

Afdeling Diergeneesmiddelen 1987-01-06

RAPPORT 87.02 Pr.nr. 505.0600/404.0601

(RIKILT)

Pr.nr. 027.02 (Spelderholt)

Onderwerp: Ontwikkeling bepalingsmethode
voor residuen van nitro-imidazolen in kippe-eieren.

Uitscheidingsexperimenten bij
leghennen.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling
Diergeneesmiddelen (5x), bibliotheek (1x),
projektleider, projektbeheer, circulatie, COVP-
Spelderholt (5x), directie VD, directie VZ,
Gezondh. Dienst Pluimvee (Doorn), RIVM (dr. Stephany),
afd. OCON, RVV-6 (dr. Nouws)

Voorwoord

In het kader van een bijvakonderzoek t.b.v. de doctoraalstudie Farmacie heb ik gekozen voor een onderzoek op het gebied van de farmaceutische analyse. Het onderzoek betrof het ontwikkelen van een bepalingmethode voor diergeneesmiddelresiduen in kippe-eieren en werd uitgevoerd bij het RIKILT (afdeling diergeneesmiddelen) te Wageningen. Het dierexperimenteel onderzoek geschiedde in samenwerking met het COVP ('Spelderholt') te Beekbergen.

Met het afsluiten van het onderzoek, d.m.v. dit -als RIKILT-rapport verschenen- bijvakverslag, wil ik al diegenen, die het mogelijk hebben gemaakt het onderzoek uit te voeren en/of hebben geholpen, bedanken. Met name wil ik noemen:

drs. M.M.L. Aerts (hoofd afdeling diergeneesmiddelen RIKILT) voor de directe en algehele begeleiding vanuit het RIKILT,
W. Beek, H. Keukens, T. Polman, mw. K. Strating en H. Rosendaal (allen medewerkers van de afdeling diergeneesmiddelen RIKILT),
de dames van de typekamer van het RIKILT voor het typen van dit (lijvige) rapport,
drs. C.A. Kan voor de begeleiding van het dierexperimenteel onderzoek en dr. G. Beuving en mw. H.M. Zweers-Japing (allen werkzaam bij het COVP) voor het canuleren van de proefdieren,
prof. dr. A. Hulshoff (†), dr. W.P. van Bennekom en dr. J. Holthuis voor de begeleiding als mentoren vanuit de Subfaculteit der Farmacie (R.U.U.).

RAPPORT 87.02

Pr.nr. 505.0600/404.0601

Projekt: Ontwikkelen methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet-microbiologische wijze.

Onderwerp: Ontwikkeling bepalingsmethode voor residuen van nitroimidazolen in kippe-eieren. Uitscheidingsexperimenten bij leghennen.

Bijlagen: 21

Doel:

Opzetten van een multianalysemethode in eieren voor de meest toegepaste nitro-imidazolen. In de praktijk toetsen van de methode door uitscheidingsexperimenten. Vaststellen in hoeverre residuen van nitroimidazolen in eieren aanwezig zijn na eenmalige orale toediening.

Samenvatting:


Er is een multimethode uitgewerkt voor de bepaling van dimetridazol, ronidazol, hun gemeenschappelijke metaboliet en ipronidazol in eieren. Hierbij is gebruik gemaakt van een waterige extractie, gevolgd door opzuivering via Extrelut[®] kolommen. Detectie vindt plaats via RP-HPLC met UV- of Diode-Array-UV/vis detectie. Uitscheidingsprofielen in plasma, faeces, eiwit en eigeel zijn vastgesteld na eenmalige orale dosering door dierexperimenteel onderzoek in samenwerking met COVP, "Het Spelderholt".

Conclusie:

Met de ontwikkelde multimethode is routinematige analyse van eieren op de aanwezigheid van nitro-imidazolen mogelijk vanaf een nivo van 5-10 µg/kg. De recoveries zijn hoog 80-95% en reproduceerbaar (s.d. 3-4%). Diode-Array UV/vis bevestiging is mogelijk vanaf ≈ 10 µg/kg. Zowel metabolisme als uitscheidingsprofiel zijn zeer verschillend voor de drie nitro-imidazolen. Na eenmalige orale dosering zijn gedurende 5-10 dagen residuen in eieren van metabolieten of de moederverbinding aantoonbaar. De hoofdm metaboliet van ipronidazol is gekarakteriseerd met Diode-Array UV/vis/ LC-MS spectroscopie.

Verantwoordelijk : drs. M.M.L. Aerts 

Medewerker(s)/Samensteller(s): I. Egberink

Projectleider : drs. M.M.L. Aerts (RIKILT)
drs. C.A. Kan (COVP-Spelderholt) 
dr. J. Holthuis (R.U. Utrecht; Anal. Farmacie)

Samenvatting Analyse van nitro-imidazolen in kippe-eieren *

In een literatuuronderzoek is aandacht besteed aan voornamelijk eimonster-opzuiverings- en concentreringsmethoden ten behoeve van bepalingen van nitro-imidazolen en andere diergeneesmiddelen in kippe-eieren. Hierbij bleek dat slechts enkele methoden zijn beschreven. Deze berusten voor het merendeel op uitgebreide vloeistof-vloeistof-extracties. Dergelijke extracties kennen vele nadelen.

Derhalve is een bepalingmethode ontwikkeld voor nitro-imidazolen in kippe-eieren waarbij gebruik wordt gemaakt van "solidphase-extractie" gevolgd door bepaling met HPLC/UV-detectie. Bij de bepalingmethode wordt na clean-up van een waterig ei-extract over Extrelut-kolommen, gevolgd door een eenvoudige uitschud-stap, de gehaltebepaling uitgevoerd met HPLC -diode-array-UV detectie. De methode is geschikt voor de bepaling van ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en (de gemeenschappelijke metabooliet van ronidazol en dimetridazol) 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol.

De ontwikkelde methode is in de praktijk getest. Na eenmalige orale toediening van ronidazol, dimetridazol en ipronidazol aan leghennen is het concentratieverloop van de toegediende componenten en de ontstane metaboolieten in heel-ei, eiwit/eigeel, plasma en faeces gevolgd. Hiertoe is tevens, zij het in beperkte mate, aandacht besteed aan de methode-ontwikkeling voor bepalingen in eiwit/eigeel, plasma- en faecesmonsters.

* De titel 'Analyse van nitro-imidazolen in kippe-eieren' is een korte omschrijving van het gehele onderzoek 'Ontwikkeling bepalingmethode voor residuen van nitro-imidazolen in kippe-eieren; Uitscheidingsexperimenten bij leghennen'.

Samenvatting Analyse van nitro-imidazolen in kippe-eieren

| | |
|---|----|
| 1. INLEIDING | 1 |
| 2. ALGEMEEN | 4 |
| 2.1 NITRO-IMIDAZOLEN | 4 |
| 2.2 METABOLISME NITRO-IMIDAZOLEN | 7 |
| 2.3 MATRIX KIPPE-EI | 11 |
| 2.4 VORMING EI EN RESIDU-VORMING IN EIEREN | 12 |
| 2.5 MONSTERVOORBEWERKING T.B.V. ANALYSE IN EIEREN | 14 |
| 2.6 SOLIDPHASE-EXTRACTIES | 18 |
| 2.7 HPLC | 20 |
| 3. METHODE-ONTWIKKELING HEEL-EI | |
| 3.1 OPZET ONDERZOEK | 24 |
| 3.2 CHROMATOGRAFIE | 25 |
| 3.2.1 Methode | 25 |
| 3.2.2 Resultaten en Interpretatie | 27 |
| 3.3 EXTRACTIE | 35 |
| 3.3.1 Methode | 35 |
| 3.3.2 Resultaten en Interpretatie | 37 |
| 3.4 SPOEL- EN ELUTIESTAPPEN | 41 |
| 3.4.1 Methode | 41 |
| 3.4.2 Resultaten en Interpretatie | 41 |
| 3.5 RECOVERY | 43 |
| 3.5.1 Methode | 43 |
| 3.5.2 Resultaten en Interpretatie | 45 |
| 3.6 DIODE-ARRAY-BEVESTIGING | 53 |
| 3.7 EINDVOORSCHRIFT HEEL-EI | 54 |
| 3.7.1 Reagentia | 54 |
| 3.7.2 Apparatuur | 56 |
| 3.7.3 Werkwijze | 57 |
| 3.7.4 HPLC-analyse | 57 |
| 3.7.5 Opmerkingen | 58 |
| 4. OPWERKING EIWIT/EIGEEL | 59 |
| 5. PLASMA-OPWERKING | 60 |
| 5.1 METHODE-ONTWIKKELING | 60 |
| 5.2 WERKWIJZE PLASMA | 61 |
| 6. FAECES-OPWERKING | 62 |
| 6.1 METHODE-ONTWIKKELING | 62 |
| 6.2 WERKWIJZE FAECES | 63 |
| 7. DIEREXPERIMENTEEL ONDERZOEK | 64 |
| 7.1 OPZET | 64 |
| 7.2 ANALYSE | 65 |
| 7.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE | 66 |
| 7.3.1 Plasma-analyse | 66 |
| 7.3.2 Ei-analyse | 67 |
| 7.3.3 Faeces-analyse | 69 |
| 8. CONCLUSIES | 72 |
| 9. BIJLAGEN | 74 |
| 10. LITERATUUR | 75 |

1. INLEIDING

Dit bijvakonderzoek werd uitgevoerd bij het RIKILT, afdeling Diergeneesmiddelen. Het RIKILT -Rijks Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten -is het analytisch-chemisch onderzoeksinstituut van het Ministerie van Landbouw en Visserij. Sedert de fusie van het Rijkszuivelstation (RZS) te Leiden en het Rijkslandbouwproefstation voor Meststoffen- en Veevoederonderzoek (RLPS) te Maastricht in 1979 is het instituut gevestigd te Wageningen.

Hoofddoelstelling van het RIKILT is het onderzoek naar "negatieve" kwaliteitsaspecten (afwijkende samenstelling, contaminatie, residuen, enz.) en "positieve" kwaliteitsaspecten (samenstelling, voedingswaarde, smaak, enz.) van landbouwprodukten. Hiertoe vindt naast analytisch-chemisch onderzoek tevens onderzoek plaats op gebied van microbiologie, microscopie en sensoriek. Zo stuurt b.v. de Algemene Inspectiedienst van Ministerie van Landbouw en Visserij (AID) monsters naar het RIKILT voor onderzoek en voor de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (RVV) is het RIKILT een ontwikkelings- en referentie laboratorium. Veelal ook worden onderzoeken verricht in samenwerking met b.v. Keuringsdiensten van Waren, TNO-instituten, Zuivelcontrole-stations, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne en andere landbouwinstututen.

De afdeling diergeneesmiddelen kent naast dossierbeoordeling als kerntaken het toegepast onderzoek en methodenontwikkeling. Wat betreft de methodenontwikkeling wordt getracht methoden voor het bepalen van residuen van diergeneesmiddelen en hun metabolieten in dierlijke produkten te ontwikkelen. Hiernaast wordt tevens gezocht naar methoden voor het bepalen van diergeneesmiddelen in veevoerders. Doel is het ontwikkelen van snelle, gevoelige screeningsmethoden. Bij voorkeur wordt gezocht naar multimethoden. Dit houdt in dat één analysemethode de bepaling omvat van een groep verwante stoffen of van een diergeneesmiddel met zijn voornaamste metaboliet(en). Omdat bij screening vals positieve resultaten kunnen voorkomen, dienen deze resultaten bevestigd te worden door een onafhankelijke, structuurinformatie verstrekkende methode. Een dergelijke bevestigingsmethode mag iets arbeidsintensiever zijn.

De meest voorkomende pluimveeziekten zijn coccidiose, paratyphoide-hexamitiasis, luchtweg-infecties en enterohepatitis. Ter preventie en bestrijding van deze ziekten worden diergeneesmiddelen veelal via het voer of drinkwater toegediend.

Omdat vele behandelingsmiddelen voor pluimveeziekten voornamelijk bij opfok- en slachtkuikens worden toegepast, ontbreken uitgebreide gegevens over diergeneesmiddelresiduen in eieren. Toch is het mogelijk dat, vaak onbedoeld, pluimvee-geneesmiddelen in leghennen-voeders geraken door b.v. carry-over in het produktieproces of vermenging van voeder op de boerderij. Dit maakt het voorhanden hebben van goede analyse-methoden, ter bepaling van diergeneesmiddelresiduen, in eieren noodzakelijk.

Aanvankelijk werd veel gebruik gemaakt van microbiologische, polarografische, fluorometrische en colorimetrische bepalingmethoden. De laatste jaren zijn verschillende chemische methoden ontwikkeld voor de analyse van residuen van diergeneesmiddelen tot een niveau $\mu\text{g}/\text{kg}$. Voornamelijk vanwege de beperkte specificiteit, selectiviteit en de lage gevoeligheid van andere methoden, heeft de hoge-druk-vloeistof-chromatografie een steeds belangrijker plaats ingenomen. De meeste van deze bepalingmethoden zijn niet bedoeld voor residu-analyses in eieren, maar voor veevoeders en vlees. Door aanwezigheid van fosfolipiden en kleurstoffen in eieren, zijn door de vaak lage gehalten zeer bewerkelijke voorzuiveringen nodig.

In het hier beschreven onderzoek zijn een drietal stoffen uit de groep nitro-imidazolen onderzocht: dimetridazol, ronidazol en ipronidazol. De nitro-imidazolen vinden hun toepassing bij bestrijding van bacteriële en parasitaire infecties in de humane sfeer (metronidazol; Schröder et al., 1976) en de veterinaire sector. De effectiviteit van de nitro-imidazolen berust op de gevormde metabolieten. Door deze metabolieten wordt in anaerobe organismen, die de infecties veroorzaken, een verandering in het DNA-patroon veroorzaakt, waardoor deze organismen niet kunnen overleven (de Roij et al., 1980). In de veterinaire sector is het gebruik van nitro-imidazolen tot op heden beperkt gebleven tot voornamelijk dimetridazol en, in mindere mate, ronidazol. Dimetridazol (1,2-dimethyl-5-nitro-imidazol) is toegelaten als additief voor kal-koenen en parelhoenders (in gehalte 100-200 mg/kg voer).

Dimetridazol is werkzaam tegen histomonose (protozoaire ziekte), ook wel genoemd enterohepatitis of "blackhead". Tevens wordt dimetridazol in de V.S. toegepast als groeibevorderaar (Hobson-Frohock et al., 1983). Ronidazol (1-methyl-5-nitro-imidazol-2-yl-methylcarbamaat) mag aan kalkoenenvoer toegevoegd worden ter controle en behandeling van "blackhead" (60-90 mg/kg voer) (Cala et al., 1976).

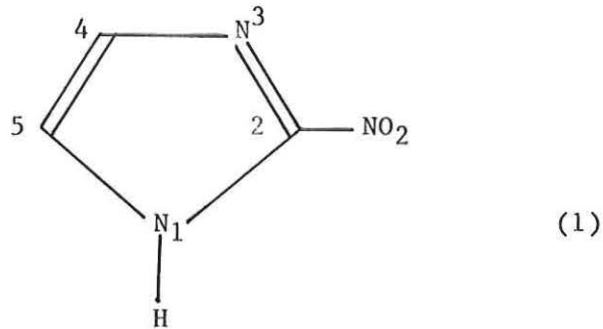
In de praktijk wordt ipronidazol bij kalkoenen nauwelijks toegepast. Het is wel toegelaten (50-85 mg/kg) in voeders voor kalkoenen (Analytical Methods Committee, january 1983).

Vanwege de mutagene en carcinogene werking van de nitro-imidazolen en de vaak langdurige aanwezigheid van residuen in eieren na toediening, is het van belang in eieren op de aanwezigheid van deze middelen te kunnen controleren. Derhalve was tot doel van dit bijvakonderzoek gesteld het ontwikkelen van een bepalingmethode voor zeer lage (10 µg/kg) concentraties nitro-imidazolen in kippe-eieren. Hierbij werd het onderzoek voornamelijk gericht op "solidphase-extracties" met Extrelut[®]-kolommen, waarbij vorderingen in het onderzoek met HPLC gevolgd werden. Ter afsluiting van deze methodenontwikkeling werd een praktijkproef -in de vorm van een uitscheidingsexperiment -uitgevoerd om de ontwikkelde methode te testen met "echte" monsters. Hierbij werd het concentratie-verloop in heel-ei, eiwit, eigeel, plasma en faeces gevolgd. Hiertoe werden tevens ook bepalingmethoden voor deze laatste 4 genoemde matrices ontwikkeld. Dit uitscheidingsexperiment werd uitgevoerd in samenwerking met "Het Spelderholt" (COVP) te Beekbergen. Het COVP (Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor de Pluimveehouderij) is, evenals het RIKILT, een instelling van het Ministerie van Landbouw en Visserij.

2. ALGEMEEN

2.1 NITRO-IMIDAZOLEN

De aanleiding tot de ontwikkeling van de nitro-imidazolen is gegeven door isolering van het antibioticum azomycine (2-nitro-imidazol) (1).

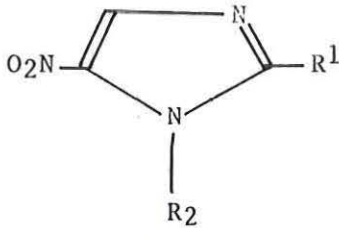


Deze verbinding is niet stabiel en blijkt bij klinische toepassing toxisch te zijn. Door alkylering op het N₁-aatom gaat deze toxiciteit verloren. Indien de nitro-groep op C₄ of C₅ aanwezig is, i.p.v. op C₂, gaat de werking niet verloren en wordt een stabiele verbinding verkregen. Opvallend is, dat de 5-nitro-imidazolen een grotere antibacteriële activiteit bezitten dan de 4- of 2-nitro-imidazolen.

Aan metronidazol (2), werkzaam tegen de infectieziekte Trichomoniasis, is het meeste onderzoek verricht. Metronidazol (1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitro-imidazol) kent bij de mens vele bijwerkingen. Naast maag-darm storingen, benauwdheid, misselijkheid, hoofdpijn en huiduitslag komen in mindere mate ook duizeligheid, depressie en slapeloosheid voor. Metronidazol wordt snel geabsorbeerd uit het maag-darmkanaal en verspreiding ervan vindt plaats in vrijwel alle lichaamsweefsels. Na toediening van deze stof bij de mens worden na 1-2 uur maximale concentraties in het serum waargenomen. Kleine hoeveelheden zijn na 24 uur nog in het serum aantoonbaar. Metronidazol kan door de placenta diffunderen. En, tevens is in melk van borstvoeding gevende moeders metronidazol, in concentraties equivalent aan die in het serum, aangetoond.

Ter verbetering van de anti-trichomonale werking en metabolische stabiliteit van metronidazol zijn variaties in de structuur aangebracht.

Deze veranderingen hebben geleid tot de ontwikkeling van o.a. tinidazol (3), nimorazol (4) en panidazol (5). Andere variaties leverden flunidazol (6) en ronidazol (7). Ook styryl-imidazol-derivaten (8 en 9) en genitreerde bisimidazolen (10) zijn uitgetest. Een gedegen studie naar de 1-2 digesubstitueerde 5-nitro-imidazolen heeft geleid tot de introductie van dimetridazol (11) en ipronidazol (12).

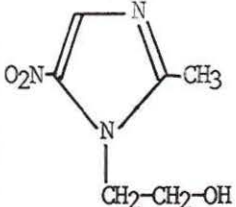
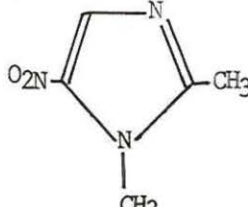
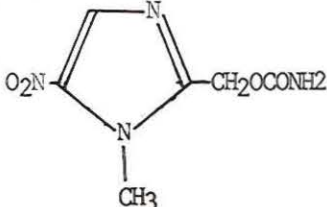
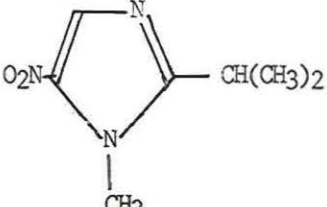


| R ₁ | R ₂ |
|--|---|
| (2) - CH ₃ | - CH ₂ - CH ₂ - OH |
| (3) - CH ₃ | - CH ₂ - CH ₂ - SO ₂ - CH ₂ - CH ₃ |
| (4) - H | - CH ₂ - CH ₂ - |
| (5) - CH ₃ | - CH ₂ - CH ₂ - |
| (6) | - CH ₂ - CH ₂ - OH |
| (7) - CH ₂ OCONH ₂ | - CH ₃ |
| (8) - CH = CH - | - CH ₂ = CH ₂ |
| (9) - CH = CH - | - CH ₂ = CH ₂ |
| (10) | - CH ₃ |
| (11) - CH ₃ | - CH ₃ |
| (12) - CH(CH ₃) ₂ | - CH ₃ |

Voor dimetridazol en ipronidazol geldt dat zij een sterke profylactische werking vertonen.

Dimetridazol, ronidazol en ipronidazol vertonen een vergelijkbare anti-histomonale activiteit bij pluimvee. Deze veterinaire geneesmiddelen worden slechts beknopt in de literatuur beschreven. Enkele fysisch-chemische parameters van deze 3 geneesmiddelen staan, in vergelijking tot die van metro-nidazol, weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Nitro-imidazolen.

| | Metronidazol | Dimetridazol | Ronidazol | Ipronidazol |
|--------------------------|---|---|---|---|
| chemische naam | * 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitro-imidazol | * 1-2-dimethyl-5-nitro-imidazol | * 1-methyl-5-nitro-imidazol-2-methanol carbamaat * 1-methyl-2[carbamoxy)methyl]-5-nitro-imidazol * (1-methyl-5-nitro-imidazol-2-yl) methyl-carbamaat * carbamaatzuur (1-methyl-5-nitro-imidazol-2-yl)methyl-ester. | * 1-methyl-2-(1-methyl-ethyl)-5-nitro-imidazol. * 2-isopropyl-1-methyl-5-nitro-imidazol. |
| Merknaam | Flagyl | Emtryl | Ronidazol | Ipropran |
| Brutoformule | C ₆ H ₉ N ₃ O ₃ | C ₅ H ₇ N ₃ O ₂ | C ₆ H ₈ N ₄ O ₄ | C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ |
| Structuur |  |  |  |  |
| Relatieve molecuul-massa | 171,2 | 141,1 | 200,2 | 169,2 |
| Smeltpunt | 159-162°C | 138-141°C | 167-169°C | 60°C |
| Uiterlijk | wit of 'cream' kristallijn poeder met iets kenmerkende geur en iets bittere smaak | wit/bruin/geel kristallijn poeder | lichtgele kristallen | witte plaatjes |
| Oplosbaarheid | slecht oplosbaar in water, alcohol en chloroform; enigszins oplosbaar in ether | slecht oplosbaar in water en ether, redelijk tot goed oplosbaar in chloroform en ethanol goed oplosbaar in minerale zuren | oplosbaar in zure oplosmiddelen, aceton, methanol, ethanol, chloroform en ethylacetaat. | ? |
| Opmerkingen | verzadigde oplossing heeft in water een pH = 6,5 | | instabiel in basische oplossingen; pKa=1,2 oplosbaarheid in water bij pH = 6,5 + 2,9 µg/ml | ontleedt o.i.v. UV-licht en is instabiel in basische oplossingen |

? niet in literatuur vermeld.

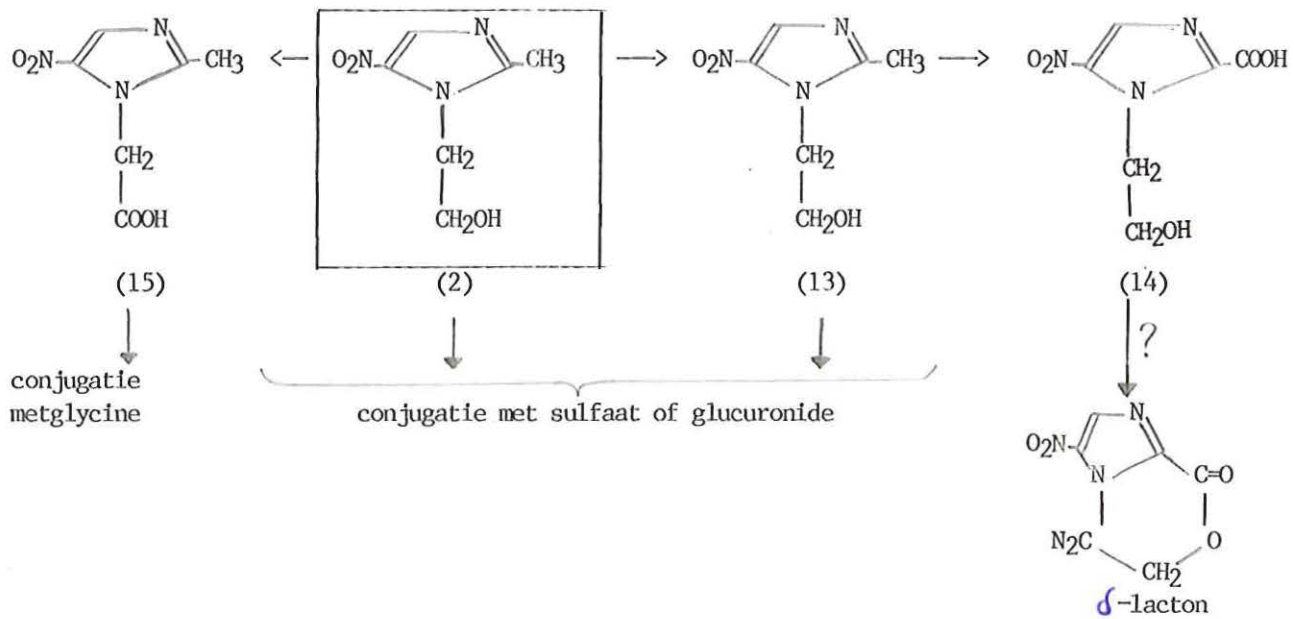
2.2 METABOLISME NITRO-IMIDAZOLEN

Bij bestudering van het metabolisme in mensen en dieren van metronidazol (2) zijn 3 belangrijke metabolieten aangetoond. Deze, weergegeven in schema (1) (Breccia et al, 1982), zijn:

1-(2-hydroxy-ethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol (13),

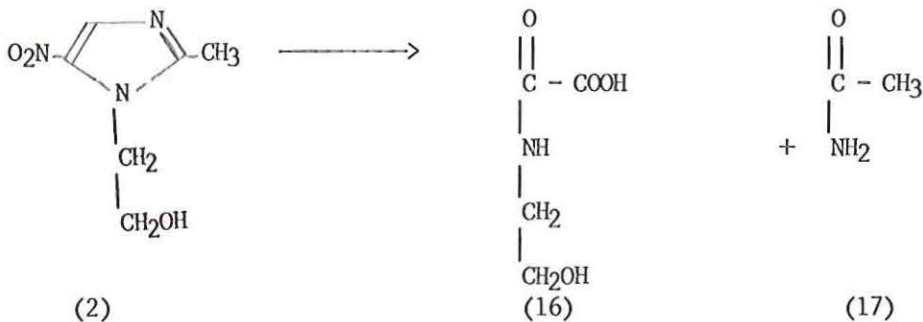
1-(2-hydroxy-ethyl)-2-carboxy-5-nitro-imidazol (14) en

1-(carboxymethyl)-2-methyl-5-nitro-imidazol (15). Voor elk van deze metabolieten en de moederverbinding is de mogelijkheid tot conjugatie vastgesteld.



