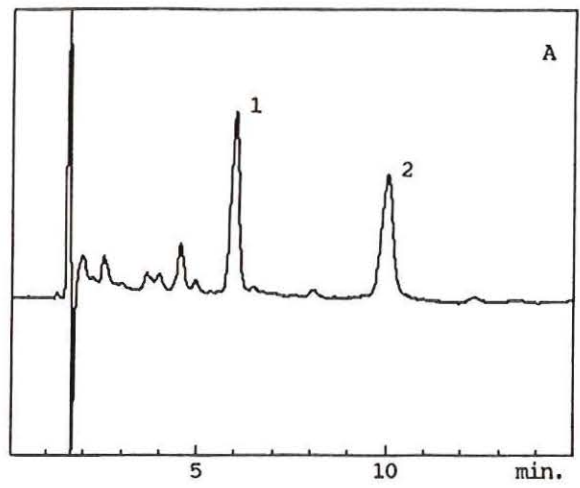
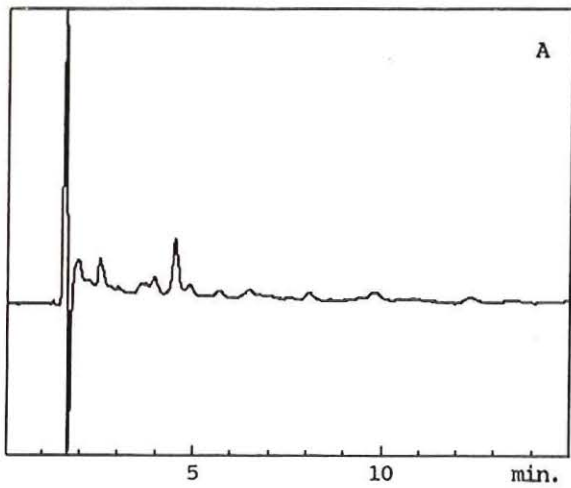
pKa: 7,2 [Clarke, 1986].

Oplosbaarheid: 1:2500 in water, 1:300 in ethanol [Clarke, 1986].

UV-absorptie: verdund zuur: 271 nm, verdunde base: 287 nm [Clarke, 1986].

Donker bewaren [Martindale, 1982].

Figuur 2



Chromatogrammen van blanco plasma monsters (links) en spikes (rechts)
(100 ng/ml voor alle verbindingen)
1 = N₄SDM; 2 = SDM; 3 = N₄SMX; 4 = SMX, 5 = M1; 6 = M4, 7 = TMP.
A : 0,02 AUFS; B : 0,01 AUFS; C : 0,01 AUFS.

Tabel 1: Detectielimieten van de farmaca en hun metabolieten in varkensplasma.

Detectielimiet (ng/ml)	
plasma	
SDM	15
N ₄ SDM	15
SMX	25
N ₄ SMX	25
TMP	25
M1	50
M4	50

Tabel 2.1: Recovery en variatiecoëfficiënten (V.C.) van SDM en N₄SDM in varkensplasma (n=6).

conc. µg/ml	SDM		N ₄ SDM	
	recovery (%)	V.C. (%)	recovery (%)	V.C. (%)
0,05	101,3	6,9	102,1	2,4
0,1	98,6	2,8	98,1	2,1
0,5	97,8	1,9	99,8	3,5
1,0	96,2	2,8	100,2	1,4
5,0	96,1	1,6	99,0	2,3
10,0	97,4	0,9	98,9	1,1
50,0	98,1	2,1	99,2	1,5
100,0	97,9	1,1	99,7	0,9

Tabel 2.2: Recovery en variatiecoëfficiënten (V.C.) van SMX en N₄SMX in varkensplasma (n=6).

conc. µg/ml	SMX		N ₄ SMX	
	recovery (%)	V.C. (%)	recovery (%)	V.C. (%)
0,05	104,8	3,4	102,4	4,5
0,1	99,1	4,2	102,7	3,4
0,5	98,2	4,8	99,1	3,1
1,0	96,2	3,1	100,3	2,6
5,0	98,5	2,3	100,7	2,1
10,0	101,1	2,2	103,9	1,1
50,0	98,7	1,2	101,0	1,2
100,0	98,2	1,0	98,9	1,1

Tabel 2.3: Recovery en variatiecoëfficiënten (V.C.) van TMP, M1 en M4 in varkensplasma (n=6).

conc. µg/ml	TMP		M1		M4	
	recovery (%)	V.C. (%)	recovery (%)	V.C. (%)	recovery (%)	V.C. (%)
0,05	95,8	3,4	84,0	10,4	100,0	4,5
0,1	95,3	2,4	85,9	6,7	102,2	3,4
0,5	95,4	0,6	90,7	3,1	94,3	1,7
1,0	97,9	1,3	92,3	3,0	93,7	1,7
5,0	99,5	0,9	90,6	0,9	100,3	0,9
10,0	96,1	0,6	88,2	1,1	97,0	0,7