Schema 1. Metabolisme metronidazol

Tevens zijn aangetoond N(2-hydroxy-ethyl)-oxaalzuurester (16) en acetaamide (17). Derhalve is ringopening voor metronidazol geopperd (schema 2; Breccia et al., 1982).



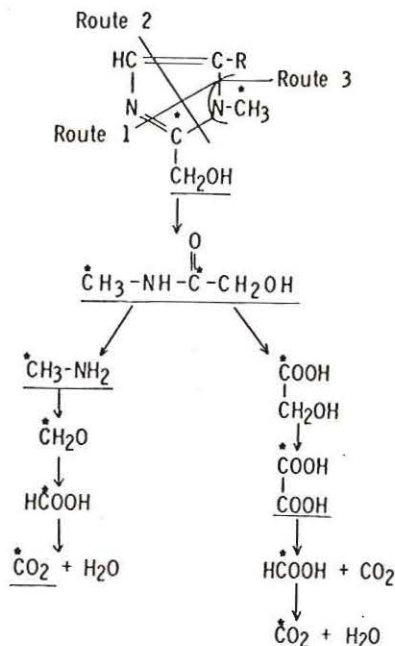
Schema 2. Metabolisme metronidazol

Rosenblum et al. (1972) hebben metabolisme-producten van ronidazol in kalkoenen bepaald. In een experiment met een 16-weken oude kalkoen werd van de gedurende de 1e 24 uur uitgescheiden hoeveelheden 66-69% als de moederverbinding ronidazol in de mest uitgescheiden. Van de tijdens de 2e 24 uur uitgescheiden hoeveelheden uur werd 43% als intacte moederverbinding uitgescheiden. Hiernaast werden slechts enkele procenten 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitro-imidazol (2%) in de mest aangetroffen. In een experiment met vogels werd 51% ronidazol uitgescheiden en circa 1% 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitro-imidazol. Er werden bij deze experimenten geen glucuronide-conjugaten van ronidazol en eraan gerelateerde componenten in de faeces aangetoond. De carbamoylgroep van ronidazol (7) kan door hydrolyse afgesplitst worden, hetgeen de vorming van 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitro-imidazol levert (18). (schema 3).



Schema 3. Metabolisme ronidazol

Naast deze metaboliet (18) zijn ook aangetoond: N-methyl-glycolamide (19), methylamine (20) en oxaalzuur (21). Na hydrolyse van ronidazol kan ringopening optreden, zoals weergegeven in schema 4 (Rosenblum et al. 1972).



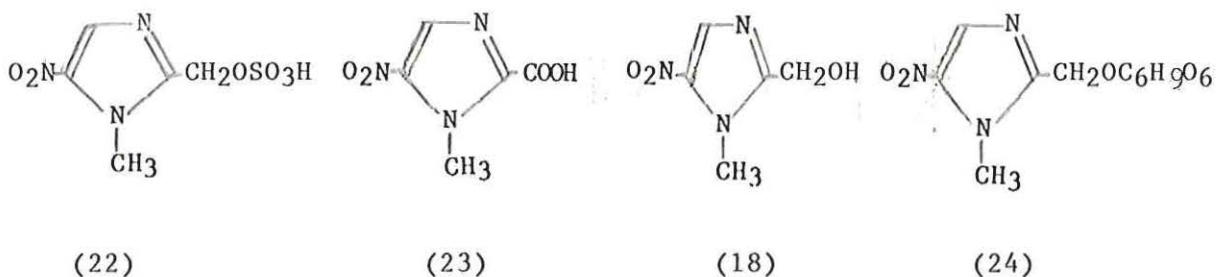
Schema 4. Metabolisme ronidazol

Ook bij het metabolisme van dimetridazol ontstaan meerdere metabo-
lieten. De belangrijkste hiervan zijn:

1-methyl-5-nitro-imidazol-2-yl-methyl-hydrogeensulfaat (22),

1-methyl-5-nitro-imidazol-2-carboxylzuur (23),

2-hydroxy-methyl-1-methyl-5-nitro-imidazol (18) en het glucuronide van
de laatste verbinding (24), (Wolff, 1979).



Door Craine et al. (1974) wordt verondersteld dat dimetridazol (11)
geoxideerd wordt tot de alcoholmetabooliet,

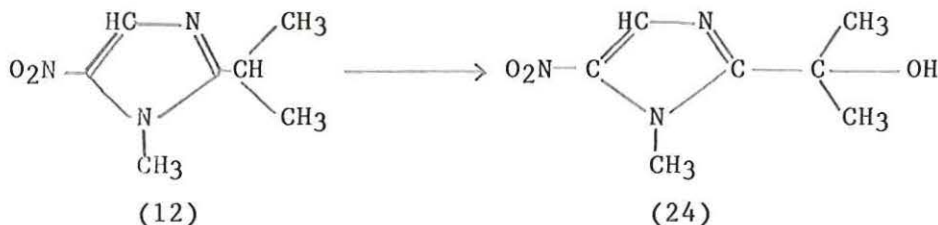
2-hydroxy-methyl-1-methyl-5-nitro-imidazol (18), welke verder geoxi-
deerd kan worden tot 1-methyl-5-nitro-imidazol-2- carboxylzuur, de
zure metabooliet (23). De hoofdcomponent van de residuen in weefsels van
varkens, na toediening van dimetridazol, is de alcoholmetabooliet. In
het varkensweefsel wordt de moederverbinding dimetridazol in geringe
hoeveelheden teruggevonden, evenals de zure metabooliet. Dit maakt het
noodzakelijk dat de bepalingsmethode van residuen van dimetridazol
voornamelijk gericht dient te zijn op de bepaling van

2-hydroxy-methyl-1-methyl-5-nitro-imidazol. Door Craine et al. (1974)
is derhalve een polarografische bepalingsmethode voor deze hoofd-
metabooliet in varkensvlees ontwikkeld.

De door Wolff (1979) genoemde vorming van

1-methyl-5-nitro-imidazol-2-yl-methylhydrogeen-sulfaat wordt in de
literatuur nauwelijks besproken. Breccia et al. (1982) noemt ook deze
mogelijkheid, evenals een eventuele vorming van glucuronide van deze
metabooliet.

Ipronidazol (1-methyl-2-isopropyl-5-nitro-imidazol) (12) wordt gemetaboliseerd door hydroxylering tot 1- α - α -trimethyl-5-nitro-imidazol-2-methanol (1-methyl-5-nitro-imidazol-2-isopropanol) (24) (schema 5) (Breccia et al., 1982).



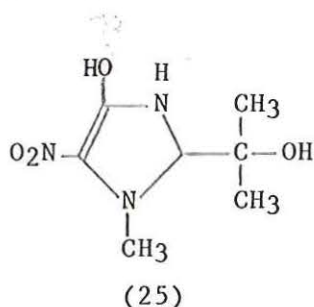
Schema 5. Metabolisme ipronidazol

Evenals bij dimetridazol, is ook bij ipronidazol de metaboliet de werkzame stof.

Zowel ipronidazol als de metaboliet zijn zeer instabiel onder basische omstandigheden: door basische hydrolyse kan nitriet gevormd worden.

Tevens wordt de mogelijkheid van vorming van

1-methyl-2-isopropanol-4-hydroxy-5-nitro-imidazol (25) genoemd.



Volgens MacDonald et al. (1971) vindt metabolisme van ipronidazol tot de metaboliet dusdanig snel plaats, dat in bloed, spieren, huid en vet van kalkoenen geen ipronidazol, maar een metaboliet wordt teruggevonden. Als hoofdm metaboliet wordt 1-methyl-5-nitro-imidazol-2-isopropanol geopperd. In nier en lever wordt noch ipronidazol, noch deze metaboliet teruggevonden.

Overigens ontbreekt in de literatuur een volledige karakterisering van de aard -in kwaliteit én kwantitatief opzicht- van de metabolieten, die ontstaan na toediening van nitro-imidazolen aan dieren. Behoudens de door Rosenblum et al. (1972) beschreven metabolisme-experimenten voor ronidazol, worden voor de nitro-imidazolen in de literatuur geen uitscheidingsexperimenten beschreven, waarbij aard en mate van metabolieten volledig wordt uitgezocht.

2.3 MATRIX KIPPE-EI

Jaarlijks worden circa 10 miljard kippe-eieren in Nederland geproduceerd. Deze eieren wegen gemiddeld 58,0 g en hebben een gemiddeld volume van 53 cm³. Het ei is opgebouwd uit 10,5% eischaal, 31% eigeel en 58,5% eiwit (Shenstone, 1968), zoals weergegeven in figuur 1 (Bell et al., 1971, vol 3).

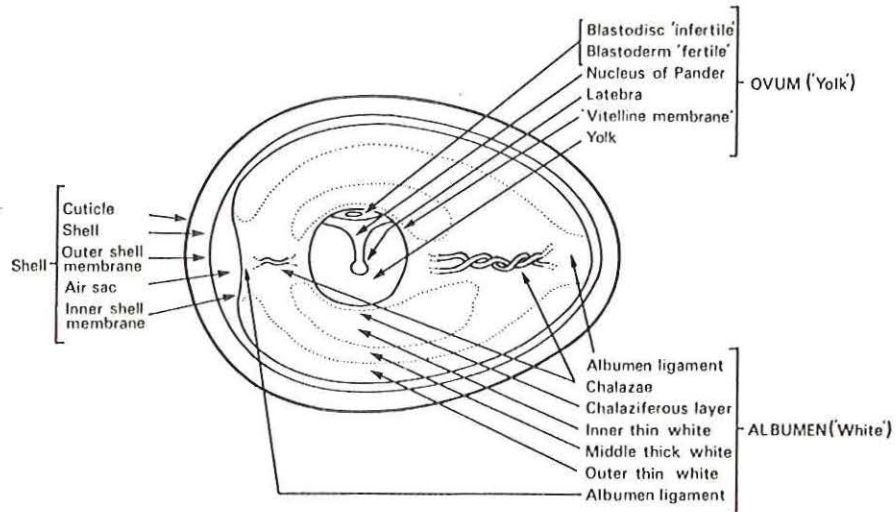


Fig. 1. Diagram of the hens egg.

Het eiwit bestaat voor 88,5% uit water en bevat 10,5% proteïnen, waaronder globulinen, ovomucine en ovalbumine. De globulinen veroorzaken bij heftig schudden schuimvorming van het eiwit, terwijl ovomucine het gevormde schuim stabiliseert. Dit ovomucine zorgt tevens voor de stevigheid van het gelachtige uiterlijk van het eiwit. Ovalbumine zorgt bij koken van eieren voor versteviging van de eiwitstructuur.

Het eigeel bestaat vnl. uit proteïnen (17,4%), lipiden (33%) en water (47,5%). Door de grote hoeveelheid lipiden en proteïnen, zorgend voor verlaging van de oppervlaktetenspanning, is het eigeel in staat andere stoffen te emulgeren. Derhalve is eigeel goed met water mengbaar. Naast genoemde componenten komen in eiwit en eigeel nog koolhydraten (vnl. glucose), anorganische elementen, enzymen, vitaminen en eigeelpigmenten (carotenoïden) voor.

Bij ouder worden van eieren neemt de stevigheid van het eiwit af, ondanks toename van de concentratie ovomucine. Dit kan sterk vertraagd worden door de temperatuur van het ei te verlagen en op deze manier de pH van het eiwit te houden tussen 7,6 en 8,5 (b.v. door het uitreden van CO₂ te beperken).

De pH van het eiwit is, onmiddellijk na het leggen van het ei, circa 7,6. Na bewaren bij een temperatuur van 20°C stijgt deze na 1 dag tot 8,5. De pH van het eigeel bedraagt 6,0-6,3. Deze kan langzaam stijgen tot maximaal 6,5-6,8.

Tijdens bewaren van de eieren diffundeert er water vanuit het eiwit naar het eigeel. Tengevolge van de lage hydratatiegraad van de eigeelproteïnen treedt een verschil in osmotische druk op, waardoor diffusie van water en wateroplosbare componenten uit eiwit naar dooier optreedt. Tijdens ouder worden van de eieren verandert dit verschil in osmotische druk nauwelijks.

2.4 VORMING EI EN RESIDU-VORMING IN EIEREN

De eivorming in de eierstok en eileider verloopt in meerdere stappen, waarbij de vorming van het eiwit en eigeel afzonderlijk plaats vindt (Anhalt, 1977).

De ontwikkeling van de in het ovarium liggende follikels kent 3 fasen:

- I langzame groei (maanden-jaren) door afzetting van enkele soorten vet in de follikels;
- II Tussenfase: afzet van proteïnen en vet kenmerkt deze tussenfase (60 dagen);
- III snelle groeifase: toename follikelgewicht van 0,5 g tot 19 g door toevoegen van het overige dooiermateriaal. Deze fase duurt circa 10 dagen. Omdat ongeveer elke 24 uur één ervan rijp is voor ovulatie, bevinden zich telkens circa 10 follikels in de snelle groeifase.

De dooiercomponenten worden gevormd in de lever en via het bloed naar het ovarium getransporteerd. Het is niet goed bekend of tot het moment van ovulatie dooiermateriaal wordt afgezet, of dat er een zgn. "rust-dag" is.

In tegenstelling tot het dooiermateriaal, dat van elders aangevoerd wordt, worden de proteïnen voor het ei-eiwit ter plaatse in de eileider gevormd.

Aangenomen wordt dat de hoofdmassa van het eiwit (wateroplosbare proteïnen), benodigd voor één ei, in 1 dag gevormd kan worden. Voor het afzetten van het eiwit rondom de dooier is circa 2-3 uur nodig. Deze eiwitafzetting vindt plaats in het magnum (le deel van de eileider). De vorming geschiedt in concentrische lagen met verschillende viscositeit.

Vervolgens worden in ca. 1 uur in het isthmus (middendeel van de eileider) de schaalvliesen van het ei gevormd. Uiteindelijk wordt, voor het ei gelegd wordt, in de uterus (laatste deel van de eileider) de kalkschaal gevormd, hetgeen 18-20 uur duurt.

Afhankelijk van de fase van ontwikkeling van het ei kunnen residuen van diergeneesmiddelen (incl. metabolieten ervan) in meer of mindere mate in het ei terecht komen. Want in de lever en het bloed kunnen de diergeneesmiddelen en metabolieten reeds een verbinding vormen met eidooier-componenten. Er zijn hierdoor drie soorten "residu"-follikels te onderscheiden:

- * follikels, die zich bij het begin van de behandeling in de eindfase van de snelle ontwikkeling bevinden. Deze hebben een laag residugehalte, vanwege de nog lage bloedspiegel en lage doorbloeding tijdens de snelle groei. Bovendien is de mogelijkheid van een "rustdag" in de groei, voordat de ovulatie plaatsvindt, aanwezig.
- * follikels, die zich tijdens de behandeling in de hoofdfase van de snelle ontwikkeling bevinden en tegen het eind van de behandeling klaar zijn. In deze follikels is het residugehalte hoog, omdat gedurende langere tijd (> 24 uur) transport van de componenten naar de follikels heeft plaatsgevonden. Bovendien is in het stadium van bijna voltooide groei van de follikelwand, de doorbloeding ervan klein, zodat nauwelijks terugresorptie op kan treden. Zo kunnen 1-2 dagen na aanvang van therapie diergeneesmiddelresiduen in de eidooier worden aangetoond.
- * follikels, die zich tijdens de behandeling aan het begin van het snelle groeiproces bevinden en tegen het einde van de behandeling nog niet volgroeid zijn. Ondanks opname van de behandelingsmiddelen, worden relatief lage gehalten aan residuen waargenomen. Dit wordt deels veroorzaakt door de nog goede vasculaire structuur van de follikelwand. Als gevolg van verlaging van de bloedspiegel kan nu terugresorptie van de behandelingsmiddelen plaatsvinden. Er vindt ook door de snelle gewichtstoename een verdunning van de residuen plaats.

In het eiwit wordt een met de bloedspiegel evenredige afzetting van de diergeneesmiddelen en de metaboliëten verwacht. Omdat volgens Anhalt (1977) een reserve van de wateroplosbare proteïnen aanwezig is voor 1-2 eieren, verwacht hij eerst na 24-48 uur, na aanvang van behandeling, residuen in het eiwit.

Dit, terwijl zeker 1 dag, na het bereiken van de nulwaarde van de diergeneesmiddelen in het bloed, nog residuen in het eiwit aanwezig zijn. Niet alleen bij behandeling gedurende meerdere dagen, maar ook bij eenmalige toediening van een diergeneesmiddel, kunnen residuen in meerdere eieren voorkomen. Immers, aangezien zich telkens circa 10 eieren in verschillende ontwikkelingsstadia bevinden, zorgt een eenmalige hoge diergeneesmiddel-plasmaconcentratie voor afzetting van stof in deze in groei zijnde eieren. Het eiwit bevat de hoogste residuconcentratie bij die eieren, welke zich in de eindfase van de groei bevinden. Deze residuconcentratie wordt na 1-2 dagen zichtbaar. Voor de andere in ontwikkeling zijnde eieren bevat het eigeel de hoogste concentratie. Tot 10 dagen na toediening van het diergeneesmiddel is de mogelijkheid van aanwezigheid van residuen in eigeel reëel.

Het bovengeschetste eivormingsmodel en de mogelijke gevolgen voor het residu -profiel blijkt in de praktijk niet altijd op te gaan. Daar blijken vaak toch reeds binnen 24 uur na toedienen, residuen in dooier en eiwit voor te komen (b.v. het hier beschreven onderzoek en onderzoek van sulfaguanidine en sulfadimidine (Aerts et al., 1986; Geertsma et al., 1987). Dit houdt, in afwijking van de opvatting van Anhalt (1977), momentane opname in eiwit in en/of de mogelijke diffusie tijdens bewaren van eigeel naar eiwit.

2.5 MONSTERVOORBEWERKING T.B.V. ANALYSE IN EIEREN

Voor het bepalen van nitro-imidazolen in kippe-eieren zijn in de literatuur geen bepalingsmethoden (incl. voor-bewerkingen van de eimonsters) bekend. Tot op heden zijn voornamelijk bepalingsmethoden voor deze verbindingen ontwikkeld in voeders en vlees.

Zo zijn polarografische (Craine et al., 1974; Daftsios, 1964; Hocquellet, 1975; Cala et al, 1976), spectrofotometrische (Stone et al., 1974; Analytical Methods Committee, May 1982, 577-578), gaschromatografische (Harris et al., 1977; Analytical Methods Committee, February 1980, 161-164; De Ritter et al. 1971) en hoge-druk-vloeistofchromatografische methoden (Buizer et al, 1975; Hobson-Frohock et al, 1983; Schmid et al., 1977; Analytical Methods Committee, December 1983, 1521-1524; van Bruchem, 1983) beschreven.

Voor bepaling van andere diergeneesmiddelen dan de nitro-imidazolen in eieren zijn ook slechts weinig voorbereidingsmethoden voorhanden (Egberink, 1987). Alvorens overgegaan kan worden tot de bepaling van residuen, dient opzuivering van het eimonster plaats te vinden. Vanwege de lage te analyseren concentraties dienen hierbij de te bepalen componenten geconcentreerd te worden. Tot nu toe zijn hiertoe vaak vloeistof-vloeistofextracties toegepast. Zo wordt ter bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren het monster geëxtraheerd met ethylacetaat, waarna uitgebreide vloeistof-vloeistofextractie plaatsvindt (Beek et al., 1983). Een variatie hierop is extractie met acetonitril t.b.v. de bepaling van chlooramphenicol, furazolidon en sulfonamiden in eieren (Petz, 1983). Na centrifugeren van de geprecipiteerde eiwitten wordt ook hier vloeistof-vloeistofextractie toegepast. Ook in de Multimethode van Malisch(1986), te gebruiken voor bepalen van vele diergeneesmiddelresiduen in melk, vlees en eieren, wordt na extractie met acetonitril zuivering met meerdere organische oplosmiddelen toegepast. Precipitatie van eiwitten is eveneens mogelijk met methanol, zoals bij de bepaling van flavomycine in eieren (Rybinska, 1984). Ontvetten van het supernatant is ook dan nog onvermijdelijk.

Binnen het RIKILT is ter bepaling van dimetridazol in eieren een methode ontwikkeld, waarbij, na extractie met dichloormethaan uit het eimonster, vloeistof-vloeistofextractie tussen acetonitril en hexaan wordt toegepast. Hierna wordt de acetonitrilfase, na indampen tot droog, opgenomen in buffer. Deze oplossing wordt opnieuw gezuiverd met hexaan. En, na uitschudden van dimetridazol uit de bufferoplossing met dichloormethaan, vindt uiteindelijk nog zuivering plaats met iso-octaan (Beek et al., 1984).

Aan de vloeistof-vloeistofextracties zijn een aantal nadelen verbonden. Emulsievorming blijkt het grootste struikelblok bij de opzuivering van eimonsters. Horwitz (1981) noemt ter verbreking van emulsies: het laten staan van de emulsie tot fasenscheiding is opgetreden, verwarmen van de emulsie, centrifugeren van de oplossing, overbrengen van de emulsie-vloeibare fase in een groter volume extractie-vloeistof, toevoegen alcohol, aceton of zout, het kiezen van andere extractievloeistoffen of het in bewerking nemen van minder monstermateriaal in een groter volume extractievloeistof.

Ook indampen van grote volumina oplosmiddelen, gebruik van grote hoeveelheden toxische en brandbare oplosmiddelen, kostbaar, arbeidsintensief, onzuivere en waterbevattende extracten, soms niet kwantitatieve extracties en niet-reproduceerbare extracties spelen een belangrijke rol. Derhalve is, vnl. ter voorkoming van emulsievorming, gezocht naar alternatieve opzuiveringsmethoden. Geertsma et al. (1987) beschrijven een bepalingmethode voor residuen van sulfadimidine en metabolieten in eieren door de eiwitten te precipiteren met 0,66 M perchloorzuur. Na neutralisatie van het supernatant is de oplossing injecteerbaar op HPLC. Ook Botsoglou et al. (1984), maken bij de bepaling van tetracyclines in eieren gebruik van de mogelijkheid eiwit te precipiteren. Na toevoegen van calciumchloride-oplossing, natriumbarbital-oplossing, natriumfenylbutazon-oplossing en dichloormethaan wordt gecentrifugeerd. Daar opvolgend wordt de organische fase gefiltreerd en uitgeschud met fosforzuur, waarna injectie op HPLC plaats kan vinden.

De laatste jaren worden steeds meer solid-phase-extracties toegepast. Hoewel deze extracties voornamelijk worden gebruikt bij vlees, melk en voeders zijn er ook enkele bekend ter zuivering van eimonsters. Hori (1983) maakt in zijn bepalingmethode van anti-bacteriële stoffen twee keer gebruik van de solidphase-extractie. Een acetonitril-extract van het eimonster wordt na ontvetten met hexaan op een aluminiumkolom gebracht. Elutie hierna van de te bepalen componenten geschiedt met methanol-mengsels. Het methanol-eluaat wordt vervolgens op een Sep-Pak C₁₈-kolom gebracht. Hierna wordt geëlueerd met acetonitril bevattende mengsels. De aldus verkregen eluaten zijn direct injecteerbaar op HPLC.

De Sep-Pak C₁₈-kolom wordt ook gebruikt door Terada et al. (1983). Met silicagel wordt het eimonster gedroogd, waarna extractie met dichloormethaan plaatsvindt. De hier te bepalen sulfonamides worden uit de organische fase geëxtraheerd met zoutzuur, waarna de waterfase op een Sep-Pak C₁₈-cartridge gebracht wordt. Elutie vanaf de kolom geschiedt met methanol, waarna injectie op HPLC kan volgen.

Trucksess et al. (1984) beschrijven een zeer uitgebreide bepalingsmethode voor de bepaling van aflatoxinen in eieren waarin gebruik wordt gemaakt van silicagel-kolomchromatografie.

Na toevoegen van verzadigde natriumchloride-oplossing en aceton wordt gefiltreerd. Opnieuw wordt gefiltreerd, na water toegevoegd te hebben. Vervolgens wordt vloeistof-vloeistofextractie toegepast. Het uiteindelijk, na indampen, verkregen residu wordt opgenomen in dichloormethaan-aceton (98+2). Deze oplossing wordt op een silicagel-kolom gebracht. Elutie hierna vindt plaats met chloroform-aceton (98+2).

Silicagel-chromatografie wordt eveneens voor de bepaling van aflatoxinen in eieren toegepast door Wolzak et al (1985). Na toevoegen van een verzadigde natriumchloride-oplossing worden de monsteroplossingen verwarmd. Citroenzuur en aceton wordt toegevoegd, waarna wordt gefiltreerd. Een deel van de nu nog aanwezige storende stoffen wordt neergeslagen met loodacetaat-oplossing, ammoniumsulfaat en Celite. Het filtraat hiervan wordt verder gezuiverd door vloeistof-vloeistofextractie en solidphase-extractie. In bepalingen, beschreven door Hoshino et al. (1980) voor de bepaling van clopidol en Trucksess et al. (1977) voor de bepaling van aflatoxinen wordt gebruik gemaakt van diatomeeën-aarde. Na filtreren van eimonsters, waaraan is toegevoegd methanol en diatomeeën-aarde, wordt bij Hoshino et al. de methanol-fractie op een Dowex 1 X8-kolom gebracht. Trucksess et al. filtreren, na toevoegen van water, diatomeeën-aarde en aceton aan ei. Precipitatie van ongewenste componenten geschiedt met een loodacetaat-oplossing. Na filtreren vindt nog vloeistof-vloeistof-extractie plaats. Uiteindelijk wordt een solidphase-extractie met een silicagel-kolom uitgevoerd.

Diatomeeën-aarde, in de vorm van een Extrelut[®]-kolom, wordt gebruikt door Keukens et al (1986) bij de bepaling van chlooramphenicol in vlees. Na extractie van chlooramphenicol uit het vlees met water, wordt een deel van het extract op een Extrelut-kolom gebracht. Na elueren met dichloormethaan en indampen van deze organische fase wordt het residu opgenomen in water. Slechts zuivering met toluen hoeft plaats te vinden, alvorens de waterfase op HPLC geïnjecteerd kan worden.

Aerts et al. (1986) beschrijven een volledige automatische analyse van sulfaguanidine en andere sulfonamiden in ei. Hierbij wordt gebruik gemaakt van automatische voorzuivering via dialyse, waarna het dialysaat on-line geconcentreerd wordt, via backflush gescheiden m.b.v. HPLC en via post-column derivatisering gedetecteerd.

2.6 SOLIDPHASE-EXTRACTIES

Ter vervanging van klassieke extracties worden steeds vaker vaste stof solidphase-vloeistofextracties toegepast. Hierbij wordt veelal gebruik gemaakt van korte, wegwerp kolommetjes. Enerzijds kunnen deze gebruikt worden voor verwijdering van ongewenste verontreinigingen in het monster, anderzijds voor concentrering van de te bepalen component(en). Bij zuivering wordt een oplossing, welke het analyte bevat, over een kolommetje geleid, waarbij de te bepalen component doorloopt en storingen geadsorbeerd worden. Het eluaat is dan schoner. Bij concentrering wordt de oplossing ook over het kolommetje geleid, maar nu wordt de te bepalen component vastgehouden en worden storende stoffen weggespoeld. Vervolgens wordt het analyte met een klein volume oplosmiddel van het kolommetje geëluëerd.

Voor beide toepassingen worden kolommaterialen op Silica-basis (normal- en reversed-phase) en ionenwisselings of polymere materialen (XAD) gebruikt.

Een ander type materiaal is diatomeeën-aarde. Een waterige oplossing wordt geadsorbeerd door de diatomeeën-aarde en blijft als een film achter op het kolommateriaal. Elutie vanaf de kolom van de te bepalen component(en) geschiedt vervolgens met een organisch oplosmiddel. Op deze wijze kunnen stoffen vanuit de waterfase in de organische fase geëxtraheerd worden.

Deze extractiemethode blijkt dus een van de klassieke extracties sterk afwijkende vloeistof-vloeistofextractie te zijn. Hierbij is het optreden van emulsies uitgesloten. Bovendien betekent deze wijze van extraheren een besparing van oplosmiddelen, materiaal en tijd. Het eluaat, vaak bestaande uit een zo klein mogelijk volume organische fase, kan ofwel direct voor de bepaling gebruikt worden, ofwel eerst ingedampt worden. De pH-waarde van de te adsorberen waterfase kan variëren van 1-13. Derhalve is het mogelijk stoffen bij hun optimum pH te elueren, hetgeen ten goede komt aan de recovery. Ook kunnen zuren, basen en neutrale stoffen gescheiden worden door de pH van de 'stationaire waterfase' (film) te veranderen. In vergelijking tot de klassieke vloeistof-vloeistofextracties is met deze 'solidphase-extracties' de snelheid en specificiteit toegenomen.

De hier gebruikte Extrelut[®]-kolommen zijn 50 ml plastic-kolommen, gevuld met ca. 18 g diatomeeën-aarde. Een dergelijke kolom kan 20 ml waterfase adsorberen. In 10-15 min. verdeelt de waterfase zich als 'stationaire fase' (film) over de kolom. Hierna vindt elutie vanaf de kolom veelal plaats met ca. 40 ml organisch oplosmiddel. Deze extractie duurt 5-20 min. Het dode volume van de kolom bedraagt ongeveer 15 ml. Er bestaan kolommen, variërend van 1-300 ml volume.

Als elutiemiddelen kunnen alle niet met water mengbare organische oplosmiddelen, zoals diethylether, ethylacetaat, hexaan, chloroform, dichloormethaan, e.a., gebruikt worden. Ook worden soms mengsels van apolaire organische oplosmiddelen met polaire oplossingen, b.v. chloroform/methanol (85/15), toegepast.

Omdat de polaire oplosmiddelen een deel van de waterfase kunnen mee elueren, mag het aandeel van polaire oplosmiddelen niet te groot zijn. Bovendien kunnen door te polaire elutiemiddelen te gebruiken vele storende (polaire) componenten meegeëluëerd worden. Hierdoor kan water in storende componenten terecht komen, hetgeen uiteraard zoveel mogelijk vermeden dient te worden.

2.7 HPLC

Bij hoge-druk-vloeistofchromatografie (HPLC) wordt in overwegende mate reversed-phase-chromatografie toegepast. Veelal wordt als stationaire fase gebruik gemaakt van silica-gel, gecoat met octyl- of octadecylgroepen (C₈ resp. C₁₈). De pakkingsdeeltjes hebben een diameter, variërend van 3-10 µm. Hierbij worden in de regel als loopmiddelen mengsels van water (of bufferoplossingen) met methanol of acetonitril gebruikt. Sinds enkele jaren worden zgn. cartridges (HPLC-kolommen gepakt met 3 µm-deeltjes) toegepast. Deze kolommetjes kennen als voordelen t.o.v. de conventionele kolommen o.a. dat zij economischer zijn en visuele controle van de toestand van de kolom mogelijk maken. Voor de detectie van de geëluëerde verbindingen wordt meestal gebruik gemaakt van meting van lichtabsorptie in het UV-gebied. Voor een goede gevoeligheid dient bij voorkeur gedetecteerd te worden bij een maximale golflengte.

Er bestaat een verband tussen de geïnjecteerde hoeveelheid stof Q en de bij het piekmaximum gevonden extinctie E:

$$Q = V_r \cdot \frac{E}{ESP} \cdot 10^{-2} \sqrt{\frac{2}{N}}$$

, waarin: V_r = retentievolume (ml)
ESP = specifieke extinctie van de stof bij betreffende golflengte,
N = schotelgetal van de gebruikte kolom

De resolutie van twee pieken is een maat voor de kwaliteit van de scheiding van de pieken op een bepaalde kolom. De mate van scheiding wordt bepaald door de afstand tussen de pieken en de breedte van ieder van de pieken. De resolutie, R_s , wordt gedefinieerd als de piekscheiding, gedeeld door de gemiddelde piekbreedte voor twee componenten.

In formule : $R_s = 1/2 \left\{ \frac{1-\alpha}{1+\alpha} \right\} \left\{ \frac{\bar{k}'}{\bar{k}'+1} \right\} \sqrt{N}$

met $\alpha = \frac{k'1}{k'2}$ (selectiviteit)

$\bar{k}' = 1/2 (k'1 + k'2)$ (de gemiddelde capaciteitsfactor)

$k' = \frac{\text{hoeveelheid stof in stationaire fase}}{\text{hoeveelheid stof in mobiele fase}} = K \cdot \frac{V_s}{V_m}$

K = verdelingscoëfficiënt v/d stof over de fasen

V_s en V_m: volumina stationaire en mobiele fase

N = schotelgetal van de kolom en is een maat voor de scheidingsefficiency van de kolom

In formule: $N = \left(\frac{t_R^2}{\sigma} \right)$ waarin t_R = retentietijd
 σ = piekbreedte op 1/2 hoogte

De schotelhoogte H wordt gegeven door:

$H = \frac{L}{N}$ L = lengte kolom.

De kolomefficiency wordt het best gegeven door de gereduceerde schotelhoogte k:

$h = \frac{H}{dp}$, dp = deeltjesgrootte kolom materiaal.

De mobiele fase heeft een tijd t_0 nodig om de kolom te doorlopen. De capaciteitsfactor k' geeft de verhouding weer tussen de tijd, die de stof in de stationaire fase doorbrengt en de tijd, die de stof in de mobiele fase verkeert. Derhalve wordt de tijd t_R die de stof nodig heeft om de kolom te doorlopen gegeven door

$t_R = t_0 + k' t_0$. Hieruit volgt: $k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$

Ten behoeve van scheiding tussen twee componenten is derhalve van belang:

1. componenten moeten verschillende verdelingscoëfficiënten hebben:

$$k'1 \neq k'2$$

2. de componenten moeten vertraagd worden: $k' \neq 0$

3. de kolom moet een minimaal aantal schotels hebben.

Uitermate belangrijk hierbij is de piekbreedte zo klein mogelijk te houden. Piekverbreding kan optreden door:

1. diffusie in de lengterichting van het chromatografisch systeem,
2. weerstand tegen massa-overdracht tussen mobiele en stationaire fase,
3. verschillen in stroomsnelheid binnen de mobiele fase.

ad. 1. Deze bijdrage aan de piekverbreding wordt kleiner, naarmate de diffusiecoëfficiënt kleiner wordt, de verblijftijd kleiner is (snelheid mobiele fase groter en k' kleiner) en deeltjesgrootte groter wordt.

ad. 2. Deze bijdrage wordt groter wanneer de snelheid groter wordt. Vergroting van de deeltjesgrootte zorgt voor een langere diffusie-weglengthe en beïnvloedt zo de massa-overdracht op nadelige wijze.

ad. 3. Een slechte, losse pakking met grote verschillen in pakkingsdichtheid vertoont een zeer slechte flow uniformiteit (er kunnen b.v. kanalen ontstaan).

Voor het opvoeren van het scheidend vermogen zijn een aantal methoden beschikbaar. Enkele hiervan zijn:

1. Verlenging van het systeem; het schotelgetal van een kolom neemt evenredig toe met de lengte van de kolom. Het nadeel van deze methode is het grotere drukverval, dat nodig is om de oorspronkelijke snelheid van de mobiele fase te handhaven.

2. Snelheid van de mobiele fase optimaliseren; In het gebied boven de optimale snelheid kan door vermindering van de snelheid toename in het schotelgetal verkregen worden. Dit betekent wel een toename in analyseduur.

3. Verbetering van de structuur van de pakking van de kolom; Dit kan bereikt worden door deeltjes te gebruiken met betere bolvorm, deeltjesgrootte constant te houden en de pakmethode van de kolom te verbeteren.

4. Deeltjes met kleinere diameter nemen; Nadeel is dat het drukverval over de kolom omgekeerd evenredig met het kwadraat van de deeltjesdiameter toeneemt.

5. Geringe belading met stationaire fase toe passen; Hierdoor neemt de laagdikte van de film van de stationaire fase af, waardoor de massa-overdracht beter wordt.

Naast de piekverbreding in de kolom kunnen, in meer of mindere mate, ook buiten-kolom effecten zorgen voor een afname van het scheidend vermogen van een chromatografisch systeem.

Verbreding kan ontstaan in detector, injector en de koppelstukken. Dit wordt vnl. veroorzaakt door flow-menging. Zelfs bij het brengen van een monster met een punt-injectie op de kolom, kan naast axiale, ook radiale dispersie optreden, hetgeen ontstaat door moleculaire diffusie en stroomsplitsing wanneer het eluens om een pakkingsdeeltje heen stroomt. Afwijkende flow-patronen kunnen ontstaan bij verstoring van de pakking van de kolom.

3. METHODEN-ONTWIKKELING HEEL-EI

3.1 OPZET ONDERZOEK

De opzet van dit bijvakonderzoek was om de toepassing van Extrelut-kolommen te testen in de bepaling van residuen van diergeneesmiddelen (nitro-imidazolen) in kippe-eieren na een waterige extractie.

Hierbij dient de monstervoorbewerking dusdanig te zijn dat de concentraties nitro-imidazolen uiteindelijk met HPLC bepaald kunnen worden. Gekozen is voor HPLC, omdat de nitro-imidazolen voor GC niet vluchtig genoeg zijn (derivatiseren is noodzakelijk) en voor DLC onvoldoende selectiviteit bestaat. Bovendien blijken de ervaringen voor de nitro-imidazolen met HPLC uitstekend (2.5). Een eerste benadering is het opbrengen van een waterig ei-extract op een Extrelut-kolom. Hierna dient deze kolom geëluëerd te worden met een voor de te bepalen component geschikt extractiemiddel. Hieraan voorafgaand of hierop volgend kan een zuiveringsstap ter verwijdering van nog storende (vet)componenten plaats vinden. Vervolgens kan met een geschikt HPLC-systeem het gehalte aan diergeneesmiddelresiduen bepaald worden.

Vanwege de 'gelatineuze' aard van eieren is het niet te verwachten dat eimonsters rechtstreeks (onverdund) op een Extrelut-kolom te verdelen zijn. Derhalve dienen andere mogelijkheden onderzocht te worden.

Bij het literatuuronderzoek is gebleken dat er tot op heden geen waterige extracties ter bepaling van diergeneesmiddelen in eieren zijn uitgevoerd. Ten behoeve van het onderzoek naar de mogelijkheden van waterige ei-extracties zijn de volgende bewerkingen van eimonsters als uitgangspunt gekozen.

Precipitatie van eiwitten kan bewerkstelligd worden door zuur aan het ei toe te voegen (Geertsma et al., 1987 Sulfadimidine in eieren). Na centrifugeren van de oplossing is het wellicht mogelijk een deel van de waterfase over een Extrelut-kolom te verdelen. Derhalve werd de mogelijkheid van toepassing van zure buffers (met de mogelijkheid van pH-instelling van het ei-extract) bij de waterige ei-extracties getest.

Shellhaas (1974) maakt in de door hem beschreven microbiologische bepalingmethode van antibiotica gebruik van verwarmen van het eiwit bij 70°C. Wolzak et al. (1985) maken, na toevoegen van een verzadigde natriumchloride-oplossing, eveneens gebruik van verwarmen van eimonsters voor de bepaling van aflatoxinen. De mogelijkheden van verwarmen van eimonsters, vóór de solidphase-extractie wordt aangevangen, werd eveneens getest.

Ook het effect van toevoegen van een verzadigde natriumchloride-oplossing aan eimonsters, zonder te verwarmen, werd bekeken. Naast Wolzak et al. (1985) maken ook Trucksess et al. (1984) voor het bepalen van aflatoxinen melding van de toepassing van een dergelijke zoutoplossing.

De door Stubblefield et al. (1980) beschreven bepalingmethode voor aflatoxinen vermeldt, naast het gebruik van diatomeeën-aarde, de toepassing van een citroenzuuroplossing. Hoewel de beschreven methode alleen bedoeld is voor vlees-, urine- en bloedanalyses, werd het gebruik van een citroenzuuroplossing eveneens voor de eimonsters getest.

Hiernaast werd ook geprobeerd eimonsters met een Brij-35-oplossing geschikt te maken voor extractie met Extrelut-kolommen. Deze mogelijkheid werd ontleend aan Love et al. (1985), die bij de bepaling van geneesmiddelen in serum gebruik maken van de oppervlakte actieve eigenschappen van Brij-35. Hierdoor zouden eiwitten gesolvateerd worden waardoor directe injectie van plasma mogelijk was. Wellicht zouden ook ei-eiwitten gesolvateerd kunnen worden, zodat een goede verdeling over Extrelut-materiaal bereikt kan worden.

3.2 CHROMATOGRAFIE

3.2.1 Methode

Bereid werden de volgende oplossingen:

3.2.1.1 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat: 34 g KH_2PO_4 wordt opgelost in een 1000 ml-maatkolf en wordt met water aangevuld en gemengd,

3.2.1.2 0,01 M natriumacetaat, pH 6,0 : 0,8 g NaCH_3COO opgelost in 500 ml water wordt met 10% azijnzuuroplossing op pH 6,0 gebracht, waarna met water tot 1000 ml wordt aangevuld en gemengd.

Met deze oplossingen werden eluentia (v/v) samengesteld. En, met deze eluentia werden de volgende HPLC-kolommen getest op scheiding tussen nitro-imidazolen: CP Spher C18 (4,6x250 mm), Hypersil 50DS (4,6x250 mm), μ Bondapak C18 (3,9x300 mm) (conventionele SS-kolommen), Lichrosorb RP18 (3x200), Chromspher C18 (3x200), CP Spher C18 (3x200) (cartridge-kolommen).

Hiertoe werden eveneens standaardoplossingen, bevattende ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol, met elk een concentratie van circa 0,2 μ g/ml te testen eluens, bereid.

Detectie vond plaats bij (UV) 317 nm (λ max. van dimetridazol, Beek et al., 1984). Als voorkolom werd gebruikt een Bondapak C18 (3,9x20 mm) 37-50 μ (Waters)-kolom. Geinjecteerd werd telkens 50 μ l van de standaardoplossingen. Als uitgangspunt werd een eluens, bestaande uit 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) en eluens 0,01 M natriumacetaat pH 6,0-acetonitril 850-150 (v/v) getest.

Variatie werd aangebracht in eluenssamenstelling en de pH van het eluens. Zo werd de buffersterkte van de kaliumdihydrogeenfosfaat-oplossing verdund tot 0,125 M (3.2.1.1 verdunnen). Tevens werden wijzigingen aangebracht in de volumina waterbuffer en acetonitril. Het instellen van de pH van het eluens, bevattende kaliumdihydrogeenfosfaat, geschiedde met enkele druppels geconcentreerd fosforzuur. Tevens werd voor elk eluens de flowsnelheid gekozen tussen 0,5-2,0 ml/min bij gebruik van de conventionele SS-kolommen. Bij cartridge-kolommen werd een flowsnelheid genomen tussen 0,5 en 1,0 ml/min.

Hierbij dient opgemerkt te worden dat, ingeval een HPLC-systeem (puur) methanol bevat, het HPLC-systeem grondig voorgespoeld dient te worden met water, alvorens de eluentia door het systeem gespoeld kunnen worden. Ook dient, na gebruik van de eluentia, het systeem opnieuw eerst goed gespoeld te worden met water, alvorens het HPLC-systeem met methanol weggezet kan worden. Door de hoge bufferconcentratie treedt anders precipitatie van de bufferzouten op.

Een blanco-ei-monster werd opgewerkt volgens de bij de extractie beschreven geschikte methoden. Van de uiteindelijk verkregen waterfase werd 50 μ l geinjecteerd op de ter bepaling van de nitro-imidazolen geschikte HPLC-systemen.

Tot slot zijn UV spectra van de te bepalen componenten in de eluentia 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) en in 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril-methanol 900-40-60 (v/v/v) pH 4,0 opgenomen van 380-220 nm. Hiermede werd de optimale golflengte voor de UV-detectie bepaald.

3.2.2 Resultaten en interpretatie

Een onderdeel van de methodenontwikkeling ter bepaling van de nitroimidazolen in eieren betrof het vaststellen van optimale HPLC-omstandigheden. Getracht werd ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en de voor de eerste 2 verbindingen gemeenschappelijke metaboliet (1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol) met één HPLC-systeem te bepalen.

Als basis werd de methode, beschreven door Beek et al. (1984) genomen. Dit voorschrift vermeldde het gebruik van een CP Spher C18 (4,6x250 mm) 10 μ -kolom bij de bepaling van dimetridazol. Als eluens werd 0,25 M kaliumdihydrogeen-fosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) gebruikt. De resultaten van kolom- en eluenswijzigingen staan, uitgedrukt in capaciteitsfactor en asymmetriefactor, vermeld in tabel 3 (blz. 33).

Met het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) werd op een CP Spher C18 (4,6x250)-kolom een goede scheiding verkregen tussen ronidazol, dimetridazol en ipronidazol. Echter, de metaboliet (2.2;18) had hierbij vrijwel dezelfde retentietijd als ronidazol, waardoor tussen deze twee componenten geen goede scheiding optrad.

Verlagen van de bufferconcentratie kaliumdihydrogeenfosfaat deed in het chromatogram de pieken van ronidazol en de metaboliet (2.2;18) geheel over elkaar heen vallen, waarbij voor dimetridazol en ipronidazol de piekbreedte toenam. Ook in het onderzoek van Beek et al. (1984) bleek dat een sterke zoutconcentratie nodig is om dimetridazol reproduceerbaar te analyseren met een CP Spher C18 (4,6x250)-kolom. Dit wordt veroorzaakt door ion-suppressie die door de sterke zoutconcentratie veroorzaakt wordt (de interactie tussen polaire groepen uit de C18-kolom en de polaire groepen in de nitro-imidazol-verbindingen worden verminderd). Derhalve werden in de concentraties kaliumdihydrogeenfosfaat geen verdere wijzigingen aangebracht.

Bij toename van de hoeveelheid kaliumdihydrogeenfosfaat 0,25 M in het eluens tot een verhouding 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 900-100 (v/v) werd de scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18) verbeterd. Maar, tussen de componenten werd geen algehele scheiding bereikt. Bovendien nam de retentietijd voor ipronidazol zodanig toe, dat bepalen van ipronidazol met dit eluens op deze kolom onmogelijk werd.

Toevoegen van methanol aan het eluens deed de scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18) verbeteren. Het bleek echter niet mogelijk om zowel scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18) als ook een redelijke retentietijd voor ipronidazol te bewerkstelligen.

Hierna zijn getest een Hypersil 50DS (4,6x250 mm) en een μ Bondapak C18 (3,9x300 mm)-kolom.

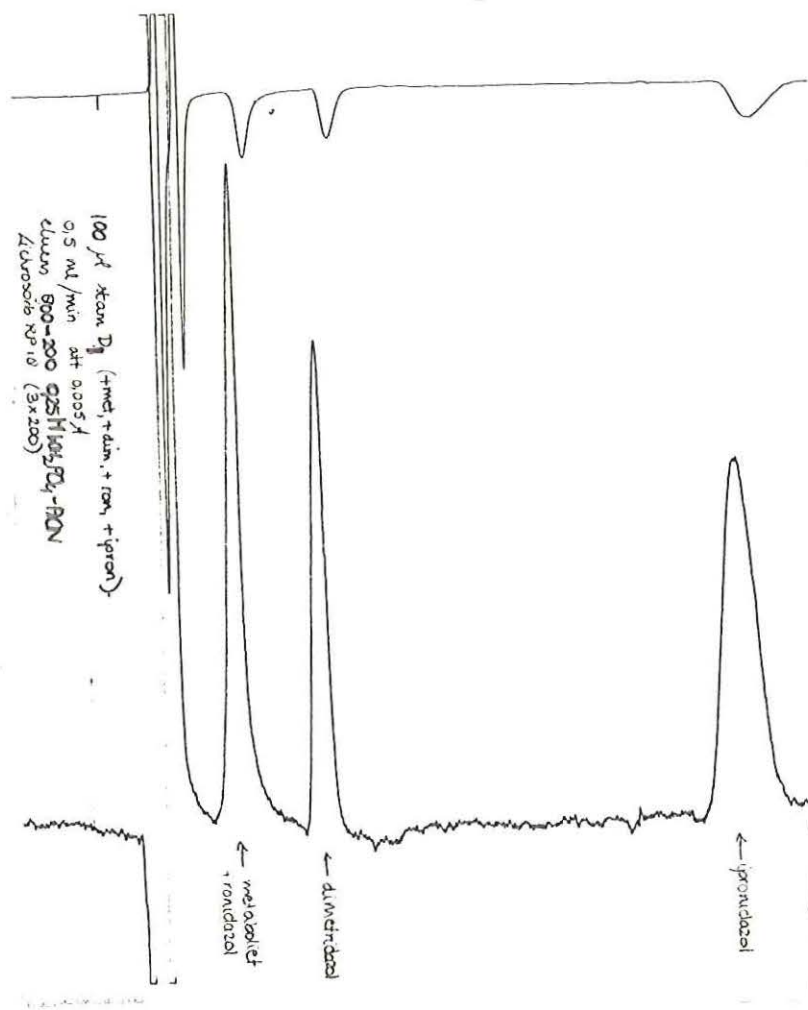
Bij de Hypersil 50DS en de μ Bondapak C18-kolom werden met de CP Spher C18 (4,6x250 mm) overeenkomende scheidingen tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18) verkregen. Wijziging van de hoeveelheid kaliumdihydrogeenfosfaat 0,25 M en/of toevoeging van methanol kon ook hier niet zorgen voor goede scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18). Opvallend is dat ipronidazol, bij gebruik van eenzelfde eluens en flow-snelheid, later van de Hypersil 50DS-kolom en eerder van de μ Bondapak C18-kolom geëluëerd werd dan van de CP Spher C18 (3,9x300 mm). De koolstofbelading kan hier een rol spelen.

Bij de analyse van groeibevorderaars in diervoeders wordt gebruik gemaakt van een μ Bondapak C18-kolom en een eluens bestaande uit 0,01 M natriumacetaat pH 6,0-acetonitril 825-175 (Intern Analysevoorschrift nr. A 394). In dit systeem bleken ook een aantal nitro-imidazolen een redelijk retentiegedrag te vertonen. Derhalve werd ook hier dit eluens en kolom getest. Maar ook hiermee werd geen algehele scheiding tussen de metaboliet (2.2;18) en ronidazol bewerkstelligd. Bovendien liet ipronidazol, en in mindere mate ook dimetridazol, een slechte piekvorm zien.

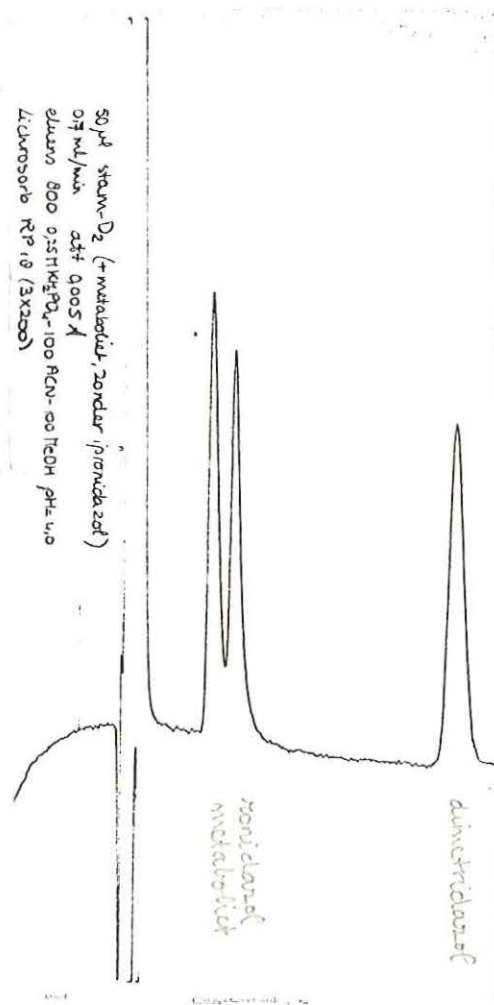
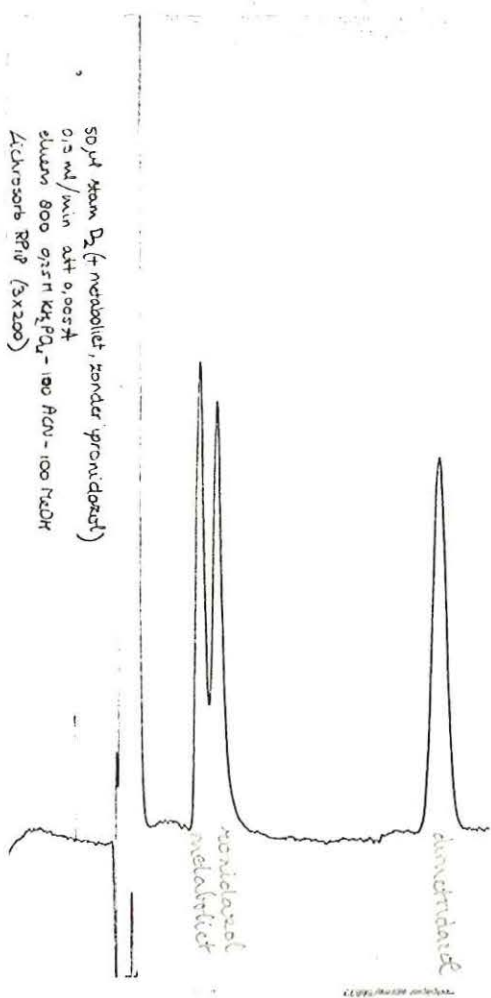
Een drietal Chrom Sep Cartridge-kolommen (2.7. HPLC verbetering scheidend vermogen) werden vervolgens getest:

Lichrosorb RP 18 (3x200 mm), CP Spher C18 (3x200) en Chromspher C18 (3x200).

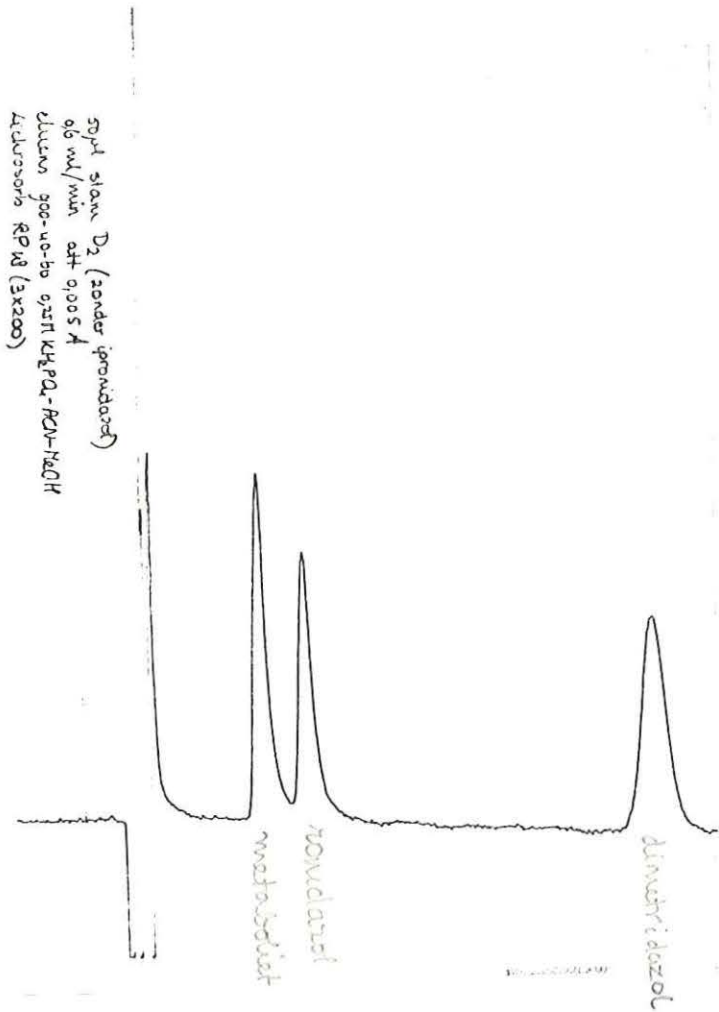
De Chromospher C18-kolom bleek niet te voldoen. De metaboliet (2.2;18) gaf bij gebruik van een 0,01 M natriumacetaat-acetonitril eluens zelfs bij een korte retentietijd (< 5 min) erg lage, uitgestreken pieken. Met het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril werd de metaboliet (2.2;18) niet van de kolom geëluëerd! Het lijkt erop dat dit materiaal nog actieve polaire plaatsen (SiO₂-groepen) bezit. Bij de Lichrosorb RP18-kolom werd bij gebruik van het eluens, bevattende natriumacetaat pH 6,0, scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18) verkregen, indien een verhouding 925-75 0,01 M natriumacetaat pH 6,0-acetonitril gebruikt werd. Waarschijnlijk tengevolge van de lage zoutconcentratie, vertoonde dit natriumacetaat-eluens erg brede (en lage) pieken voor zowel dimetridazol als ipronidazol. Toevoegen van iets methanol aan dit eluens deed de scheiding en piekvorm iets, maar niet voldoende, verbeteren. Verlagen van de pH verbeterde de scheiding tussen de metaboliet (2.2;18) en ronidazol. Echter de retentietijd werd lang en de slechte piekvorm bleef. Het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) vertoonde wel goede pieken voor dimetridazol en ipronidazol op deze kolom. Met dit eluens werd opnieuw een goede scheiding verkregen tussen ronidazol, dimetridazol en ipronidazol, terwijl de metaboliet (2.2;18) een met ronidazol vergelijkbare retentietijd had (chromatogram 1). Verhogen van de verhouding 800-200 tot 900-100 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril verbeterde de scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18). Door toevoegen van iets methanol aan het eluens en door de pH van het eluens te verlagen, werd de scheiding tussen ronidazol en de metaboliet (2.2;18) verbeterd (chromatogram 2 en 3). Een eluenssamenstelling 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitrilmethanol 900-40-60 (v/v/v) met pH 4,0 bleek hiervoor te voldoen (chromatogram 4).



Chromatogram 1



Chromatogram 2 en 3



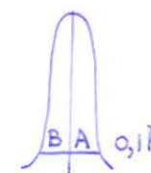
Tabel 3. Resultaten chromatografie

| Kolom | Eluens | $k' = \frac{t^R - t^0}{t^0}$ | | | | $f_{as} = \frac{A}{B}$ op 0,1 h | | | |
|----------------------------------|--|------------------------------|------|-------|-------|---------------------------------|------|------|------|
| | | M | R | D | I | M | R | D | I |
| <u>Conventionele SS-kolommen</u> | | | | | | | | | |
| * CP Spher C18 (4,6x250 mm) | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | 0,46 | 0,53 | 2,08 | 8,11 | 1,18 | 1,11 | 0,64 | 0,63 |
| - idem | 0,125 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | 0,55 | 0,55 | 2,23 | 9,02 | 1,37 | 1,27 | 0,70 | 0,70 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 900-100 | 2,25 | 2,83 | 6,8 | 20,08 | 2,00 | 1,49 | 0,71 | 1,59 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN-MeOH 800-125-75 | 1,09 | 1,32 | 3,45 | 11,55 | 2,50 | 2,00 | 1,25 | 1,43 |
| * Hypersil 50DS (4,6x250 mm) | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | 0,52 | 0,52 | 2,38 | 12,55 | 1,25 | 1,09 | 0,78 | 0,58 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 925-75 | 2,43 | 2,76 | 7,39 | 27,38 | 1,54 | 1,54 | 0,68 | 0,72 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN-MeOH 900-80-20 | 2,21 | 2,53 | 6,53 | 24,54 | 1,67 | 1,37 | 2,00 | 0,78 |
| * μBondapak C18 (3,9x300mm) | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | 0,51 | 0,51 | 2,18 | 7,58 | 1,11 | 1,20 | 1,11 | 2,00 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 900-100 | 2,18 | 2,87 | 7,03 | 26,95 | 1,18 | 1,15 | 1,09 | 1,82 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN-MeOH 900-50-50 | 2,13 | 2,89 | 6,76 | 25,03 | 1,20 | 1,27 | 1,14 | 0,60 |
| - idem | 0,01 M NaAc pH 6,0-CH ₃ CN 850-150 | 0,83 | 1,41 | 2,58 | 9,41 | 3,03 | 2,00 | 1,82 | 0,62 |
| - idem | 0,01 M NaAc pH 6,0-CH ₃ CN 925-75 | 1,89 | 2,32 | 5,67 | 18,89 | 2,00 | 2,22 | 1,75 | 0,63 |
| <u>Cartridge-kolommen</u> | | | | | | | | | |
| * Lichrosorb RP18 (3x200) | 0,01 M NaAc pH 6,0-CH ₃ CN 850-150 | 1,00 | 1,00 | 2,05 | 7,80 | 2,50 | 1,00 | 1,05 | 1,25 |
| - idem | 0,01 M NaAc pH 6,0-CH ₃ CN 925-75 | 2,21 | 2,46 | 5,23 | 28,23 | 2,86 | 1,00 | 1,25 | 1,18 |
| - idem | 0,01 M NaAc pH 6,0-CH ₃ CN-MeOH 925-75-20 | 2,19 | 2,53 | 5,17 | 27,93 | 1,54 | 1,00 | 1,11 | 1,18 |
| - idem | 0,01 M NaAc pH 4,0-CH ₃ CN 925-75 | 3,17 | 3,92 | 6,87 | 30,91 | 1,05 | 1,00 | 1,18 | 2,22 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | 1,07 | 1,07 | 2,20 | 8,20 | 1,00 | 1,00 | 1,88 | 1,05 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 900-100 | 2,23 | 2,37 | 3,65 | 18,35 | 1,05 | 1,05 | 1,75 | 1,25 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN-MeOH 800-100-100 pH=4,0 | 1,90 | 2,40 | 7,15 | - | 1,00 | 1,00 | 1,25 | - |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN-MeOH 900-40-60 pH=4,0 | 2,08 | 2,92 | 9,17 | - | 1,33 | 1,33 | 0,88 | - |
| * Chromspher C18 (3x200) | 0,01 M NaAc-CH ₃ CN 850-150 | 0,88 | 0,91 | 2,08 | 6,96 | 5,55 | 2,00 | 2,00 | 1,75 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | - | 0,56 | 1,22 | 4,00 | - | 4,00 | 4,00 | 3,44 |
| * CP Spher C18 (3x200) | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 925-75 | 2,91 | 3,91 | 10,52 | 34,71 | 2,78 | 1,18 | 1,11 | 1,82 |
| - idem | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN-MeOH 900-40-60 pH=4,0 | 2,78 | 3,80 | 7,41 | 24,67 | 3,03 | 2,27 | 2,22 | 2,00 |

k' = capaciteitsfactor
 f_{as} = asymmetriefactor
 M = metaboliet (2.2;18)

R = ronidazol
 D = dimetridazol
 I = ipronidazol

- = niet te bepalen of niet bepaald
 t_r = retentietijd
 t₀ = dode tijd



In dit systeem (de samenstelling, leverend chromatogram 4) bleek echter ipronidazol niet meer te bepalen, omdat deze component nu dermate laat van de kolom geëluëerd werd, dat erg brede pieken ontstonden.

Bij de CP Spher C18 (3x200) kolom leverde eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) uitgestreken pieken voor de metaboliet (2.2;18). Door toevoegen van methanol aan het eluens werd de piekvorm van de metaboliet (2.2;18) en de scheiding tussen de metaboliet (2.2;18) en ronidazol verbeterd. Een goede scheiding werd ook hier verkregen door 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril-methanol 900-40-60 (v/v/v) pH 4,0 te gebruiken. Ook hier had ipronidazol een te lange retentietijd. Overigens waren de pieken met deze CP Spher C18-kolom iets lager dan met de Lichrosorb RP 18-kolom.

Uit de resultaten wordt geconcludeerd dat de 4 te bepalen componenten met de geteste kolommen en eluentia niet met één HPLC-systeem te bepalen zijn. Ter vaststelling of er nitro-imidazolen aanwezig zijn in een monster, blijkt het meest geschikt te zijn een Lichrosorb RP 18 (3x200), met als eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v), met een flowsnelheid voor het eluens 0,7 ml/min. In dit systeem hebben ronidazol en de metaboliet (2.2;18) een vergelijkbare retentietijd van $\pm 3,5$ min, terwijl dimetridazol na 5 min en ipronidazol na 12 min elueren. Met deze eluenssamenstelling is het mogelijk ipronidazol, dimetridazol en zijn metaboliet (2.2;18) kwantitatief te bepalen. Specifiek is het geval dat ronidazol in het monster aanwezig is. Dan dient een eluens met een andere samenstelling gebruikt te worden. Geschikt hiervoor is het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril-methanol 900-40-60 (v/v/v) pH 4,0 met eluenssnelheid 0,7 ml/min. Ook zijn in dit systeem naast ronidazol, tevens dimetridazol en de (gemeenschappelijke) metaboliet (2.2;18) kwantitatief te bepalen. Retentietijden zijn: metaboliet (2.2;18) 7 min, ronidazol 9 min en dimetridazol 13 min.

Bij gebruik van de kaliumdihydrogeenfosfaat bevattende eluentia kunnen de retentietijden voor de te bepalen componenten in de loop van de tijd (dag) iets toenemen. Derhalve is het wenselijk tussen de te bepalen monsters enkele standaardoplossingen te plaatsen. Indien het eluens wordt rondgepompt, gedurende 24 uur vóór de HPLC-analyse uitgevoerd wordt, verlopen de retentietijden nauwelijks.

Injectie van blanco-ei-monsters op de twee gekozen HPLC-systemen levert bij gebruik van het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) één duidelijke piek, afkomstig van het ei, in het chromatogram. Deze piek stoort de analyse niet, omdat deze component een retentietijd heeft van 7 minuten. Bij gebruik van het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril-methanol 900-40-60 (v/v/v), pH 4,0 wordt van deze piek eveneens geen storing ondervonden, omdat de piek dermate laat van de kolom geëluëerd wordt, dat het nauwelijks als piek waar te nemen is.

De optimum golflengte voor de UV-detectie is bepaald door de in de te gebruiken eluentia opgenomen UV-spectra voor ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en metaboliet (2.2;18) over elkaar te plotten. Hierbij bleek dat de optimum golflengte 313 nm is. (Dit is niet de golflengte, waarbij per verbinding de absorptie maximaal is, maar die golflengte, waarbij voor de 4 verbindingen "tegelijkertijd" het maximale aan absorptie bereikt wordt).

3.3. EXTRACTIE

3.3.1 Methode

De in tabel 2 genoemde opwerkingen van eimonsters zijn uitgevoerd, na bereiden van de volgende 'reagentia':

3.3.1.1 Extrelut-kolom: in een plastic Extrelutbuis, van onder afgesloten door een 10 mm-ronde filter in een filterhouder, wordt ca. 18 g Extrelutmateriaal (Merck art. 11738) gebracht. Het Extrelutmateriaal wordt vervolgens goed aangeklopt. Hierna wordt een 24 mm-ronde filter met behulp van een inzetstuk op de kolom geplaatst, waarna het inzetstuk stevig wordt aangedrukt; Bij een losgepakte Extrelut-kolom wordt het inzetstuk niet stevig aangedrukt, maar er los bovenop geplaatst.

3.3.1.2 0.1 M resp. 0,5 M Natriumacetaat pH 4,0: opgelost wordt 8,2 resp. 41 g CH₃COONa in 500 ml water, waarna de pH met ijsazijn op pH 4,0 wordt gebracht en met water aangevuld tot 1000 ml.

3.3.1.3 20%-citroenzuur: 20 g citroenzuur-monohydraat wordt opgelost in 100 ml water.

3.3.1.4 Verzadigde natriumchloride-oplossing: 360 g NaCl wordt opgenomen in 1000 ml water.

3.3.1.5 0,6%, 0,03% en 0,003% Brij-35: bereid door een 30% Brij-35-oplossing (Technicon[®] diagnostics, prod.no. T21-0110-15) te verdunnen met water.

Tabel 2: Extractie-procedure

| Verdunnings- middel van eimonster | volume verdunnings- middel | Verwerking vóór Extrelut-extractie |
|---|----------------------------------|---|
| 1. Water | 20 ml | ----- |
| 2. 0,1 M CH ₃ COONa pH 3,0/4,0/5,0 | 20 ml | ----- |
| 3. 0,1 M CH ₃ COONa pH 4,0 | 25 ml | centrifugeren + vloeistof- vloeistof-extractie |
| 4. 0,5 M CH ₃ COONa pH 4,0 | 25 ml | ----- |
| 5. water/0,5 M CH ₃ COONa pH 4,0 | 25 ml | verwarmen (+ centrifugeren) |
| 6. verzadigde NaCl-oplossing | 25 ml | ----- |
| 7. 20% citroenzuur | 20 ml | ----- |
| 8. water | 25 ml | toevoegen NaCl en citroenzuur |
| 9. 0,003/0,03/0,6% Brij-35 | 25 ml | ----- |

Indien niet anders vermeld in onderstaande toelichting op tabel 2, werd de volgende uitvoering aangehouden. Vóór de opwerking van het eimonster werden eieren gehomogeniseerd met een Ultra Turrax gedurende ca. 5 min. Na toevoegen van verdunningsmiddel aan 10 g ei werd de verkregen oplossing goed gemengd. Van het waterige ei-extract werd vervolgens 15,0 ml op een Extrelut-kolom gebracht. Na 30 min. werd de kolom geëluëerd met 40 ml dichloormethaan en werd de dichloormethaan-fase onder stikstof bij een temperatuur van 35°C ingedampt.

Toelichting op tabel 2:

ad 1 en 2: Verdunningen met water, 0,1 M CH₃COONa pH 4,0, 0,1 M CH₃COONa pH 3,0 en 0,1 M CH₃COONa pH 5,0 werden bereid door achtereenvolgens 5,0 g, 4,0 g en 3,0 g ei te mengen met 20,0 ml van genoemde verdunningsmiddelen. Dit mengen werd zowel met (5-10 min) als zonder Ultra Turrax uitgevoerd.

ad 3: De met 25,0 ml 0,1 M CH₃COONa pH 4,0 verdunde eimonsteroplossing werd 15 min. gecentrifugeerd bij 20°C en 1000 rpm. De bovenstaande waterfase werd uitgeschud met 25 ml iso-octaan. Hetzelfde werd uitgevoerd, waarbij de waterfase werd uitgeschud met 50 of 100 ml iso-octaan, petroleumether of toluen.

ad 4 en 5: Oplossingen werden gecentrifugeerd bij 20°C bij 2000 rpm en bij 5000 rpm, waarna van bovenstaande waterfase 15,0 ml op een Extrelut-kolom gebracht werd. Verwarmen, als onder 5 genoemd, geschiedde met behulp van een kookplaatje. Variaties werden aangebracht in temperatuur tijdens het verwarmen, tijd van verwarmen, meer of minder roeren tijdens verwarmen en toevoegen van hete buffer.

ad 6 en 7: Eimonster, verdund met verzadigde NaCl-oplossing of 20% citroenzuur werd rechtstreeks op een losgepakte Extrelut-kolom gebracht.

ad 8: Na menging met water werd natriumchloride en citroenzuurmonohydraat toegevoegd in achtereenvolgens de volgende hoeveelheden: 1 g resp. 0,5 g, 1 g resp. 1 g, 2 g resp. 1 g en 2 g resp. 2 g.

ad 9: Met Brij-35 verdunde eimonsters werden rechtstreeks op een losgepakte Extrelut-kolom gebracht. Ook werd van met Brij-35 gemaakte eimonsterverdunningen telkens 15,0 ml gemengd met ca. 18 g Extrelut-materiaal, waarna (na 20 min) een Extrelut-kolom wordt gepakt (3.2.1.1). Bovendien werden met Brij-35 gemaakte verdunningen, na homogeniseren met Ultra Turrax, gecentrifugeerd met 5000 rpm gedurende 15 min. Van bovenstaande fase werd 15,0 ml op een losgepakte Extrelut-kolom gebracht.

3.3.2 Resultaten en Interpretatie

Op een niveau van 10 ppb (10 µg/kg) bepalen van diergeneesmiddelresiduen in eieren, maakte het noodzakelijk dat er circa 10 g ei geëxtraheerd werd. Eimonsters dienden, na goed gehomogeniseerd te zijn, verdund te worden alvorens 'solidphase-extractie' met Extrelut uitgevoerd kon worden. Alle 'solidphase-extracties' werden hier getest door te elueren met dichloormethaan.

1. Verdunning ei met water

Van de met water verdunde eimonsters was na enkele uren slechts 5-10 ml over de Extrelut-kolom verdeeld. Ook na mengen met de Ultra Turrax bleek het zelfs met behulp van vacuum niet mogelijk de oplossingen over de kolommen te verdelen.

2. Verdunning ei met natriumacetaat 0,1 M

Eimonsters verdunnen met 0,1 M natriumacetaat pH 4,0 leverde geringe precipitatie van eiwitten op. Meer precipitatie ontstond bij verlagen van de pH van de buffer. De verdunningen verdeelden zich in 10-15 min. over de kolom, m.u.v. de met 0,1 M natriumacetaat pH 5,0 verdunde eimonsters. Deze laatste verdunningen bleven bovenop de Extrelut-kolom staan. In de verdeling over de Extrelut-kolommen werd nauwelijks verschil waargenomen bij mengen met en zonder Ultra Turrax. Vervolgens elueren met dichloormethaan duurde voor de verdunning 0,1 M natriumacetaat pH 4,0 -ei: 20-3 circa 1 uur, terwijl bij de overige verdunningen elutie vanaf de kolom niet mogelijk was (de dichloormethaan bleef bovenop de kolom staan).

3. Centrifugeren van eiwitten na verdunning met natriumacetaat 0,1 M

Omdat op deze wijze opwerking van eimonsters niet mogelijk bleek, werd getracht de geprecipiteerde eiwitten door centrifugeren te verwijderen. Er werd echter geen duidelijk pellet gevormd. Derhalve werd op de bovenstaande, troebele, waterfase vloeistof-vloeistof-extractie toegepast. Uitschudden van de waterfase met 25 of 50 ml iso-octaan leverde sterke emulsievorming op. Onder toevoegen van enkele spatelpunten natriumchloride was uitschudden met grote volumina (100 ml) organische oplosmiddelen mogelijk. Echter, de na uitschudden nog troebele waterfasen verdeelden zich niet over de Extrelut-kolommen, zodat ook de mogelijkheid van uitschudden van een waterig ei-extract verlaten werd.

4. Verdunning ei met natriumacetaat 0,5 M

Bij verdunnen van eimonsters met 0,5 M natriumacetaat pH 4,0 trad meer precipitatie van eiwitten op dan bij menging met 0,1 M natriumacetaat pH 4,0. Centrifugeren bij 2000 rpm leverde vorming van een pellet en een nog troebele oplossing.

Bij 5000 rpm centrifugeren werd een duidelijk van de waterfase gescheiden pellet verkregen. 15,0 ml van de waterfase verdeelde zich goed over de Extrelut-kolom en elutie met dichloormethaan verliep binnen 10 min. Na indampen van de dichloormethaanfractie werd een olieachtig residu verkregen. Verdunnen met een natriumacetaatbuffer leek dus alleen zinvol, indien een hoge ionensterkte (0,5 M) gebruikt werd en de geprecipiteerde eiwitten verwijderd werden door de oplossing bij een hoog toerental te centrifugeren.

5. Verwarmen/centrifugeren van met water verdund ei

Verwarmen van met water verdunde eimonsters leverde troebele oplossingen, welke niet rechtstreeks over Extrelut-kolommen te verdelen bleken. Ook centrifugeren leverde problemen op, omdat de geprecipiteerde eiwitten voor een deel in de oplossing bleven zweven en geen duidelijk pellet vormden. Ei, verdund met 0,5 M natriumacetaat pH 4,0 leverde een troebele oplossing. Deze troebeling nam toe tijdens verwarmen. Centrifugeren leverde een duidelijk pellet, maar de bovenstaande waterfase verdeelde zich langzaam over de Extrelut-kolom. Eenzelfde resultaat werd verkregen indien eimonsters opgewerkt werden door hete buffer toe te voegen. Naarmate de tijd van het verwarmen tijdens het mengen langer werd, werd een troebeler oplossing verkregen welke tijdens centrifugeren minder gemakkelijk een pellet vormde. Het leek alsof een steeds steviger gel gevormd werd. Hetzelfde gold voor toename in temperatuur bij het verwarmen. Indien tijdens het mengen minder resp. meer geroerd werd, ontstond meer resp. minder precipitatie van de eiwitten. Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat opwerken van eimonsters met verwarmen op deze wijze niet mogelijk was.

6. Verdunning ei met verzadigde natriumchloride

Het gebruik van een verzadigde natriumchloride-oplossing voor het verdunnen van eimonsters leek een goede oplossing. Door het verbreken van eiwitbindingen door natriumchloride werd een dusdanige oplossing verkregen, dat rechtstreeks verdelen ervan over Extrelut mogelijk was: 15,0 ml trok snel in de kolom en de elutie met dichloormethaan verliep snel (5-10 min).

7. Verdunning ei met 20% citroenzuur

Verdunnen van eimonsters met 20% citroenzuur leverde een oplossing, die zich goed over de Extrelut-kolom verdeelde. Echter, elutie met dichloormethaan verliep niet.

8. Toevoeging natriumchloride en citroenzuur aan verdund ei

Als voorbereiding op de extractie met Extrelut bleek ook een combinatie van toepassen van natriumchloride en citroenzuur geen goede oplossing. Hoewel mengen van eimonsters met water en de geteste hoeveelheden natriumchloride en citroenzuur oplossingen zonder neerslagen leverden, waren deze oplossingen niet over Extrelut te verdelen.

9. Verdunning met Brij-35

Verdunnen van eimonsters met Brij-35-oplossingen deed iets neerslagvorming ontstaan. Deze oplossingen waren niet rechtstreeks over Extrelut-kolommen te verdelen. Indien het Extrelut-materiaal, vóór het pakken van de kolom gemengd werd met deze oplossingen, was extractie met Extrelut mogelijk.

Echter, elutie met dichloormethaan duurde lang (ca. 1 uur). Indampen van de dichloormethaanfractie leverde een olieachtig residu, dat groter was dan bij de verdunning met verzadigde natriumchloride. Variatie in het percentage Brij-35 bracht geen verbetering aan in de elutie vanaf de kolom. Centrifugeren van een verdunning leverde weliswaar een pellet, dat verworpen werd, maar verbeterde de elutie niet.

Naar aanleiding van de gevonden resultaten werd besloten de eimonsteropwerkingen met verzadigde natriumchloride en 0,5 M natriumacetaat pH 4,0 verder te testen.

Hierbij verdiende de methode met verzadigde natriumchloride-oplossing de voorkeur, omdat hierbij een oplossing werd verkregen, die rechtstreeks op de Extrelutkolom te verdelen was. Bij gebruik van 0,5 M natriumacetaat pH 4,0 dienden de geprecipiteerde eiwitten verwijderd te worden vóór extractie met Extrelut plaats kon vinden.

3.4 SPOEL- EN ELUTIESTAPPEN

3.4.1 Methode

Als voorzuivering na de bij extractie (3.3) genoemde eimonster-opwerkingen werd uitgevoerd: na een waterig monster-extract op een Extrelut-kolom gebracht te hebben, werd de kolom met 40 ml petroleumether gespoeld. Hierna vond elutie van de kolom plaats met 40 ml dichloormethaan. Hetzelfde werd uitgevoerd door de kolom vóór de elutie te spoelen met 40 ml iso-octaan of 40 ml hexaan. De dichloormethaanfracties werden ingedampt onder stikstof bij 35°C.

Zuivering van residuen na 'solidphase-extractie' (3.3) geschiedde door deze residuen eerst op te nemen in 1,0 ml 20% acetonitril (200 ml acetonitril + 800 ml water). Deze oplossingen werden uitgeschud met 2 ml iso-octaan of hexaan (door te vortexen). Na centrifugeren bij 20°C met 1500 rpm werd de waterfase over een Acrodisc-filter 0,45 µm (Gelman Sciences, prod. no. 4184) gefiltreerd.

Zuivering werd eveneens getest door het residu in 1,0 of 2,0 ml 20% acetonitril op te nemen en uit te schudden met 5 of 10 ml iso-octaan. Ook de volgende zuivering werd getest. Na indampen van de dichloormethaanfase werd aan het residu 1 ml methanol toegevoegd. Na indampen hiervan werd nog eens 1 ml methanol toegevoegd en ingedampt.

Aan het residu werd vervolgens 1,0 ml 20% acetonitril of 1,0 ml 20% methanol (200 ml methanol + 800 ml water) toegevoegd. De oplossingen werden, door te vortexen, uitgeschud met iso-octaan (1,5 en 10 ml). De waterfase werd na centrifugeren (1500 rpm, 20°C) over een Acrodisc-filter 0,45 µm gefiltreerd.

Tot slot werden residuen opgenomen in 2 ml iso-octaan. Deze oplossing werd uitgeschud met 20% acetonitril. Na centrifugeren (1500 rpm, 20°C) werd de waterige oplossing over een Acrodisc-filter 0,45 µm gefiltreerd.

3.4.2 Resultaten en Interpretatie

Ter vermindering van de olieachtige residuen (vetten etc.), na indampen van de extrelut-extracten, werd getracht vóór de elutie van de kolom plaats vindt, een zuiveringsstap in te passen.

Dit geschiedde door de kolom - na opbrengen van het waterig extract - voor te spoelen met een apolair organisch oplosmiddel, waarvan bekend was dat hier de geneesmiddelen nauwelijks in oplossen. Derhalve werd voorzuivering met iso-octaan, hexaan en petroleumether uitgetest. De elutie met dichloormethaan verliep nu trager (ca. 1 uur) dan voorheen en er werden nog, weliswaar kleinere, olie-achtige residuen verkregen. Omdat nu alsnog een nazuivering uitgevoerd diende te worden, werd de mogelijkheid van voorzuivering niet verder getest.

Derhalve richtte het onderzoek zich op een doeltreffende nazuivering. Veelal wordt een indamp-residu opgenomen in een gering volume van het bij de HPLC-analyse gebruikte eluens. Meestal bestaat het eluens uit mengsels van methanol/acetonitril/water-buffers. Bij de zuivering van het residu werd hier vooreerst gekozen voor 20% acetonitril. Opname van het residu in 1,0 ml 20% acetonitril leverde een witte troebele oplossing. Uitschudden van deze oplossing deed emulsies ontstaan. Ook bleef in vele gevallen het residu bij toevoegen van 20% acetonitril als een pellet in de oplossing liggen. Toevoegen van iso-octaan bracht hierin geen verandering. Bij grotere volumina 20% acetonitril en iso-octaan ontstonden, bij het uitschudden van de in 20% acetonitril opgenomen residuen, in iets mindere mate emulsies. Na centrifugeren en filtreren over een Acrodisc-filter 0,45 μm werden echter slechts in enkele gevallen heldere injecteerbare oplossingen verkregen.

Ook bij indampen vanuit de methanolfase of bij opname van het residu in 20% methanol werden geen verbeteringen geconstateerd.

Een goede mogelijkheid voor de zuivering van het residu, bleek het oplossen van het residu in 2 ml iso-octaan. Uit deze (gele) oplossing dienden de te bepalen componenten geëxtraheerd te worden. Uitschudden met 1,0 ml 20% acetonitril leverde een heldere waterfase en een gele organische fase. Na centrifugeren van de oplossing en filtreren over een Acrodisc-filter 0,45 μm , werd een heldere, op HPLC-injecteerbare, waterige oplossing verkregen. Deze zuiveringswijze werd derhalve in het vervolg van de methodenontwikkeling toegepast.

3.5 RECOVERY

3.5.1 Methode

Stamoplossingen van ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol (2.2;18) in methanol (+ 50 mg/100 ml) werden bereid. Met verdunningen in methanol van deze oplossingen werden eimonsters gespiked, resulterend in 10, 50 en 100 ppb eimonsters. Eimonsters werden opgewerkt met de onder 3.3.2 genoemde mogelijke opwerkingen (verdunning eimonster met verzadigde natriumchloride resp. verdunning eimonster met natriumacetaat 0,5 M) voor de eimonsters als uitgangspunt, waarbij het residu werd opgenomen in iso-octaan en werd uitgeschud met eluens. Recoveries werden bepaald met de onder 3.2.2 genoemde HPLC-systemen. Hiertoe werden de stamoplossingen in methanol doorverdund in het te gebruiken eluens tot met in eimonsters overeenkomende concentraties.

Eimonsters werden gespiked door de methanol-stamoplossingen onder stikstof in te dampen (35°C) en hieraan ei toe te voegen. Recoveries van ronidazol, dimetridazol en ipronidazol werden vervolgens vastgesteld voor de eimonsteropwerking met verzadigde natriumchloride en met 0,5 M natriumacetaat pH 4,0 (3.3.1). Hierna werden dezelfde opwerkingen uitgevoerd, waarbij, na mengen van het ei met de verzadigde natriumchlorideoplossing of de natriumacetaatbuffer, 1,0 ml 20% fenylbutazon (vanwege verdringen van de eiwitbinding) werd toegevoegd. Deze 20% fenylbutazon-oplossing werd bereid door 4 g fenylbutazon op te nemen in 20 ml water en natriumhydroxide-pellets toe te voegen, totdat de fenylbutazon was opgelost (Botsoglou et al., 1984).

Bij de opwerking met verzadigde natriumchloride-oplossing werd nu ook gecentrifugeerd als beschreven bij de natriumacetaatbuffer (3.3.1) (Basisopwerkingen). Ook werden ter 'rigoreuze' precipitatie en verwijdering van ei-eiwitten, eimonsters bewerkt met perchloorzuur 0,6 M, waarna verdere zuivering met Extrelut werd getest.

Voor de opwerking met verzadigde natriumchloride werden achtereenvolgens de in tabel 4 genoemde wijzigingen aangebracht.

Tabel 4. Recovery-experimenten uitgaande van extractie met verz. NaCl-oplossing.

| Verandering in | door |
|--|--|
| 1. Extrelut-elutiemiddel | Ethylacetaat, chloroform, diethylether, 90-10 dichloormethaan-methanol (v/v) |
| 2. Hoeveelheid elutiemiddel | 40-50-60 ml |
| 3. Manier van spikm | - toevoegen te bepalen componenten als methanoloplossing (-100 µl), - toevoegen te bepalen componenten in met verzadigde natriumchloridēdoorverdunde opl. (10 ml) |
| 4. pH ei-verz. NaCl-opl. | variëren pH ei-verz. NaCl-opl., alvorens op Extrelut wordt gebracht: 7-6,5-6,0-5,5-5-4-3 |
| 5. Hoeveelheid en wijze verdelen over Extrelut | mengen 10, 15 en 20 ml ei-extract met Extrelut en kolom los en vast met Extrelut-ei mengsel pakken |
| 6. Polariteit ei-extract | toevoegen methanol aan ei-verzadigde NaCl-opl: toevoegen 0,5 - 1,5 en 2,5 ml methanol aan 35 ml ei-extract; |
| 7. Verhouding ei-verzadigde NaCl-opl. | 10-20, 10-30, 10-40, 10-10 en 10-5 |

Vervolgens werd de recovery van de metaboliët bepaald door 10 g gespiked eimonster te verdunnen met 10 ml zure verzadigde natriumchloride (360 g NaCl/1000 ml water; hieraan toegevoegd 5,0 ml 6 N HCl), waarna 15,0 ml van de oplossing gemengd werd met 18 g Extrelutmateriaal. Na 15 min werd het ei-Extrelut-mengsel kwantitatief in een Extrelutbuis gebracht, waarna, na aankloppen van de inhoud, het inzetstuk losjes aangedrukt werd. Elutie vanaf de kolom vond plaats met 50 ml dichloormethaan. Na indampen van de dichloormethaan-fase werd het residu opgenomen in 2 ml iso-octaan en uitgeschud met 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v). Na centrifugeren en filtreren over Acrodisc-filter 0,45 µm werd geïnjecteerd op HPLC. Hierna werd een volume standaardoplossing ingedampt, overeenkomend met bij de eimonsters in te dampen hoeveelheden. Hierop werd de zuiveringsstap (3.4.1) met iso-octaan en eluens toegepast. Ook rechtstreeks opnemen van het residu in eluens (3.4.2) werd uitgevoerd. Wijzigingen in de zuiveringsstap werden uitgevoerd volgens tabel 5.

Tabel 5. Recovery-experimenten m.b.t. zuiveringsstap.

| Wijziging in | door |
|-----------------------------------|---|
| - "Eluenssamenstelling" | 0,25 M KH_2PO_4 - CH_3CN 800-200, 900-100, 950-50 |
| - pH "eluens" | pH 5,4,3,2 |
| - Temperatuur tijdens uitschudden | verwarmen in waterbad vóór uitschudden bij 35°C |
| - Uitschudtijd | 1-2-5-min. |
| - Verhouding iso-octaan-"eluens" | 1:1 - 2:1 - 3:1 - 5:1 - 10:1 |

Als alternatieve zuiveringsmethode werd getest:

Na indampen van stamoplossing werd het residu opgenomen in 2 ml iso-octaan. Deze oplossing werd uitgeschud met 1,0 ml 1 N HCl door te vortexen gedurende ca. 30 sec (1000-1500 rpm). Na centrifugeren werd de waterfase over een Acrodisc-filter 0,45 μm gefiltreerd. Vervolgens werd aan 500 μl van deze waterfase 100 μl 2,5 M natriumcarbonaat (26,5 g Na_2CO_3 opgelost in 100 ml water) toegevoegd.

Tot slot werd de recovery-lineariteit bepaald door recoveries te bepalen van eimonsters, welke gespiked zijn op 0-10-50-100-250-500 en 1000 ppb. Dit geschiedde op de hiervoor beschreven opwerkingsmethode voor de metaboliet, waarbij de zuiveringsstap met 1 N zoutzuur/2,5 M natriumcarbonaat werd toegepast. Ook werd de recovery-lineariteit bekeken voor standaardoplossingen van 0 0,5 1 2,5 5 en 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$: Stamoplossingen werden ingedampt en vervolgens opgenomen in 1,0 ml 1 N HCl, waarna de oplossing geneutraliseerd werd.

3.5.2 Resultaten en Interpretatie

De standaardoplossingen dienen onder uitsluiting van licht bewaard te worden, omdat zeker ipronidazol lichtgevoelig is. Ook is ipronidazol instabiel in basisch milieu, zodat dit in de bepalingmethode, indien mogelijk, vermeden dient te worden (G.D. van Bruchem, 1983, Intern Analysevoorschrift nr. DGM 33).

Allereerst werden met de basisopwerkingen recoveries voor de moederverbindingen vastgesteld. Bij gebruik van de 0,5 M natriumacetaat-buffer pH 4,0 werden voor ronidazol, dimetridazol en ipronidazol recoveries bereikt van resp. 40, 20 en 10%, terwijl deze recoveries bij gebruik van de verzadigde natriumchloride-oplossing resp. 70, 50 en 10% bedroegen.

Omdat van fenylbutazon bekend is dat het eiwitinteracties met geneesmiddelen kan verbreken (Botsoglou et al., 1984), werd een klein volume 20% fenylbutazon toegevoegd aan een ei-extract. Toevoegen van fenylbutazon aan een met verzadigde natriumchloride-oplossing verdund eimonster deed een neerslag ontstaan. Alvorens het ei-extract op de Extrelut-kolom gebracht kon worden, diende dit gecentrifugeerd te worden. Bij beide eimonster-opwerkingen leverde de toevoeging van fenylbutazon geen verhoging van de recovery op. Bovendien werd door toevoegen van fenylbutazon veel verontreiniging van de ei-matrix meegenomen, hetgeen resulteerde in minder fraaie chromatogrammen.

Het bleek dat een deel van de te bepalen componenten verloren ging bij het verwerpen van het bij centrifugeren gevormde pellet: Indien, na centrifugeren en verwerpen van het pellet, de waterfase werd gespiked, werden recoveries verkregen van 70, 60 en 10% voor resp. ronidazol, dimetridazol en ipronidazol. Ook precipitatie met perchloorzuur leverde een zeer slechte recovery (soms zelfs bijna nihil) voor de nitro-imidazolen op. Derhalve werd voor de verdere methoden-ontwikkeling gekozen voor de ei-opwerking met een verzadigde natriumchloride-oplossing.

Met de in tabel 3 (3.5.1) genoemde wijzigingen op deze opwerking werden de in tabel 6 weergegeven resultaten bereikt. (De bereikte verbeteringen in de recovery werden telkens bij volgende recovery-experimenten doorgevoerd) (blz. 50).

1. Extrelut-elutiemiddel

Elutie met diethylether en de combinatie 90-10 dichloormethaan-methanol leverde verlaging van de recovery op. Dichloormethaan, chloroform en ethylacetaat ontliepen elkaar niet veel wat betreft de recovery. De voorkeur werd echter gegeven aan dichloormethaan, omdat dit organische oplosmiddel de minste stoorpieken in het chromatogram liet zien.

2. Hoeveelheid elutiemiddel

Toename in recovery werd waargenomen door met 50 ml in plaats van met 40 ml dichloormethaan de Extrelut-kolom te elueren, terwijl elueren met 50 of 60 ml dezelfde recoveries leverde. Derhalve diende de kolom geëluëerd te worden met 50 ml dichloormethaan.

3. Manier van spiken

De manier van spiken kan een rol spelen.

In eerste instantie werden voor de 3 verbindingen hogere recoveries verkregen, indien in plaats van oplossen van een ingedampte stamoplossing in eimonsters gespiked werd door toevoegen van methanol-stamoplossingen (-100 µl) of door toevoegen van de te bepalen componenten in met verzadigde natriumchloride-oplossing gemaakte standaardoplossingen (10 ml). Waarschijnlijk speelde de oplosbaarheid van de nitro-imidazolen in ei een rol. Want, indien ingedampte stamoplossingen door ca. 10 min voortdurend te roeren werden opgenomen in het ei, werden met de andere 2 spike-mogelijkheden vergelijkbare recoveries verkregen.

4. pH ei-verz. NaCl-oplossing

Toevoegen van verzadigde natriumchloride-oplossing aan ei leverde een pH voor het mengsel van 7,5-8. Verlagen van de pH door toevoegen van zoutzuur vóór het mengsel op de Extrelutkolom werd gebracht, deed de recovery toenemen. De grootste recovery werd verkregen bij een pH 5,5-6,5. Derhalve werd een verzadigde natriumchloride-oplossing bereid, waaraan zoveel zoutzuur werd toegevoegd dat bij het toevoegen van deze zure verzadigde natriumchloride-oplossing aan ei een pH 5,5-6,5 ontstond voor het verdunde eimonster. Het bleek dat bij menging van 10 g ei met 10 ml zure verzadigde natriumchloride-oplossing een oplossing bevattende 360 g NaCl/1000 ml water + 5 ml 6 N HCl voldeed.

5. Hoeveelheid en wijze verdelen over Extrelut

Bij bovenstaande experimenten werden de ei-extracten over reeds gepakte Extrelut-kolommen verdeeld. Echter, de wijze van verdelen van de ei-extracten over Extrelut bleek van invloed op de recovery. Over het algemeen werden hogere recoveries bereikt, indien ei-extracten gemengd werden met de Extrelut, alvorens de Extrelut-kolom bereid werd. Wel werd hierbij een groter olie-achtig residu verkregen. Waarschijnlijk trad door menging vooraf een betere verdeling op over het beschikbare Extrelut-materiaal, waardoor bij de elutie een beter contact optrad tussen de mobiele en stationaire fase.

Opmerkelijk was hierbij dat menging van 15 ml ei-extract met 18 g Extrelut een beter resultaat leverde dan menging van 20 ml ei-extract met 18 g Extrelut: 20 ml ei-extract bleek een te grote hoeveelheid matrix op te leveren voor de 18 g Extrelut om een goede verdeling over het Extrelut-materiaal te bewerkstelligen. Derhalve werd bij vervolgsperimenten ter verhoging van de recovery telkens met Extrelut-materiaal gemengd. Het beste resultaat werd bereikt indien de Extrelut-kolom, na het in de Extrelut-buis brengen van het ei-Extrelut-mengsel, stevig aangeklopt werd en het inzetstuk er losjes op geplaatst werd. Bij te strak pakken van de kolom liep de dichloormethaan erg slecht over de kolom en trad recovery-verlaging op. Ook werd recovery-verlaging waargenomen, indien de kolom niet aangeklopt werd. In het laatste geval liep de dichloormethaan zo snel over de kolom dat er geen goed contact optrad tussen de mobiele en stationaire fase. De meest ideale doorloopsnelheid bleek 5-10 ml/min.

6. Polariteit ei-extract

Toevoeging van methanol aan het ei-verzadigde natriumchloride-mengsel deed bij elke geteste hoeveelheid methanol al eiwitten neerslaan, waardoor het onmogelijk werd het mengsel rechtstreeks op de Extrelut-kolom te brengen. Na centrifugeren en verwerpen van het pellet trad een verlaging van de recovery op. Ook mengen met Extrelut-materiaal leverde geen goede resultaten op.

7. Verhouding ei-verzadigde NaCl-oplossing

Bij veranderingen in de mate van verdunnen van eimonster vóór gemengd werd met Extrelut, leverden de verhoudingen ei-verzadigde natriumchloride-oplossing 10-10, 10-20, 10-30 en 10-40 dezelfde recoveries, terwijl bij de verhouding 10-5 recovery-verlaging optrad.

Tot nu toe waren recoveries verkregen van ca. 100, 70 en 10% voor achtereenvolgens ronidazol, dimetridazol en ipronidazol. Onder de tot nu toe meest ideale omstandigheden werd ook de recovery van de metaboliët (2.2;18) bepaald als zijnde 60%.

Omdat Beek et al. (1984) bij de gehaltebepaling van dimetridazol gebruikt maakt van stamoplossingen, welke worden ingedampt en daarna opgenomen in eluens werd verondersteld dat dimetridazol wellicht niet voor 100% oplost in het eluens. In de regel worden stamoplossingen doorverdund in eluens. De door Beek et al. toegepaste bereiding van standaardoplossingen moet gezien worden als een correctie op recovery-verlaging, veroorzaakt door de indampstap gevolgd door het oplossen in eluens (Dimetridazol lost na indampen niet voor 100% op in het eluens). Derhalve werden ook hier stamoplossingen ingedampt en rechtstreeks opgenomen in 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200, terwijl tevens de zuiveringsstap met iso-octaan en eluens (3.4.2) werd uitgevoerd. Indampen van de stamoplossingen en opname in 800-200 eluens leverde recoveries voor metaboliet (2.2;18), ronidazol, diemetridazol en ipronidazol van resp. 90-100-80 en 70%. Bij toepassen van de zuiveringsmethode werden recoveries verkregen van resp. 70-100-70 en 10%. Uit deze resultaten bleek voor de metaboliet (2.2;18), dimetridazol en ipronidazol dat een groot deel van de componenten verloren ging bij de vloeistof-vloeistofextractie iso-octaan-eluens. Derhalve werden variaties aangebracht in de zuiveringsstap. De resultaten hiervan staan weergegeven in tabel 7 (blz. 51).

Tabel 6. Resultaten recovery; Extraktie

| Verandering in | door | Recoveries % ** | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----|----|-----|
| | | M | R | D | I |
| Elutiemiddel | ethylacetaat | - | 73 | 53 | +10 |
| | chloroform | - | 63 | 56 | +10 |
| | diethylether | - | 61 | 17 | +10 |
| | 90-10 dichloormethaan-methanol | - | 57 | 23 | +10 |
| Manier van spiken | toevoegen als methanolopl. | - | 72 | 53 | +10 |
| | toevoegen als verz. NaCl-opl | - | 76 | 54 | +10 |
| pH ei-verz. NaCl opl. | 7 | - | 72 | 51 | +10 |
| | 6,5 | - | 79 | 59 | +10 |
| | 6,0 | - | 81 | 65 | +10 |
| | 5,5 | - | 82 | 62 | +10 |
| | 5 | - | 74 | 54 | +10 |
| | 4 | - | 75 | 51 | +10 |
| Hoeveelheid en wijze verdelen | 3 | - | 71 | 52 | +10 |
| | 10 ml ei-extract + Extrelut | - | 89 | 72 | +10 |
| | 15 ml ei-extract + Extrelut | - | 91 | 71 | +10 |
| | 20 ml ei-extract + Extrelut | - | 81 | 64 | +10 |
| | kolom los pakken | - | 74 | 52 | +10 |
| Polariteit ei-extract | kolom vast pakken | - | 92 | 70 | +10 |
| | toevoegen 0,5 ml MeOH aan ei-extract* | - | 45 | 38 | 0 |
| | toevoegen 1,5 ml MeOH aan ei-extract* | - | 47 | 42 | 0 |
| Verhouding ei-verz. NaCl | toevoegen 2,5 ml MeOH aan ei-extract* | - | 32 | 33 | 0 |
| | 10-20 | - | 91 | 65 | +10 |
| | 10-30 | - | 94 | 68 | +10 |
| | 10-40 | - | 93 | 70 | +10 |
| | 10-10 | - | 97 | 69 | +10 |
| Hoeveelheid elutiemiddel | 10-5 | - | 67 | 58 | +10 |
| | 40 ml dichloormethaan | - | 93 | 68 | +10 |
| | 50 ml dichloormethaan | - | 100 | 71 | +10 |
| | 60 ml dichloormethaan | - | 100 | 72 | +10 |

* = centrifugeren en filtreren

- = niet bepaald

M = metaboliet (2.2;18)

R = ronidazol

D = dimetridazol

I = ipronidazol

** Recoveries zijn gemiddelden van slechts enkele waarnemingen (100 en 200 ppb-niveau).

Tabel 7. Resultaten recovery; Zuivering

| Verandering in | door | Recoveries % * | | | |
|---------------------------------|--|----------------|-----|----|-----|
| | | M | R | D | I |
| "Eluenssamenstelling" | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 800-200 | 55 | 98 | 68 | +10 |
| | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 900-100 | 59 | 95 | 66 | +10 |
| | 0,25 M KH ₂ PO ₄ -CH ₃ CN 950-50 | 58 | 101 | 71 | +10 |
| Temperatuur tijdens uitschudden | verwarmen in waterbad 35°C | 57 | 97 | 70 | +10 |
| uitschudtijd | 1 min | 54 | 98 | 71 | +10 |
| | 2 min | 58 | 95 | 67 | +10 |
| | 5 min | 61 | 97 | 69 | +10 |
| Verhouding iso-octaan-'eluens' | 1:1 | - | - | - | - |
| | 2:1 | 59 | 95 | 71 | +10 |
| | 3:1 | 58 | 98 | 69 | +10 |
| | 5:1 | 59 | 97 | 70 | +10 |
| | 10:1 | 55 | 93 | 67 | +10 |
| pH 'eluens' | pH 5 | 59 | 92 | 69 | +10 |
| | pH 4 | 55 | 97 | 69 | 32 |
| | pH 3 | 54 | 95 | 65 | 43 |
| | pH 2 | 56 | 93 | 63 | 70 |

- = niet bepaald

M = metaboliet (2.2;18)

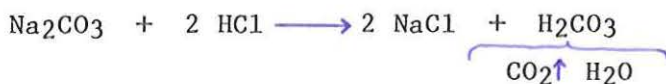
R = ronidazol

D = dimetridazol

I = ipronidazol

* Recoveries zijn gemiddelden van slechts enkele waarnemingen (100 en 200 ppb-niveau).

Bij wijzigen van de samenstelling van de oplossing, waarmee de te bepalen componenten uit de iso-octaanfase geschud werden ("eluensamenstelling") traden geen verbeteringen in de recovery op. Verwarmen tijdens deze zuiveringsstap of verlengen van de extractie-tijd leverde eveneens geen verhoging van de recovery op. Ook werden geen veranderingen in recovery waargenomen indien de verhouding 'eluens'-iso-octaan in de zuiveringsstap veranderd werd. De 1:1 verhouding voor iso-octaan-'eluens' voldeed niet, omdat het olie-achtige residu, na indampen van de dichloormethaan-fase, te groot was om geheel in 1 ml iso-octaan op te nemen. Hierbij ontstonden troebele waterfasen. Uitschudden iso-octaan-'eluens' leverde voor de verhouding 5:1 geen schonere chromatogrammen dan voor 2:1. Bij verlagen van de pH van het 'eluens', waarmee de te bepalen componenten uit de iso-octaan-fase geëxtraheerd werden, nam de recovery voor ipronidazol toe, terwijl voor de overige 3 componenten de recovery gelijk bleef. Het bleek dat bij pH 5 van het 'eluens' ipronidazol in de iso-octaan-fase verdween, terwijl bij pH 2 70% recovery voor ipronidazol werd verkregen. Verder verlagen van de pH werd bereikt door de iso-octaan-fase uit te schudden met 1 N zoutzuur (Beek, 1978, concept). Een nadeel hiervan is dat de oplossing geneutraliseerd dient te worden, alvorens op HPLC kolom geïnjecteerd kan worden. Neutralisatie kan geschieden met natriumcarbonaat:



Ter neutralisatie van 500 µl 1 M HCl is 100 µl 2,5 M Na₂CO₃ nodig. Deze wijze van zuivering leverde een aanmerkelijke verhoging van de recovery voor de eimonsters: ronidazol bleef 100%, terwijl de recoveries voor dimetridazol en ipronidazol 90% bedroegen; de metaboliet (2.2;18) werd voor 80% teruggevonden.

De lineariteit voor de recovery werd bepaald door een ijklijn te maken voor eimonsters, variërend van 0-1000 ppb en voor standaardoplossingen van 0-10 µg/ml. De verkregen ijklijnen staan weergegeven op bijlage 1 (lineariteit standaarden en monsters). Het bleek dat de recovery lineair is voor de metaboliet en ronidazol van 0-1000 ppb en voor dimetridazol en ipronidazol van 0-500 ppb. Voor de "standaarden" werd geconcludeerd dat de metaboliet en ronidazol lineariteit van 0-10 µg/ml en dimetridazol en ipronidazol van 0-5 µg/ml vertonen.

Voor de kwantitatieve gehaltebepalingen dienen derhalve dusdanige verdunningen aangebracht te worden in de monsteropwerking dat een uiteindelijk te injecteren oplossing ontstaat van 0-5 µg/ml voor ipronidazol en dimetridazol, terwijl voor ronidazol en de metaboliet (2.2;18) 0-10 µg/ml voldoet.

Bij het dierexperimenteel onderzoek zijn, gewerkt volgens voorschrift heel-ei (3.7), de in tabel 8 weergegeven recoveries waargenomen.

Tabel 8. Overzicht recoveries van de dierproeven

| 50 ppb | | | | 100 ppb | | | | 500 ppb | | | |
|-----------------------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|---------|----|----|----|
| M | R | D | I | M | R | D | I | M | R | D | I |
| 77 | 93 | 89 | 91 | 88 | 101 | 89 | 90 | 81 | 98 | 86 | 82 |
| 79 | 101 | 87 | 83 | 83 | 102 | 88 | 87 | 76 | 86 | 87 | 81 |
| 83 | 97 | 83 | 92 | 81 | 99 | 87 | 93 | | | | |
| 82 | 98 | 93 | 91 | 77 | 100 | 82 | 92 | | | | |
| 78 | 103 | 95 | 84 | 75 | 97 | 93 | 88 | | | | |
| 73 | 91 | 90 | 87 | 83 | 100 | 95 | 86 | | | | |
| 79 | 101 | 91 | 82 | 78 | 95 | 93 | 87 | | | | |
| Gemiddelde recoveries | | | | | | | | | | | |
| 79 | 98 | 90 | 87 | 81 | 99 | 90 | 89 | | | | |
| Standaarddeviatie | | | | | | | | | | | |
| 3,1 | 4,1 | 3,7 | 3,9 | 4,1 | 2,2 | 4,1 | 2,5 | | | | |

M = metaboliet (2.2;18)

D = dimetridazol

R = ronidazol

I = ipronidazol

3.6 DIODE-ARRAY-BEVESTIGING

Tegenwoordig worden als bevestigingsmethoden veelal GC-MS-analyses uitgevoerd. Deze zijn echter duur en niet eenvoudig uit te voeren. De laatste jaren is de Diode-Array UV-detectie als bevestigingstechniek sterk in opkomst. Met deze apparatuur is het mogelijk UV-spectra van componenten, terwijl ze de detectorcel passeren, op te nemen. Door de spectra, verkregen uit de monsteroplossingen, te vergelijken met spectra van standaarden, is bevestiging van de identiteit van componenten mogelijk. Bovendien kan tegelijkertijd bij meerdere golflengtes een chromatogram opgenomen worden. Hierdoor is het mogelijk evt. metabolieten (met eenzelfde retentietijd) te achterhalen, die bij een andere golflengte absorptie vertonen.

Van standaardoplossingen van ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol (2.2;18) zijn de UV-spectra opgenomen met de ervoor geschikte eluentia (bijlage 2 en 3). Ook zijn voor de twee eluentia chromatogrammen opgenomen van blanco-eimonsters bij 8 verschillende golflengtes (bijlage 4). Hieruit bleek dat bij de toegepaste methode ook bij lagere golflengtes weinig stoorpieken in het chromatogram verschijnen. De toegepaste monstervoorbewerking is dus zeer effectief.

Ter bepaling van de niveau's, waarop de 4 te bepalen componenten nog bevestigd kunnen worden, werd een reeks in eluens verdunde standaardoplossingen bereid. Afnemend in concentratie werd telkens 100 µl geïnjecteerd, totdat het niet meer mogelijk was een UV-spectrum van de component op te nemen.

Hoewel de spectra vanaf ca. 0,4 µg/ml al minder vloeiend werden, waren de spectra voor de moederverbindingen ronidazol en dimetridazol nog op te nemen bij een concentratie van de standaardoplossing 0,12 µg/ml, terwijl ipronidazol 0,19 µg/ml en de metaboliet 0,25 µg/ml als grenzen kenden. Dit houdt in dat voor ronidazol, dimetridazol, metaboliet en ipronidazol resp. ca. 0,012 µg, 0,012 µg, 0,025 µg en 0,019 µg de detectorcel moet passeren voor opname van een UV-spectrum, dat de component van een andere verbinding kan onderscheiden. Rekening houdend met de recoveries voor de componenten (3.5.2) werden bevestigingsniveau's bereikt voor de genoemde verbindingen van resp. 20, 22, 50 en 34 ppb. Het verdient echter aanbeveling om bij de opwerking van de monsters de verbindingen, na opname van het residu in 2 ml iso-octaan, uit te schudden met 400 µl 1 N HCl en na filtreren over Acrodisc-filter 0,45 µm (geen wateropnemend filter) 250 µl te neutraliseren met 50 µl 2,5 M natriumcarbonaat. Van de aldus verkregen oplossing kan dan 200 µl geïnjecteerd worden, zodat de bevestigingsgrens verlaagd kan worden tot 5-10 ppb.

3.7 EINDVOORSCHRIFT HEEL-EI

3.7.1 Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro-analyse" kwaliteit te zijn of, indien vermeld, van betere kwaliteit.

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

3.7.1.2a 6 N Zoutzuur: bereid deze oplossing door zoutzuur 37% (b.v. Merck art. 317) 1:2 te verdunnen met millipore-water.

3.7.1.2b 1 N zoutzuur: bereid deze oplossing door 6 N HCl met millipore-water te verdunnen.

3.7.1.3 Zure verzadigde natriumchloride-oplossing: Neem 360 g NaCl op in 1000 ml millipore-water. Voeg hieraan toe 5,0 ml 6 N HCl en meng.

3.7.1.4 Extrelut-navulverpakkingen voor Extrelut[®] 20 (Merck art. 11738).

3.7.1.5 Dichloormethaan (b.v. Merck art. 6050).

3.7.1.6 Iso-octaan (b.v. Merck art. 4727).

3.7.1.7 Acrodisc[®] filter 0,45 µm (Gelman Sciences, prod.no. 4184).

3.7.1.8 Natriumcarbonaat watervrij (b.v. Merck art. 6392).

3.7.1.9 2,5 M natriumcarbonaat: los op 26,5 g Na₂CO₃ in 100 ml millipore-water.

3.7.1.10 Kaliumdihydrogeenfosfaat (b.v. Merck art. 4873).

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

3.7.1.12 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat: weeg 34 g KH₂PO₄ af in een 1000 ml maatkolf en los op. Vul aan met millipore-water en meng.

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

3.7.1.14 HPLC-eluens 0,25 M KH₂PO₄-acetonitril 800-200*: meng 800 ml 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat met 200 ml acetonitril.

* Zie Eluens over HPLC-Analyse (3.7.4).

3.7.1.15 Fosforzuur 85% (b.v. Merck art. 573).

3.7.1.16 HPLC-eluens 0,25 M KH_2PO_4 -acetonitril-methanol 900-40-60, pH 4,0*: meng 900 ml 0,25 M KH_2PO_4 met 40 ml acetonitril en 60 ml methanol. Breng met geconcentreerd H_3PO_4 de oplossing op pH 4,0.

3.7.1.17 Stamoplossingen nitro-imidazolen:

Weeg af ca. 50 mg, nauwkeurig gewogen, nitro-imidazol in een 100 ml maatkolf. Los op in methanol en meng. (Opl. A; conc. 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pipetteer 10,0 ml stamoplossing in maatkolf van 100 ml, vul aan met methanol en meng (opl. B; conc. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Breng 10,0 ml opl. B in een 100 ml maatkolf en vul aan met methanol en meng (opl. C; conc. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3.7.1.18 Nitro-imidazol-oplossingen:

Breng 10,0 ml van stamoplossing A in een 100 ml maatkolf, vul aan met HPLC-eluens en meng (opl. D; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Breng 10,0 ml van opl. D in een 100 ml maatkolf, vul aan met HPLC-eluens en meng (opl. E; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Pipetteer 10,0, 20,0 en 40,0 ml van deze oplossing in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Vul deze aan met eluens en meng. Deze oplossingen hebben een concentratie van resp. 0,5, 1,0 en 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (opl. F, G en H).

3.7.2 Apparatuur

3.7.2.1 Ultra Turrax.

3.7.2.2 Waterbad, badtemperatuur 35°C.

3.7.2.3 Vibrofix VFI Electronic.

3.7.2.4 Centrifuge.

3.7.2.5 Stikstofstroom.

* Zie Eluens over HPLC-Analyse (3.7.4).

3.7.2.6 Hogedrukvloeistof-chromatografische apparatuur met UV-detectie.

3.7.2.7 Laboratoriumglaswerk.

3.7.3 Werkwijze

De uitvoering dient zoveel mogelijk te geschieden onder uitsluiting van licht. Meng in een bekersglas van 100 ml met Ultra Turrax het ei tot een homogeen geheel. Weeg ongeveer 10 g ei, nauwkeurig gewogen, af in een erlenmeyer van 100 ml en pipetteer hierbij 10,0 ml zure verzadigde natriumchloride-oplossing. Schud het mengsel goed en pipetteer hiervan 15,0 ml in een bekersglas van 150 ml. Voeg toe, onder voortdurend roeren met roerstaaf, circa 18 g Extrelut-materiaal. Laat het geheel 15 min. staan en breng dan kwantitatief over in een, van onder met 10 mm-ronde filter afgesloten, Extrelut-plastic huls. Plaats, na stevig aankloppen van het ei-Extrelut-mengsel, het inzetstuk met een ronde 24 mm-filter op het kolommateriaal door losjes aan te drukken.

Elueer de kolom met 50 ml dichloormethaan door eerst het bekersglas te spoelen met 2 x 15 en 1 x 20 ml dichloormethaan. Vang het eluaat op in een centrifugebuis met ingeslepen stop (25 ml). Damp in waterbad bij 35°C met stikstof in tot droog.

Neem het residu op in 2 ml iso-octaan. Voeg toe 1,0 ml 1 N HCl en schud gedurende 1 min. door te vortexen (1000-1500 rpm). Centrifugeer vervolgens 5 min. bij 20°C met 1500 rpm en verwerp de iso-octaanfase. Filtreer de onderste waterfase door een 0,45 µm filter (Acrodisc) en breng 500 µl van de gefiltreerde oplossing in een cultuurbuis. Voeg hieraan toe 100 µl 2,5 M natriumcarbonaat en meng.

3.7.4 HPLC-analyse

Injecteer in het isocratische HPLC-systeem met de volgende condities:

Analyse-kolom: Lichrosorb RP18 (3x200), Chrompack art. 28397.

Voorkolom: Bondapak C18 (3,9 x 20 mm) 37-50 µ, Waters art. 27248.

Injectievolumen: 100 µl.

Eluenssnelheid: 0,7 ml/min.

Detectie: UV-313 nm.

Eluens: 0,25 M KH_2PO_4 -acetonitril 800-200 voor de bepaling van ipronidazol en dimetridazol (+ metaboliet),

0,25 M KH_2PO_4 -acetonitril-methanol 900-40-60, pH 4,0 voor de bepaling van ronidazol (+ metaboliet).

Bereken het gehalte aan nitro-imidazol-residuen in het eimonster door de piek van standaard en monster te vergelijken en uit te drukken in $\mu\text{g}/\text{kg}$ aan nitro-imidazol-residuen in het monster of aantal μg per ei.

3.7.5 Opmerkingen

Alvorens het eluens op het HPLC-systeem te zetten dient het systeem vooraf minimaal 0,5 uur gespoeld te worden met water (0,7-1,0 ml/min) om neerslagvorming te voorkomen. Recovery-experimenten zijn uit te voeren door stamoplossingen in methanol af te dampen met stikstof en hieraan ei toe te voegen, mits voldoende tijd genomen wordt voor het oplossen van de nitro-imidazolen in de eimonsters. Als alternatief voor de Lichrosorb RP18 (3x200) kan een CP Spher C18 (3x200)-kolom gebruikt worden.

Vanwege de lineariteit van de recovery mag de uiteindelijk uitgeschudde waterfase maximaal 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ronidazol en metaboliet en maximaal 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dimetridazol en ipronidazol bevatten.

4. OPWERKING EIWIT/EIGEEL

Eigeelmonsters bleken erg goed op te werken volgens de methode voor heel-ei. Slechts één wijziging hoefde te worden aangebracht: vanwege een groter olie-achtig residu bij eigeel-monsters diende dit residu in 10 ml i.p.v. 2 ml iso-octaan opgenomen te worden. Wellicht tengevolge van een ongunstiger verdeling (10:1 i.p.v. 2:1) werden iets lagere recoveries bereikt voor de metaboliet (2.2;18), ronidazol, dime-tridazol en ipronidazol: resp. 70, 95, 85 en 80%.

Overigens bedroeg de pH van een eigeel-zure verzadigde natriumchloride-oplossing-mengsel 5-5,5.

Opwerking van eiwit-monsters leverde iets meer problemen op. Het spijken van eiwit geschiedde niet-reproduceerbaar. Het bleek dat voornamelijk dimetridazol en ipronidazol slecht in eiwit oplosten. Derhalve is het aan te bevelen de eiwit-monsters te spijken door de te bepalen componenten toe te voegen in met zure verzadigde natriumchloride-oplossing (3.7.1.3) doorverdunde standaarden. De pH voor een eiwit-zure verzadigde natriumchloride-oplossing-mengsel bedroeg 6-6,5. Bij heftig schudden van dit mengsel trad dermate veel schuimvorming op, dat extractie met Extrelut niet meer mogelijk was. Dit dient derhalve vermeden te worden. En, mengen van het verdunde eiwit-monster met Extrelut geschiedde iets minder homogeen, dan bij heel-ei-monsters. Als gevolg hiervan werden ook voor eiwit-monsters iets lagere recoveries gevonden. De recoveries voor de metaboliet (2.2;18), ronidazol, dime-tridazol en ipronidazol werden bepaald op resp. 70, 95, 80 en 70%. Geconcludeerd wordt dat eiwit- en eigeel-monsters goed te bepalen zijn volgens het voorschrift voor heel-ei, hoewel kleine schommelingen (10%) in de recovery-percentages waargenomen zijn.

5. PLASMA-OPWERKING

5.1 METHODE-ONTWIKKELING

Als leidraad werd intern analysevoorschrift nr. A 404 (Aerts, Beek 1985) genomen. Hierbij wordt 0,5 ml monstermateriaal verdund met 3,0 ml water. Vervolgens wordt 3,0 ml van het mengsel op een Extrelut[®] 3-kolom (Merck, art. 15372) gebracht. Na 15 min wordt de kolom geëluëerd met 15 ml dichloormethaan via een naald. Voor de 4 te bepalen componenten werd dit nagewerkt, waarbij gespiked werd op 1 en 10 µg/ml niveau. Het residu werd als beschreven bij eindvoorschrift heel-ei (3.7.3) opgezuiverd, omdat het plasma, wat van de leggen vetter leek dan van bv. het varken, een klein olie-achtig residu achterliet. Aanvankelijk werden hierbij recoveries bereikt voor de metaboliet (2.2;18), ronidazol, dimetridazol en ipronidazol van resp. 80, 90, 45 en 45%. Ook hier vormde de oplosbaarheid van dimetridazol en ipronidazol bij het spiken een probleem. Indien de componenten in waterige oplossingen werden toegevoegd werden voor dimetridazol en ipronidazol 80 resp. 70% recoveries verkregen.

Zeer opmerkelijk bij deze plasma-monsterbepaling was het volgende. Lage recoveries werden verkregen voor vnl. dimetridazol en ipronidazol uit 0,5 ml plasma, verdund met 3,0 ml gespikete wateroplossing, indien ze na mengen direct op een Extrelut-kolom werden gebracht. Indien na toevoegen van 3,0 ml gespikete wateroplossing ca. 15 min. gewacht werd alvorens de monsters opgewerkt werden, werden hogere recoveries bereikt. Hiervoor is geen verklaring voorhanden (evenwichtsinstelling?).

Omdat plasma, verdund met 3,0 ml water, een pH heeft van ca. 7, werd getracht de recovery te verhogen door de pH te verlagen (bij ei bleek de recovery van nitro-imidazolen verhoogd te worden bij pH 5,5-6,5) (zoutzuur toegevoegd). Echter bij verlagen van de pH tot 5,5 vormde zich een neerslag, zodat de oplossing zich niet meer over het Extrelut-kolommetje verdeelde. Ook toevoegen van een verzadigde natriumchloride-oplossing deed precipitatie van eiwitten ontstaan. Verhogen van de recovery werd bewerkstelligd door van het met water verdunde plasmamonster 2,5 i.p.v. 3,0 ml op de Extrelut-kolom te brengen. Voor de metaboliet (2.2;18) en ronidazol werd 100% en voor dimetridazol en ipronidazol 80% recovery bereikt.

Hier wordt dus hetzelfde matrix-effect op extractie van de Extrelut-kolom waargenomen als bij de ei-analyse (Verminderen hoeveelheid matrix op Extrelut-materiaal leidt tot verhoging recovery) (3.5.2). Met deze methode bleek gehalte-bepaling van de 4 componenten mogelijk tot een niveau van 0,1 µg/ml. Voor blanco plasma-monsters werden chromatogrammen zonder stoornissen verkregen (bijlage 5: blanco plasma-monsters) voor HPLC-eluens 0,25 M KH₂PO₄-ACN 800-200 (v/v) (3.7.1.16). Voor eluens 0,25 M KH₂PO₄-ACN-MeOH 900-40-60 (v/v/v) pH 4,0 (3.7.1.17) werden vergelijkbare chromatogrammen verkregen.

5.2 WERKWIJZE PLASMA

De volgende werkwijze blijkt te voldoen voor bepalingen van plasma-monsters.

Pipetteer 0,5 ml plasma in een cultuurbuis. Voeg hieraan toe 3,0 ml water en meng op een vortex-menger. Pipetteer na 15 min. 2,5 ml op een Extrelut-kolom en laat 15 min in het pakkingsmateriaal trekken. Elueer met 15 ml dichloormethaan via een naald in een 25 ml buis met ingeslepen stop.

Damp de dichloormethaanfase onder een stikstofstroom geheel in bij 35°C. Pas vervolgens de zuiveringsstap toe als beschreven onder eindvoorschrift heel-ei, werkwijze (3.7.3) en analyseer de monsters volgens HPLC-analyse (3.7.4).

Indien deglucuronidering en de desulfatering toegepast dient te worden, wordt het volgende aan de bepalingmethode toegevoegd.

Bereid:

5.2.1 1 M fosfaatbuffer pH 5,0 : los 174 g dikaliumhydrogeenfosfaat (b.v. Merck art. 5104) op in 500 ml water en stel de pH in op 5,0 met 6N zoutzuur. Vul hierna aan tot 1 liter en meng.

5.2.2 Glucuronidase-oplossing (+ 40 mg/ml): los 10 mg sulfatase/glucuronidase (Sigma S-3009) op in 250 µl 1 M fosfaatbuffer pH 5,0. Breng 500 µl plasma in een buis van 25 ml. Voeg hieraan toe 500 µl 1 M fosfaatbuffer pH 5,0 en 10 µl glucuronidase-oplossing en meng het geheel. Sluit de buis af en zet ze 3 uur in een stoof bij 37°C. Vervolg nu, rekening houdende met de verdunning, bovenvermelde werkwijze voor plasma-monsters.

6. FAECES-OPWERKING

6.1 METHODE-ONTWIKKELING

Voor de analyse van faeces-monsters met Extrelut-extractie bleek ook voor faeces verdunning noodzakelijk. Aanvankelijk werd 10 g mest verdund met 15 ml zure verzadigde natriumchloride-oplossing (3.7.1.3) en 20 ml water. Dit leverde een pH voor het mengsel van 6,5-7. Na 30 min schudden werd het mengsel gefiltreerd over een S en S filter (\emptyset 110 mm, Art. nr. 589²). Van het filtraat werd 15,0 ml op een Extrelut-kolom (3.3.1.1) gebracht. Na 15 min. werd de kolom geëluëerd met 50 ml dichloormethaan, waarna de onder werkwijze en HPLC-analyse eindvoorschrift heel-ei (3.7.3 en 3.7.4) opwerking vervolgd werd. Bepalen van de recovery bleek ook bij de faeces-monsters het meest reproduceerbaar uit te voeren, indien de te bepalen componenten via met water verdunde standaardoplossingen werden toegevoegd.

Recoveries werden bepaald voor 1, 10 en 50 mg/kg. Voor 1 ppm bedroegen deze voor de metaboliët (2.2;18), ronidazol, dimetridazol en ipronidazol resp. 45, 75, 50 en 40%. Voor 10 en 50 ppm waren deze recoveries veel lager. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de lineariteit voor opname van de componenten in 1 N zoutzuur (lineariteit recovery, 3.5.2. en bijlage 1). Derhalve werden de 10 en 50 ppm-monsters niet met 1 ml 1 N zoutzuur, maar met grotere volumina uit de iso-octaanfase geëxtraheerd. Dit leverde eveneens bovengenoemde recoveries. Echter, wellicht tengevolge van schommelingen in de pH van de faeces bleken de recoveries niet geheel reproduceerbaar. Getracht werd recovery-verhoging te bewerkstelligen door verandering aan te brengen in de faeces-verdunningen, door meer of minder zure verzadigde natriumchloride-oplossing (3.7.1.3) toe te voegen, alvorens met Extrelut geëxtraheerd werd. Dit had echter niet het gewenste effect. Ook vergroten van het volume elutiemiddel (dichloormethaan) kon niet zorgen voor recovery-verhoging. Omdat ook bij deglucuronidering/desulfatering gebruik werd gemaakt van een 1 M fosfaat buffer pH 5,0 (5.2) werd hier 10 g mest verdund met 10 ml fosfaatbuffer pH 5,0 en 40 ml water. Na 30 min. schudden werd opgewerkt als voorheen beschreven. Hierbij werden iets lagere recoveries - voor de metaboliët (2.2;18), ronidazol, dimetridazol en ipronidazol resp. 40, 65, 40 en 40% - verkregen, die echter reproduceerbaarder bleken.

Hoewel de chromatogrammen voor blanco-mest-monsters geen fraaie plaatjes leverden voor het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril 800-200 (v/v) waren de pieken, afkomstig van faeces-componenten, geen stoornissen voor bepalingen vanaf niveau 1 mg/kg (bijlage 5, blanco faeces-monsters). De reproduceerbaarheid van deze pieken van de mest-componenten was gering (zie ook mest-monsterbepalingen van de nitroimidazol-monsters (7.3.3). Analooq aan de eimonster-bepalingen kwamen de pieken, afkomstig van blanco-mest-monsters bij het eluens 0,25 M kaliumdihydrogeenfosfaat-acetonitril-methanol 900-40-60 (v/v/v), pH 4,0, dermate laat van de kolom dat deze de analyse niet verstoorden. Gehaltebepaling is op deze wijze mogelijk vanaf 1 mg/kg.

6.2 WERKWIJZE FAECES

Als werkwijze voor de gehaltebepaling in faeces wordt de volgende opwerking toegepast.

Breng in een schuderlenmeyer van 200 ml 10,0 g faeces. Voeg hieraan toe 10,0 ml 1 M fosfaatbuffer pH 5,0 (5.2.1) en 40,0 ml water. Sluit de erlenmeyer af en schud 30 min. Filtreer hierna over een S en S filter (ϕ 110 mm, Art. nr. 589²). Breng 15,0 ml van het filtraat op een Extrelut-kolom (3.2.1.1) en laat 15 min. in het pakkingsmateriaal trekken. Elueer met 50 ml dichloormethaan in een 25 ml buis met ingeslepen stop. Verdamp de dichloormethaan-fase onder een stikstofstroom tot droog bij 35°C. Pas vervolgens de zuiveringsstap toe als beschreven onder eindvoorschrift heel-ei, werkwijze (3.7.3) en analyseer de monsters volgens HPLC-analyse (3.7.4).

Houd hierbij rekening met de lineariteit voor de recovery (3.5.2. en bijlage 1). Indien deglucuronidering/desulfatering toegepast dient te worden, wordt het volgende aan de bepalingmethode toegevoegd.

Breng 10 g faeces in een schuderlenmeyer van 200 ml. Voeg hieraan toe 10,0 ml 1 M fosfaatbuffer pH 5,0 (5.2.1) en 200 μ l glucuronidase-oplossing (5.2.2) en meng het geheel. Sluit de erlenmeyer af en zet ze 3 uur in een stoof bij 37°C. Vervolg nu, te beginnen met toevoegen van 40,0 ml water, bovenstaande werkwijze voor faeces-monsters.

Bij hoge concentraties nitro-imidazolen in de faeces-monsters is het aan te bevelen i.p.v. 200 μ l 400 μ l glucuronidase-oplossing (5.2.2) toe te voegen (dit is in enkele gevallen toegepast bij de dierproeven (7.3.3).

7. DIEREXPERIMENTEEL ONDERZOEK

7.1 OPZET

De ontwikkelde analysemethode voor de bepaling van nitro-imidazolen in kippe-eieren werd gebruikt om de kinetiek en metabolisme van dimetridazol, ronidazol en ipronidazol bij leghennen vast te stellen. Hiertoe werd het gehalteverloop van de 3 verbindingen in eieren, plasma en faeces bepaald. Tevens werd de mogelijkheid van conjugatie als glucuronide of sulfaat bekeken.

Voor dit experiment werden 15 leghennen gebruikt op "Het Spelderholt". Deze dieren werden op 08-08-1986 in individuele genummerde kooien geplaatst. Bij 5 van deze dieren werd op 11-08-1986 een canule in de vleugelslagader gebracht, waarlangs bloed kon worden opgenomen. Deze canules werden met heparine gevuld en doorgespoten om bloedstolling in en juist buiten de canule te voorkomen.

Op 14-08-1986 werd om 08.15 aan de gecanuleerde dieren capsules met de nitro-imidazolen toegediend. Hierbij kregen 2 dieren elk 75 mg dimetridazol, 1 dier 75 mg ronidazol en 1 dier 75 mg ipronidazol toegediend, terwijl 1 dier als blanco diende. Van deze dieren werd vervolgens na 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 en 24 hr. ca. 1,5 ml bloed genomen in met EDTA-gecoate buisjes. Hiervan werd direct plasma gewonnen door centrifugeren en afpipetteren van het plasma. Hierna werd het plasma onmiddellijk ingevroren. De mest werd verzameld op 15-08-1986 's morgens en 15, 16, 17, 18 en 19-08-1986 's middags. Deze mest werd ook direct ingevroren. Per dier werden de eieren verzameld van 13-08 t/m 28-08-1986, welke bij 4°C bewaard werden. Aan de niet-gecanuleerde leghennen werd eveneens op 14-08-1986 's morgens één van de nitro-imidazolen toegediend. Hierbij kregen 3 kippen elk 75 mg dimetridazol, 4 kippen elk 75 mg ipronidazol, 2 kippen elk 75 mg ronidazol en 1 kip 150 mg ronidazol. Van deze dieren werden eveneens de eieren verzameld van 13-08 t/m 28-08-1986.

Uit de bij analyse verkregen resultaten diende geconcludeerd te worden of de opzet van de proef - gedurende 24 uur plasma inwinnen, 5 dagen mest verzamelen en 14 dagen eieren verzamelen - voldeed bij vaststellen van de kinetiek na eenmalige toediening van de 3 nitro-imidazolen.

7.2 ANALYSE

Van de leghennen staan in tabel 9 (bijlage 6) de bij leghennen toegediende nitro-imidazolen en de verzamelde monsters plasma, mest en eieren weergegeven.

Bij alle analyses werd, naast de moederverbinding, de (gemeenschappelijke) metaboliet (2.2;18) van ronidazol en dimetridazol meebepaald. De bij de gecanuleerde leghennen verkregen plasma- en mestmonsters werden individueel geanalyseerd volgens bij werkwijze plasma (5.2) resp. faeces (6.2) beschreven analyses. Tevens werden enkele plasma- en faecesmonsters met sulfatase/glucuronidase (Sigma S-3009) behandeld vóór de gehaltebepaling. De eieren werden geanalyseerd, tot en met de datum waarop geen residuen ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$) meer werden aangetoond. Door vergelijken van UV-spectra van de componenten uit de monsters met die van standaardoplossingen werd de identiteit van de componenten bevestigd. Tevens werden voor plasma- en eimonsters bij golflengten 254, 280 en 365 nm, naast 313 nm, chromatogrammen opgenomen voor het achterhalen van eventueel gevormde metabolieten.

Van een 4-tal eieren werden dooier en eiwit apart geanalyseerd, waarvoor zoveel mogelijk de eieren van de gecanuleerde leghennen werden genomen. Zo werden de eieren van kip 13 en 15 gescheiden in dooier en eiwit ter bepaling van dimetridazol. Omdat kip 18 en 20 op enkele belangrijke dagen geen ei hadden gelegd (bijlage 6) werd voor analyse van eiwit/eigeel voor ipronidazol kip 23 en voor ronidazol kip 26 genomen. Van de overige eieren van niet-gecanuleerde dieren werden voor elke toegediende moederverbinding mengmonsters (per dag) gemaakt (zie voor de hierna volgende nummering tabel 9, bijlage 6). Voor dimetridazol werden de eieren van kip 11 niet meebepaald. Van dag 13-08 t/m 19-08 werden mengmonsters bereid van eieren van kip 12 en 21, terwijl voor dag 20-08 t/m 22-08 eieren van kip 21 geanalyseerd werden. Mengmonsters voor de analyse van ipronidazol werden gemaakt door voor dag 13-08 eieren van kip 24 en 25 en voor dag 14-08 t/m 22-08 eieren van kip 22, 24 en 25 te mengen. Voor ronidazol werden de eieren van kip 27 en kip 28 (dubbele dosis) afzonderlijk geanalyseerd.

7.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

7.3.1 Plasma-analyse

Enkele van de bij de analyse verkregen chromatogrammen staan weergegeven op bijlage 7 (chromatogram 5-8). Gebleken is dat voorbehandelen van blanco plasma-monsters met glucuronidase/sulfatase-oplossing (5.2.2) geen extra stoorpieken op het chromatogram opleverde. Een met bijlage 5 (blanco plasma-monster) vergelijkbaar chromatogram werd verkregen.

De resultaten van de analyses van de plasma-monsters staan weergegeven in tabel 10 (bijlage 8). De gehalten, bepaald zonder glucuronidase/sulfatase-behandeling en gecorrigeerd voor de recoveries (5.1) staan grafisch weergegeven in figuur 2, 3, 4 en 5 (bijlage 9).

In het plasma van leghennen 13 en 15 werd naast dimetridazol ook de metaboliet (2.2;18) bepaald. Uit fig. 2 en 3 blijkt dat dimetridazol snel gemetaboliseerd is. Spreiding in de plasma-gehalten dimetridazol tussen kip 13 en 15 werd waargenomen: dimetridazol kende bij kip 15 een halfwaardetijd ($t_{0,5}$)=1,5 uur, terwijl $t_{0,5}$ bij kip 13 3,75 uur was. De metaboliet (2.2;18) kende bij kip 15 een $t_{0,5}$ =3,25 uur terwijl kip 13 $t_{0,5}$ =2,75 uur weergaf. Geen aanwijzingen voor eventuele aanwezigheid van de metaboliet 1-methyl-5-nitro-imidazol-2-carboxylzuur (2.2;23) zijn gevonden. Uit de gehaltebepaling met deglucuronidering/desulfatering wordt geconcludeerd dat dimetridazol (!) gesulfateerd of geglucuronideerd in het plasma aanwezig was (> 50%), terwijl de metaboliet (2.2;18) niet geconjugeerd teruggevonden werd. Dit is in tegenspraak met de in de literatuur bekende metabolieten van dimetridazol (2.2). Uit fig. 4 blijkt dat kip 18 een $t_{0,5}$ vertoonde voor ipronidazol van 0,5 uur. Ipronidazol werd snel gemetaboliseerd tot een metaboliet, aangeduid met R_t =6 min ($t_{0,5}$ = 1,25 uur), terwijl later een nog polairdere metaboliet, aangeduid met R_t =3,5 min ($t_{0,5}$ =3 uur) gevormd werd. Het is mogelijk dat het hierbij de twee in de literatuur (2.2) genoemde metabolieten betreft. De gehalten zijn hierbij uitgedrukt in ipronidazol-equivalenten aangezien geen extinctiecoëfficiënten van de metabolieten bekend zijn. Waarschijnlijk werden geen sulfaten en/of glucuronides gevormd van de 3 genoemde verbindingen (tabel 10, bijlage 8), hoewel voor ipronidazol bij één van

de bepalingen met glucuronidase/sulfatase-oplossing (5.2.2) een aanmerkelijk hoger gehalte werd verkregen dan zonder deglucuronidering/desulfatering (dag 14/8;14.15).

Overigens werd in het chromatogram van ipronidazol-plasma-monster (14/8;10.15) een extra component aangetroffen (bijlage 7, chromatogram 7, *). Deze component kon niet nader geïdentificeerd worden. Voor ronidazol wordt geconcludeerd dat de moederverbinding in mindere mate dan dimetridazol werd gemetaboliseerd. Ronidazol vertoonde een $t_{0,5}$ =8,75 uur terwijl de metaboliet (2.2;18) $t_{0,5}$ =9,75 uur liet zien. Uit de in tabel 10 (bijlage 8) weergegeven gehalten volgt dat zowel ronidazol als ook de metaboliet (2.2;18) niet gesulfateerd of geglucuronideerd in het plasma voorkwamen.

Voor geen van de plasmamonsters, bevattende dimetridazol, ronidazol of ipronidazol, werden bij opname van chromatogrammen bij 254, 280 en 365 nm extra metabolieten geconstateerd.

7.3.2 Ei-analyse

De resultaten van de analyses van de heel-ei-(meng) monsters zijn gegeven in tabel 11 (bijlage 10). Een grafisch overzicht hiervan wordt gegeven door fig. 6-9 (bijlage 11). Dimetridazol kende een $t_{0,5}$ van 1 dag, terwijl de $t_{0,5}$ voor metaboliet (2.2;18) 0,75 dag bedroeg. De $t_{0,5}$ voor ronidazol (75 mg) was 1,25 dag en voor metaboliet (2.2;18) was de $t_{0,5}$ 1 dag. De moederverbinding ronidazol was vanaf de dag van toediening tot 8 dagen na medicatie in een concentratie $> 0,01$ mg/kg aantoonbaar (fig. 7). Toedienen van een dubbele dosis ronidazol kende eenzelfde verloop van gehalte voor metaboliet en ronidazol, waarbij iets langer residuen aanwezig waren (fig. 8). De $t_{0,5}$ voor ronidazol was hierbij 1,25 dag en voor metaboliet (2.2;18) ook 1,25 dag. Vergelijken van de 2 dosissen (75 en 150 mg) ronidazol leidt tot de conclusie dat in de toekomst zinvol is om lagere concentraties op "gelijke" wijze te analyseren. Hierbij kan gedacht worden aan een "carry-over"-concentratie (7,5 mg/kg) in voeders. Daar leghennen per dag ca. 100 g voer nuttigen, wordt, vergeleken met de eenmalige toediening van 75-150 mg, een 100-200 x zo kleine hoeveelheid opgenomen. De dan in de eieren te verwachten opgenomen hoeveelheid ronidazol (nitro-imidazol) zal dan hoog genoeg zijn ($> 0,01$ mg/kg) met deze methode te analyseren.

Ipronidazol kende voor de moederverbinding en de metaboliet ($R_t=6'$) een $t_{0,5}$ van 1,5 dag resp. 1 dag. Op de dag van toediening werd al ipronidazol en metaboliet ($R_t=6'$) in ei waargenomen. Na ca. 7 dagen waren de gehalten van ipronidazol en metaboliet ($R_t=6'$) gedaald tot 0,01 mg/kg ei. Het gehalte van de metaboliet ($R_t=3,5'$) was in het ei sneller gedaald dan overeenkomstig de plasma-gehalten verwacht zou worden. Hieruit wordt geconcludeerd dat de metaboliet waarschijnlijk niet erg stabiel is. Deze metaboliet ($R_t=3,5'$) kende een $t_{0,5}$ van 0,5 dag.

In bijlage 12 staan enkele bij de analyses verkregen chromatogrammen weergegeven (chrom. 9-11).

In het chromatogram, behorend bij de analyse van dimetridazol, werden naast de bij plasma aangetroffen componenten (7.3.1) 2 extra pieken waargenomen (chrom. 9, *). Deze pieken konden hier niet nader geïdentificeerd worden. Het chromatogram van ipronidazol vertoonde, vergeleken met de bij plasma verkregen resultaten, drie extra componenten (chrom. 10, *). Ook de identiteit van deze componenten is bij de ei-analyses niet achterhaald. Door te vergelijken met blanco-eimonsters is gebleken dat deze extra pieken bij analyse van dimetridazol en ipronidazol niet van de eimatrix afkomstig waren. Overigens werden voor ronidazol, in vergelijking met de bij plasma-analyse gevonden componenten (chrom. 11), geen extra componenten waargenomen. Bij opname van chromatogrammen bij 254, 280 en 365 nm waren geen extra metabolieten gevonden.

Van de analyses van dooier en eiwit staan de resultaten in tabel 12 (bijlage 13). Ook deze waarden staan grafisch uitgezet (bijlage 14; fig. 10-13). Uit deze figuren blijkt, dat er voor geen van de bepaalde nitro-imidazolen duidelijk verschil bestond in gehalte in eigeel en eiwit. Reeds vanaf de eieren, gelegd binnen 24 uur na toediening van de nitro-imidazolen werden in eigeel en eiwit vergelijkbare gehalten waargenomen. Waarschijnlijk vindt, in tegenspraak met het in literatuur beschreven eivormingsmodel (2.4), onmiddellijke opname van de componenten plaats in het eiwit. Vanuit het eiwit treedt vervolgens mogelijk diffusie op van de nitro-imidazolen naar het eigeel, leidend tot gelijke gehalten.

7.3.3 Faeces-analyse

Voorbehandelen van blanco-faeces-monsters met sulfatase/glucuronidase bleek geen extra stoorpieken op het chromatogram op te leveren.

Van de faeces-analyses staan de resultaten vermeld in tabel 13 (bijlage 15). Voor dimetridazol werden alleen de reeds bij plasma genoemde (7.3.1) verbindingen in de faeces aangetoond, waarvan UV-spectra, met bijbehorend chromatogram staan weergegeven op bijlage 16.

Ronidazol daarentegen liet op het chromatogram een extra component ($R_t=11'$) zien. Het UV-spectrum van deze component ($R_t=11'$), met bijbehorend chromatogram, wordt, in vergelijking met die van de moederverbinding ronidazol en de metaboliet (2.2;18), getoond in bijlage 17. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de mestmonsters, bevattende ronidazol, werden geanalyseerd bij 10 mAU, terwijl de overige mestmonsters werden bepaald bij 100 mAU.

De component ($R_t=11'$) heeft een met ronidazol vergelijkbaar UV-spectrum en werd niet in blanco-faeces-monsters aangetroffen.

Bij de ipronidazol-bepalingen blijkt dat enkele metabolieten verhoudingsgewijs meer dan in plasma en/of ei waargenomen, werden aangetroffen. Naast ipronidazol kwamen in de faeces voor metaboliet ($R_t=6'$) en een metaboliet ($R_t=13'$). Deze laatste metaboliet werd wellicht ook reeds aangetroffen in eimonsters (chrom. 10; * bijlage 12). De UV-spectra, met bijbehorende chromatogrammen, van deze 3 verbindingen staan in bijlage 18. De in het plasma (tabel 10; bijlage 8) en ei (tabel 11; bijlage 10) ook al in kleine hoeveelheid aangetroffen metaboliet ($R_t=3,5'$) werd in verhouding tot ipronidazol en metaboliet $R_t=6'$, in de faeces in zeer kleine hoeveelheden aangetroffen (tabel 13, bijlage 15). Van deze component ($R_t=3,5'$) bleek geen opname van het UV-spectrum mogelijk.

De in tabel 13 (bijlage 15) genoemde resultaten zijn ook omgerekend naar de totaal uitgescheiden hoeveelheden in de faeces m.b.v. de in tabel 9 (bijlage 6) vermelde gegeven faeces-hoeveelheden en zijn grafisch weergegeven in figuur 14-17 (bijlage 19).

Het bleek verder dat enkele componenten geglucuronideerd of gesulfateerd kunnen worden. De weergegeven resultaten voor deglucuronidering /desulfatering werden verkregen door een op de 'werkwijze faeces' (6.2) afwijkende bepaling toe te passen.

Aanvankelijk werd de in 6.2 beschreven bepalingmethode gevolgd. Hierbij werden echter nauwelijks glucuronides/sulfaten aangetoond. Door de hoeveelheid toegevoegde glucuronidase/sulfatase-oplossing te verdubbelen, werden de in tabel 13 (bijlage 15) genoemde resultaten verkregen. Hieruit volgt dat ronidazol niet, ipronidazol voor ca. 15% en dimetridazol en de metaboliet (2.2;18) beide voor ca. 50% als glucuronide of sulfaat in de faeces voorkwamen. In de literatuur (2.2) is wel de mogelijkheid van glucuronide- en sulfaatvorming genoemd voor de metaboliet (2.2;18), evenals sulfaatvorming voor dimetridazol. De metaboliëten van ipronidazol werden echter niet geglucuronideerd of gesulfateerd aangetroffen, behalve de metaboliet $R_t=6$ min, die voor ca. 30% geglucuronideerd/gesulfateerd voorkwam.

Rekening houdende met de glucuronides/sulfaten worden de fig. 18-21 (bijlage 20) verkregen door de gehalten zonder glucuronidase/sulfatase om te rekenen met bovenvermelde glucuroniderings/sulfateringspercentages.

Hieruit blijkt dat voor ronidazol en dimetridazol de toegediende hoeveelheden niet voor 100% teruggevonden werden (fig. 18-20) (De totale nitro-imidazol-uitscheiding in eieren is bij elke toegediende nitro-imidazol-verbinding kleiner dan 1%). Dit kan verklaard worden uit het feit dat de metaboliet (2.2;18) verder omgezet kan worden tot componenten (2.2, schema 4), die met de gebruikte analysemethode niet te achterhalen zijn. Echter, ook is de mogelijkheid aanwezig dat, ondanks het verdubbelen van de hoeveelheid glucuronidase/sulfatase-oplossing bij de 'werkwijze faeces' (6.2), niet onder optimale omstandigheden voor het deglucuroniderings/desulfateringsproces is gewerkt. Wellicht was de hoeveelheid glucuronidase/sulfataseoplossing ook nu nog niet voldoende. Ook kan het mogelijk zijn dat voor de nitro-imidazolen een langere incubatietijd met glucuronidase/sulfatase of een hogere incubatie-temperatuur vereist is ter completering van het deglucuroniderings-/desulfateringsproces. Inzake deze veronderstellingen zijn geen nadere experimenten meer uitgevoerd, vanwege het feit dat geen monster meer voorhanden was. Voor ipronidazol kan slechts geconcludeerd worden dat de moederverbinding vrijwel geheel is gemetaboliseerd. De in tabel 13 (bijlage 15) staande gehalten voor de metaboliëten van ipronidazol zijn berekend door te vergelijken met ipronidazol-standaardoplossingen.

Hoewel dit strikt genomen niet geoorloofd is (Mw, Absorptie. etc, verschillen voor metaboliet en moederverbinding) kan een ruwe schatting gemaakt worden over de hoeveelheden - in verhouding tot ipronidazol - uitgescheiden metabolieten (fig. 17 en 21, bijlage 19 resp. 20). In de literatuur (2.2) wordt als metaboliet van ipronidazol o.a. genoemd 1-methyl-5-nitro-imidazol-2-isopropanol. Omdat verwacht werd dat dit de hoofdm metaboliet is werd metaboliet Rt=6 min uitgevangen. Met behulp van LC-MS werd bepaald dat van deze metaboliet het molecuulgewicht 185,2 g bedroeg, zodat inderdaad 1-methyl-5-nitro-imidazol-2-isopropanol als metaboliet van ipronidazol zeer goed mogelijk is (bijlage 21).

Tijdens het uitvangen van deze component bleek tevens dat een component in de mest is gevormd, welke bij eerdere bepalingen van hetzelfde monster niet werden aangetroffen. Deze metaboliet is mogelijk al geconstateerd bij de plasma-monsters (bijlage 7, chrom. 7) en ei-monsters (bijlage 12, chrom. 10). Een UV-spectrum hiervan staat opgenomen in bijlage 18 met Rt=4,0'. Hieruit kan, in vergelijking met eerder verkregen UV-spectra (bijlage 18) geconcludeerd worden dat van ipronidazol of verwante componenten de nitro-groep waarschijnlijk is afgesplitst.

8. CONCLUSIES

Als bepalingmethode voor ronidazol, dimetridazol, ipronidazol en de metaboliet (2.2;18) (1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol) in kippe-eieren blijkt extractie met verzadigde natriumchloride-oplossing, gevolgd door zuivering met Extrelut-kolommen, mogelijk te zijn. Omdat het Extrelut-materiaal niet in staat is alle storende componenten te verwijderen, wordt de 'solidphase-extractie' gevolgd door een eenvoudige uitschudstap. Het blijkt niet mogelijk de gehaltebepaling van de 4 genoemde nitro-imidazolen m.b.v. één HPLC-systeem uit te voeren, aangezien metaboliet (2.2;18) en ronidazol slechts gescheiden worden bij die eluentia, die zeer lange retentietijden geven voor ipronidazol: dus moeten 2 verschillende eluentia worden toegepast.

Recoveries van 80, 100, 90 en 90% voor resp. metaboliet 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol, ronidazol, dimetridazol en ipronidazol worden verkregen voor heel-ei-monsters.

De beschreven methode maakt screening mogelijk vanaf 10 µg/kg ei, terwijl bevestiging van de identiteit mogelijk is vanaf een niveau van 20-50 µg/kg ei. Door een kleine wijziging van de bepalingmethode is het mogelijk bevestigingsniveaus te bereiken van 5-10 µg/kg ei.

Bij analyses van eiwit/eigeel, plasma en faeces worden de volgende recoveries verkregen voor resp. de metaboliet (1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol), ronidazol, dimetridazol en ipronidazol:

eiwit : 70, 95, 80 en 70%, toepasbaar voor > 10 µg/kg eiwit,
eigeel: 70, 95, 85 en 80%, toepasbaar voor > 10 µg/kg eiwit,
plasma: 100, 100, 80 en 80%, toepasbaar voor > 0,1 µg/ml plasma,
faeces: 40, 65, 40 en 40%, toepasbaar voor > 1 mg/kg faeces.

De ontwikkelde bepalingmethoden voor heel-ei, eiwit/eigeel-, plasma- en faecesmonsters werden in een dierproef getest en bleken te voldoen. Voor de lineariteit van de recovery is het noodzakelijk te zorgen voor een concentratie 0-5 µg/ml voor dimetridazol en ipronidazol en 0-10 µg/ml voor ronidazol en de metaboliet (2.2;18) voor uiteindelijk te injecteren oplossingen.

Het uitgevoerde praktijkexperiment met dimetridazol, ronidazol en ipronidazol leverde de volgende conclusies:

Dimetridazol wordt door de leghen snel omgezet tot 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol. Met ronidazol gebeurt dit in veel mindere mate.

Ipronidazol metaboliseert tot 1-methyl-5-nitro-imidazol-2-isopropanol en een niet nader geïdentificeerde (polaire) metaboliet. Hiernaast worden bij ei- en mestmonsters, bevattende dimetridazol en ipronidazol, kleine concentraties andere metabolieten aangetroffen, welke niet nader zijn geïdentificeerd.

Na eenmalige toediening van 75 mg nitro-imidazol, zijn dimetridazol- en ipronidazolresiduen in eieren vanaf de toediening van betreffende verbinding tot 6 dagen na de medicatie in eieren aantoonbaar (> 10 µg/kg ei). Ronidazol is vanaf de 1e dag tot 8 dagen na de medicatie in eieren aantoonbaar. Het blijkt dat voor dimetridazol en ronidazol 24 uur bloed afnemen niet voldoende lang is om het gehele concentratieverloop van de componenten in het plasma te volgen. 14 Dagen eieren en 5 dagen mest verzamelen blijkt voor alle 3 componenten wel voldoende. Tussen concentraties in eiwit en eigeel wordt voor geen van de 3 toegediende nitro-imidazolen opmerkelijke verschillen waargenomen, wat wellicht verklaard kan worden door uitwisseling/evenwichtsinstelling van de nitro-imidazolen tussen eiwit en eigeel. Bij de analyse van plasma-monsters wordt alleen dimetridazol gegluconideerd of gesulfateerd (50%) aangetroffen. In de faeces worden ook nog glucuronides/sulfaten van metaboliet 1-methyl-2-hydroxymethyl-5-nitro-imidazol (50%), ipronidazol (15%) en de ipronidazol metaboliet Rt=6 min (30%) aangetroffen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat het degluconiderings-/desulfateringsproces tijdens de analyse wellicht niet optimaal is geweest. Via de mest wordt slechts 60-70% van de toegediende dimetridazol en ronidazol (als moederverbinding + metabolieten) uitgescheiden. Hieruit volgt dat metabolisatie tot andere componenten plaats zou kunnen vinden, welke met de ontwikkelde bepalingmethode niet achterhaald kunnen worden. Voor ipronidazol kan geen uitspraak over de uitgescheiden hoeveelheden gedaan worden, omdat de metabolieten niet kwantitatief bepaald konden worden.

BIJLAGEN*

1. IJklijnen = lineariteit standaardoplossingen en eimonsters (3.5).
2. UV-spectra metaboliet (2.2;18) en ronidazol (3.6).
3. UV-spectra metaboliet (2.2;18), dimetridazol en ipronidazol (3.6).
4. Chromatogrammen blanco ei-monsters; eluens 0,25 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-CH}_3\text{CN}$ 800-200 (v/v) en 0,25 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-CH}_3\text{CN-MeOH}$ 900-40-60 (v/v/v) pH=4,0 (3.6).
5. Chromatogrammen blanco ei-monster en blanco faeces; eluens 0,25 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-CH}_3\text{CN}$ 800-200 (v/v) (5.1, 6.1).
6. Tabel 9; Dierexperimenteel onderzoek (7.2).
7. Chromatogrammen plasma-monsters (chrom. 5-8) (7.3.1).
8. Tabel 10; Gehalten plasma (7.3.1).
9. Plasma concentratie (fig. 2-5) (7.3.1).
10. Tabel 11; Gehalten mengmonsters, heel-ei (7.3.2).
11. Heel-ei-concentratie (fig. 6-9) (7.3.2).
12. Chromatogrammen ei-monsters (chrom. 9-11) (7.3.2).
13. Tabel 12; Gehalten eiwit/eigeel (7.3.2).
14. Eiwit/eigeel concentratie (fig. 10-13) (7.3.2).
15. Tabel 13; Gehalten faeces-monsters (7.3.3).
16. UV-spectra; Faeces-analyse dimetridazol (7.3.3).
17. UV-spectra; Faeces-analyse ronidazol (7.3.3).
18. UV-spectra; Faeces-analyse ipronidazol (7.3.3).
19. Uitgescheiden nitro-imidazolen in faeces, zonder glucuronidase/sulfatase (fig. 14-17) (7.3.3).
20. Uitgescheiden nitro-imidazolen in faeces, met glucuronidase/sulfatase (fig. 18-21) (7.3.3).
21. Massa-spectrum metaboliet ($R_t=6'$) van ipronidazol (7.3.3).

* De plots (bijlagen 2,3,4,5,7,12,14,16 en 18) werden gemaakt met een HP 85B personal computer en HP 7470 A plotter.

LITERATUUR

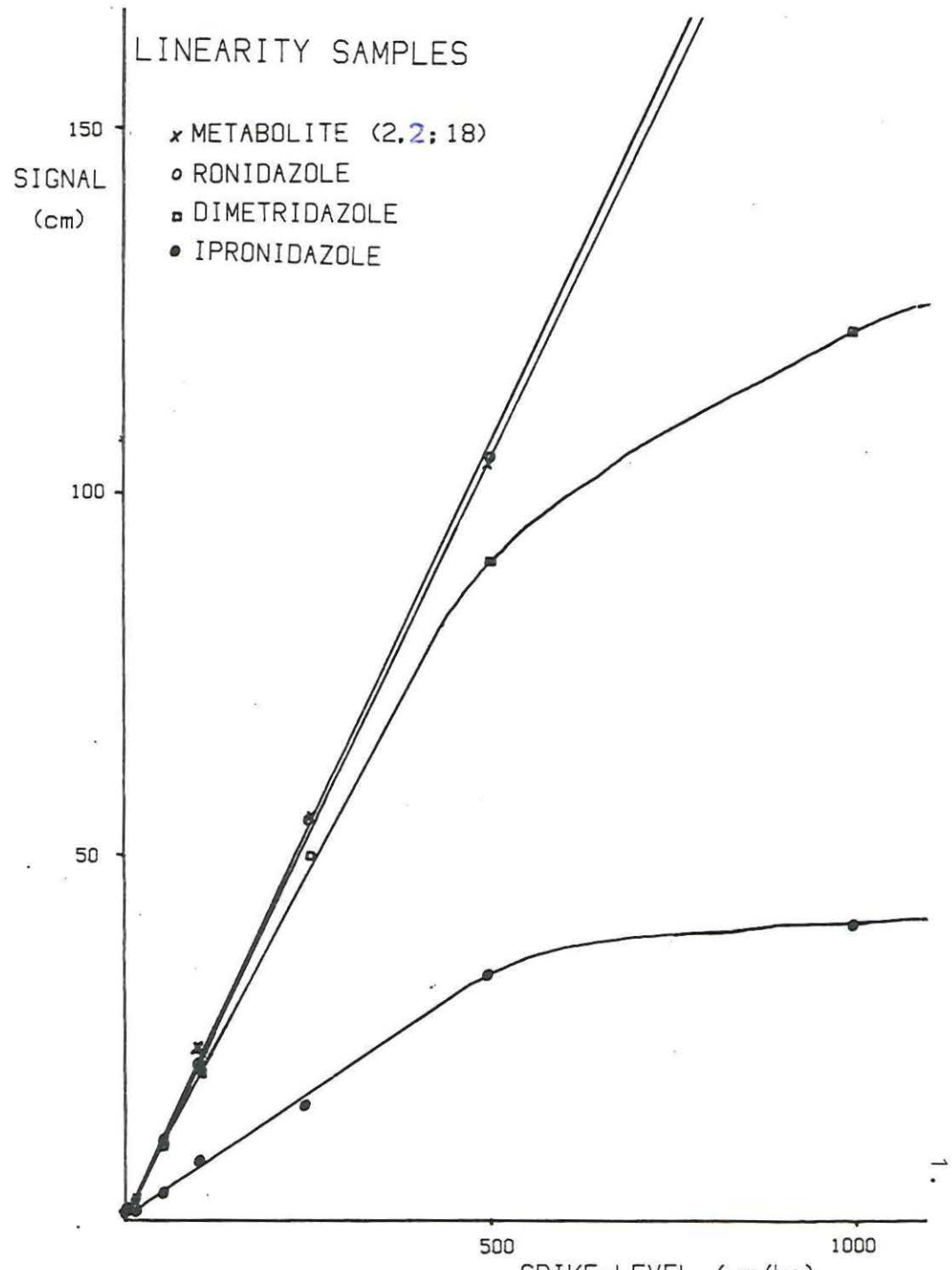
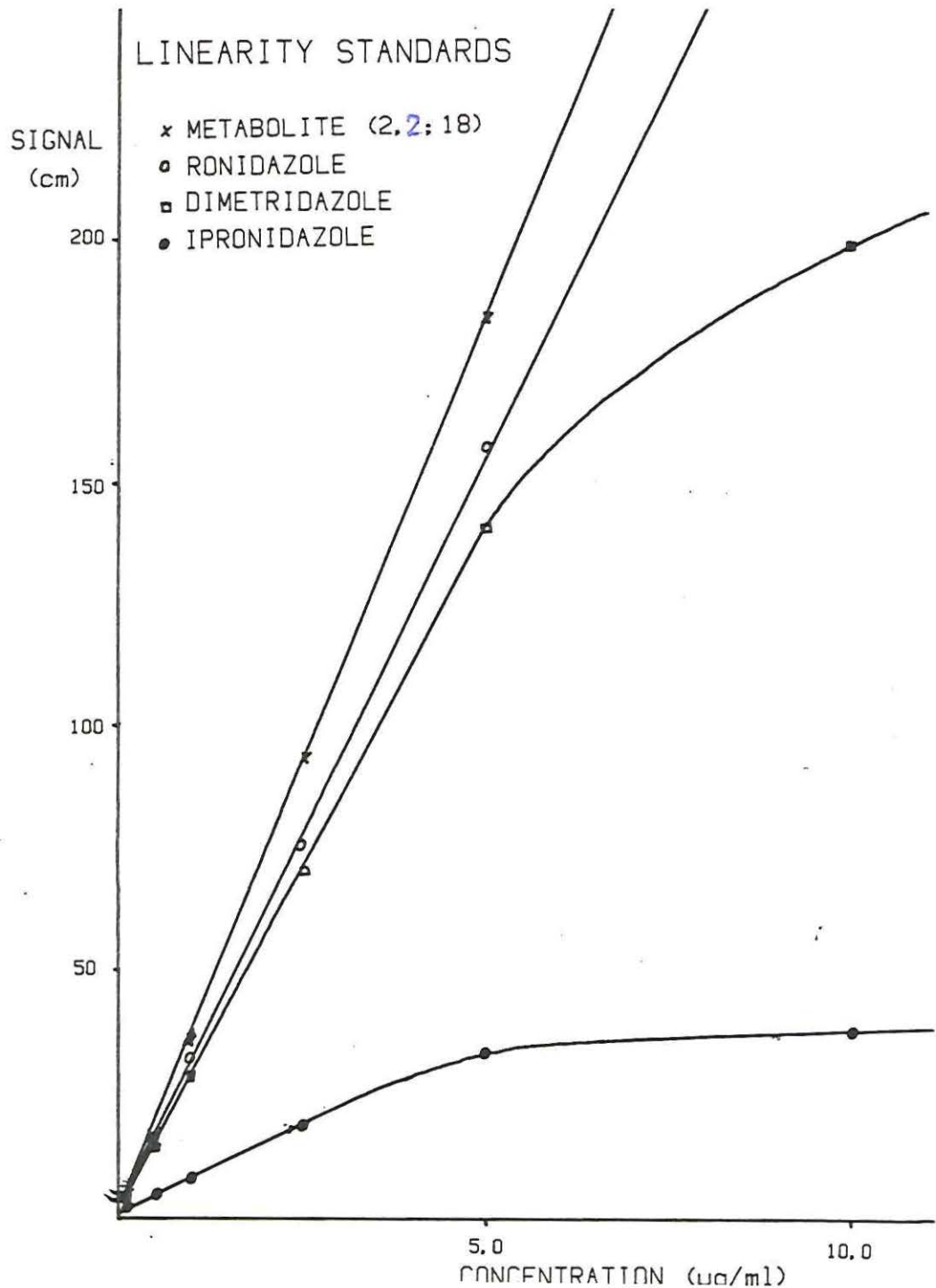
1. Aerts, M.M.L., Globaal overzicht van de stand van de hoge-druk vloeistofchromatografie in 1978, Scriptie hoofdvak-stage farmaco-chemie, oktober 1977-januari 1979 (Kath. Universiteit, Nijmegen).
2. Aerts, M.M.L., Beek, W.M.J., Kan, C.A., Nouws, J.F.M., Detection of sulfaguanidine residues in eggs with a fully automated liquid-chromatographic method using post-column derivatization; Drug depletion study in eggs after a single oral dose, Archiv für Lebensmittel hygiene, (1986), 37, 142 (1986).
3. Analytical Methods Committee, Determination of Iprnidazole in Animal Feeds, Analyst, Vol. 108 (January 1983), 106-108.
4. Analytical Methods Committee, Determination of Iprnidazole in Pre-mixes for Addition to Animal Feeds, Analyst, Vol. 107, (May 1982), 577-578.
5. Analytical Methods Committee, Determination of Ronidazole in Animal Feeds by Gas-Liquid Chromatography: A Collaborative Study by the EEC Committee of Experts, Analyst, Vol. 105, (February 1980), 161-164.
6. Analytical Methods Committee, Determination of Ronidazole in Animal Feeds by High-performance Liquid Chromatography, Analyst, Vol. 108, (December 1983), 1521-1524.
7. Anhalt, G., Physiologie der Eientstehung und Einlagerung anti-bakterieller Wirkstoffe, Arch. Geflügelk., 41, (1977), 232-237.
8. Beek, W.M.J., Bepaling van dimetridazol in voeders met een gehalte tussen 0-250 ppm, door middel van "reversed phase" chromatografie; Concept, Rijkslandbouwproefstation Maastricht, (1978).
9. Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., Bepaling van dimetridazol in vlees en eieren, Intern Analysevoorschrift RIKILT, nr. A 354, (1984).
10. Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., Bloed - bepaling van Dapson, Mono-acetyldapson en Diacetyldapson - HPLC, Intern Analysevoorschrift RIKILT, nr. A 404, 1e oplage, (1985), 1985-02-01.
11. Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., Diervoeders - Bepaling van Carbadox - kolommethode, Intern Analysevoorschrift RIKILT, nr. A 394 Afd. diergeneesmiddelen, 1e oplage, (1985).

12. Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., Determination of Furazolidon Residues in Eggs by HPLC Followed by Confirmation with a Diode-Array UV/Vis Detector, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 180, (1985), 211-214.
13. Beek, W.M.J., Buizer, F.G., Bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren door middel van HPLC, Intern Analysevoorschrift RIKILT, nr. DGM 30, 2e oplage, (1983).
14. Bell, D.J., Freeman, B.M., Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, New York-London, Academic Press, 1971, vol. 3 en 5.
15. Botsoglou, N.A., Vassilopoulos, V.N., Kufidis, D.C., Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Tetracyclines in Eggs, *Chimika Chronika, New Series*, 13, (1984), 37-44.
16. Breccia, A., Cavalleri, B., Adams, G.E., Nitroimidazoles, Chemistry, Pharmacology and Clinical Application, New York-London, Plenum Press, 1982.
17. Breiter, J., Helger, R., Lang, H., Evaluation of column extraction: a new procedure for the analysis of drugs in body fluids, *Forensic Science*, 7, (1976), 131-140.
18. Bruchem, van, G.D., Buizer, F.G., Bepaling van ipronidazol in gehakt (h.o.h.), Intern Analyserapport RIKILT, nr. 83-43 (1983).
19. Buizer, F.G., Severijnen, M., Determination of Dimetridazole in Feedstuffs and Pre-mixed by High Speed Liquid Chromatography, *Analyst*, Vol. 100, (December 1975), 854-856.
20. Cala, P.C., Downing, G.V., jr., Michielli, R.F., Wittick, J.J., Determination of Ronidazole in Swine Tissues by Differential Pulse Polarography, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 24, nr. 4, (1976), 764-765.
21. Clarke, E.G.C., Isolation and Identification of Drugs, Vol. 2, London, The Pharmaceutical Press, 1975.
22. Craine, E.M., Parnel, M.J., Stone, L.R., A Method for Analysis of Swine Tissue for the Primary Metabolite of Dimetridazole at the 2 ppb Level, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 22, nr. 5, (1974), 877-881.
23. Dafsisios, H.C., Determination of Dimetridazole in Feeds by DC Polarography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 47, nr. 2, (1964), 231-234.
24. Egberink, I.M., Isolatie van diergeneesmiddelresiduen uit kippe-eieren, Doctoraalschriptide Analytische Farmacie R.U.U., Wageningen, Maart 1987.

25. Geertsma, M.F., Nouws, J.F.M., Grondel, J.L., Aerts, M.M.L., Vree T.B., Kan, C.A., Residues of sulphadimidine and its metabolites in the hen's egg following oral sulphadimidine medication, *The Veterinary Quarterly*, Vol. 9 (1987), 67-75.
26. Gut, I., Cikrt, M., Plaa, G.L., *Industrial and Environmental Xenobiotics: Metabolism and Pharmacokinetics of Organic Chemicals and Metals*, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1981, 395-401.
27. Harris, J.R., Baker, P.G., Alliston, G., Determination of Ronidazole in Pig and Turkey Feeding Stuffs by Gas-Liquid Chromatography, *Analyst*, Vol. 102, (August 1977), 580-583.
28. Hobson-Frohock, A., Reader, J.A., Determination of Dimetridazole Residues in Poultry Tissues by High-Performance Liquid Chromatography, *Analyst*, Vol. 108, (September 1983), 1091-1095.
29. Hocquellet, P., Application de la polarographie au dosage de quelques substances médicamenteuses ajoutées aux aliments des animaux, *Industries de L'Alimentation Animale*, nr. 6, (1975), 7-30.
30. Hori, Y., Systematic analysis of synthetic antibacterials in chicken muscles and eggs by high-performance liquid chromatography, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 24 (5), (October 1983), 447-453.
31. Horwitz, W., Review of analytical methods for sulfonamides; Analytical Methods for Sulfonamides in Foods and Feeds; I. Review of Methodology, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 64, nr. 1 (1981), 104-128.
32. Hoshino, Y., Nose, N., Akagi, H., Takabatake, E., Analysis of clopidol in chicken muscle and egg by gaschromatography, *Eisei Kagaku*, 26 (4), (1980), 186-191.
33. Houwen, van der, O.A.G.J., *Cursusdiktaat Chromatografie*, Rijksuniversiteit Utrecht, 1984.
34. Keukens, H.J., Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L, High Performance-Liquid-Chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and on-line diode-array UV-Vis detection, *J. Chrom.*, 352, (1986), 445-453.

35. Love, L.J.C., Zibas, S., Noroski, J., Arunyanart, M., Direct injection of untreated serum using nonionic and ionic micellar liquid chromatography for determination of drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 3, nr. 6, (1985), 511-521.
36. Malisch, R., Multimethode zur bestimmung der Rückstände von Chemotherapeutika, Antiparasitika und Wachstumsförderern in Lebensmitteln tierischer Herkunft, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 182, (1986), 385-399.
37. Petz, M., Hochdruckflüssigchromatographische Rückstandsanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und fünf Sulfonamiden in Eiern, Fleisch und Milch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 176, (1983), 289-293.
38. Ritter, de, E., Osadca, M., Collaborative Study of a Gas Chromatographic Method for Iprnidazole in Feeds, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54, nr. 1, (1971), 72-74.
39. Roij, de, Th.A.J.M., Vries, de, P.H.U., Milieutoxicologische aspecten van het gebruik van veevoederadditieven en therapeutica; Persistentie in dierlijke excreta en milieu, ILOB-rapport Wageningen, 478 (juni 1980).
40. Rosenblum, C., Trenner, N.R., Buhs, R.P., Hiremath, C.B., Koniuszy, F.R., Wolf, D.E., Metabolism of Ronidazole (1-methyl-5-nitroimidazol-2-ylmethyl-carbamate), *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 20, nr. 2, (1972), 360-371.
41. Rybinska, K., Detection of flavomycin [bambermycin] in eggs, *Pocz. Panstw. Zakl. Hig.*, 35 (2), (1984), 131-133.
42. Schellhaas, G., Untersuchungen zur Frage des Hemmstoffnachweises bei Hühnereiern, *Fortschritte der Veterinärmedizin*, 20:10 Kongressbericht, (1974), 272-275.
43. Schmid, K., Fankel, R., Bestimmung von Ronidazol in Hirschfuttermitteln mittels der Hoch Druck-Flüssigkeits-Chromatographie, *Landwirtsch. Forsch.*, 30.4, (1977), 291-295.
44. Schröder, E., C. Rufer, Schmiechen, R., *Arzneimittelchemie III, Chemotherapeutica*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, (1976), 181-184.

45. Shenstone, F.S., The gross composition, chemistry and physico-chemical basis of organization of the yolk and white; In: T.C. Carter, Egg quality: A study of the hen's egg, Edinburgh, Oliver and Boyd, 1968.
46. Stone, L., Hobson, D., Ultraviolet Spectroscopic Determination of Dimetridazole in Feeds, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 57, nr. 2, (1974), 343-344.
47. Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L., Determination of Aflatoxins in Animal Tissues, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 64, nr. 4, (1981), 964-966.
48. Terada, H., Asanoma, M., Tsubouch, H., Ishihara, T., Sakabe, Y., Studies on analysis of residual synthetic antibacterials in foods. I. Determination of sulphonamides by high-performance-Liquidchromatography, Eisei Kagaku, 29 (4), (August 1983), 226-231.
49. Trucksess, M.W., Stoloff, L., Determination of Aflatoxicol and Aflatoxins B1 and M1 in Eggs, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 67, nr. 2, (1984), 317-319.
50. Trucksess, M.W., Stoloff, L., Pons, W.A., jr., Cucullu, A.F., Lee, L.S., Franz, A.O., jr., Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxine B1 in Eggs, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 60, nr. 4, (1977), 795-798.
51. Wolff, M.E., Burger's Medicinal Chemistry, deel II, 4e editie, New York, John Wiley and Sons, 1979.
52. Wolzak, A., Pearson, A.M., Coleman (†), T.H., Pestka, J.J., Gray, J.I., Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens, Fd. Chem. Toxic., Vol. 23, nr. 12, (1985), 1057-1061.
53. Handleiding Extrelut, Merck Darmstadt.
54. Jaarverslag 1984; Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
55. Martindale; The Extra Pharmacopoeia, London, The Pharmaceutical Press, 27e edition, 1978.
56. The Merck Index, An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, U.S.A., Merck and Co., Inc., 1983.

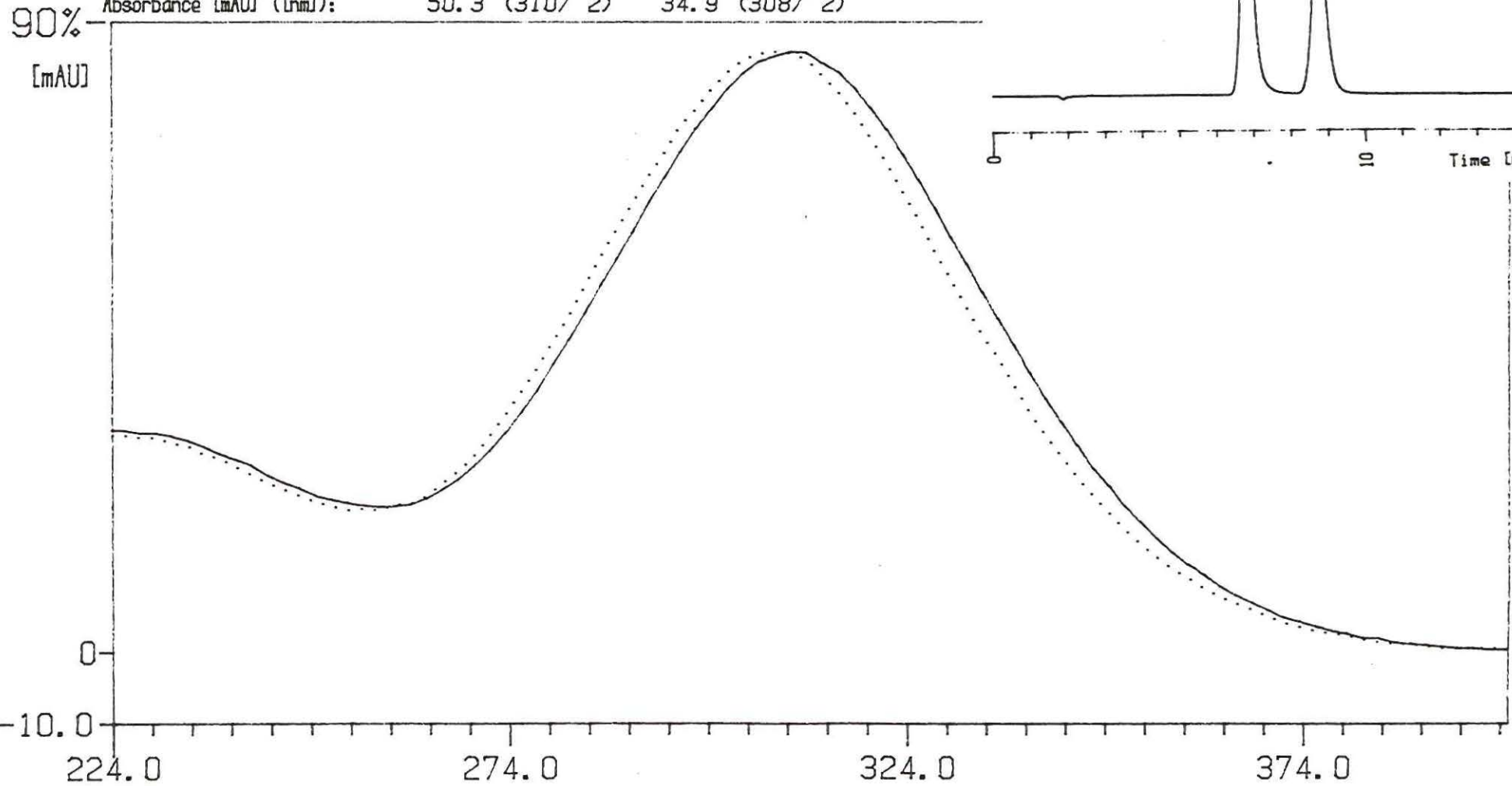


UV-SPECTRA metabolite (2,2;18) and ronidazole

| | | |
|------------------------|---------------------|---------------|
| Component: | METABOLITE (2,2;18) | RONIDAZOLE |
| Date: | 09/10/1986 | 09/10/1986 |
| Spectrum [min]: | 6.8212 | 8.7518 |
| Reference [min]: | 7.8318 | 9.7693 |
| Attn [mAU]: | 58.7 | 40.7 |
| Absorbance [mAU] (nm): | 50.3 (310/ 2) | 34.9 (308/ 2) |

Inj. Time: 17:12
 Attn [mAU]: 75.0 (50.0)
 Zero%: 10%
 Signal: C: 4,1 Set M

- Wavelength:
- 1. 550. 10
- 2. 254. 4
- 3. 260. 4
- 4. 313. 4
- 5. 365. 4
- 6. 320. 20
- 7. 450. 50
- 8. 550. 100



Mobile phase: 5% 550 MIBAC, 40% CH3CN, 55% MEQH, 000 40-60 pH=4.0

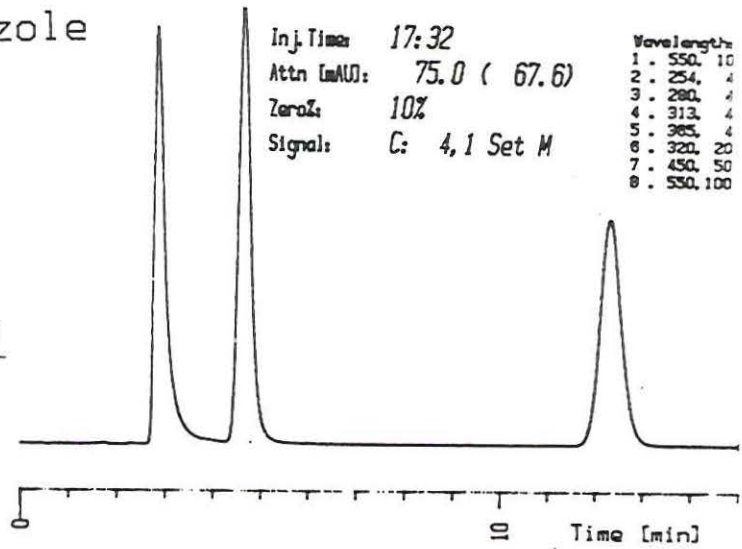
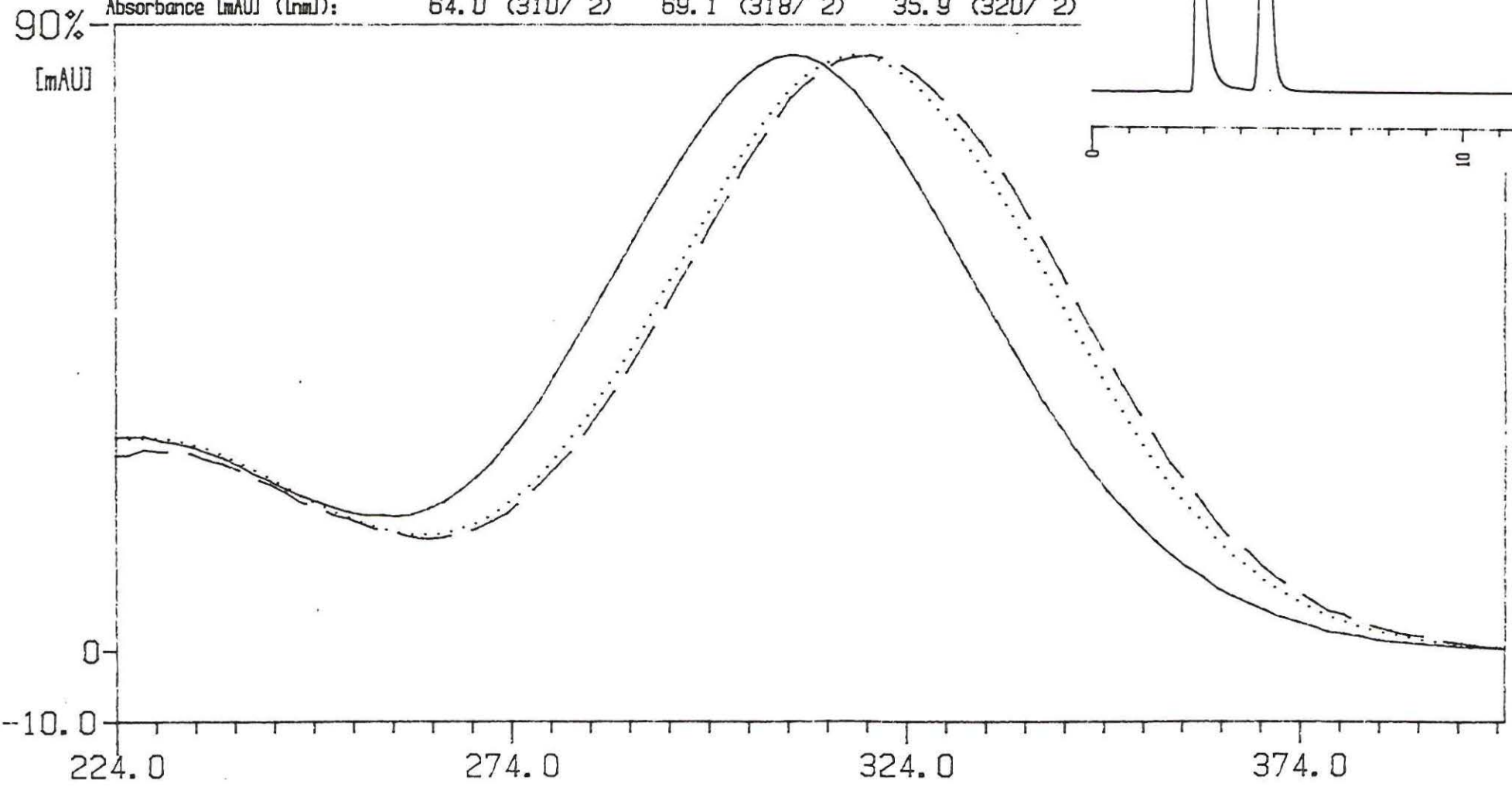
Wavelength [nm]

UV-SPECTRA metabolite (2,2;18), dimetridazole and ipronidazole

| Component: | METABOLITE (2,2;18) | DIMETRIDAZOLE | IPRONIDAZOLE |
|------------------------|---------------------|---------------|---------------|
| Date: | 09/09/1986 | 09/09/1986 | 09/09/1986 |
| Spectrum [min]: | 2.8542 | 4.6538 | 12.3452 |
| Reference [min]: | 3.9390 | 5.6152 | 13.3313 |
| Attn [mAU]: | 74.6 | 80.6 | 41.9 |
| Absorbance [mAU] (nm): | 64.0 (310/ 2) | 69.1 (318/ 2) | 35.9 (320/ 2) |

Inj. Time: 17:32
 Attn [mAU]: 75.0 (67.6)
 Zero: 10%
 Signal: C: 4,1 Set M

Wavelengths:
 1. 550, 10
 2. 254, 4
 3. 280, 4
 4. 313, 4
 5. 365, 4
 6. 320, 20
 7. 450, 50
 8. 550, 100



Control egg sample;

mobile phase: 0.25M KH₂PO₄-CH₃CN 800-200

File: *dal051*

Date: 08/07/1986

Inj. Time: 19:03

| | | | | |
|---|------|--------------|-----|-----|
| A | 2.1: | 10.0 (59.4) | mAU | 10% |
| B | 3.1: | 10.0 (32.3) | mAU | 10% |
| C | 4.1: | 10.0 (5.2) | mAU | 10% |
| D | 5.1: | 10.0 (3.6) | mAU | 10% |
| E | 6.1: | 10.0 (2.7) | mAU | 10% |
| F | 7.1: | 10.0 (6.5) | mAU | 10% |
| G | 8.1: | 10.0 (36.9) | mAU | 10% |

hp 1040A

| Wavelength | |
|------------|---------|
| 1. | 550, 10 |
| 2. | 254, 4 |
| 3. | 280, 4 |
| 4. | 313, 4 |
| 5. | 365, 4 |
| 6. | 380, 4 |
| 7. | 330, 4 |
| 8. | 230, 4 |



Control egg sample;

mobile phase: 0.25M KH₂PO₄-CH₃CN-MEOH 900-40-60 pH=4.0

File: *dal051*

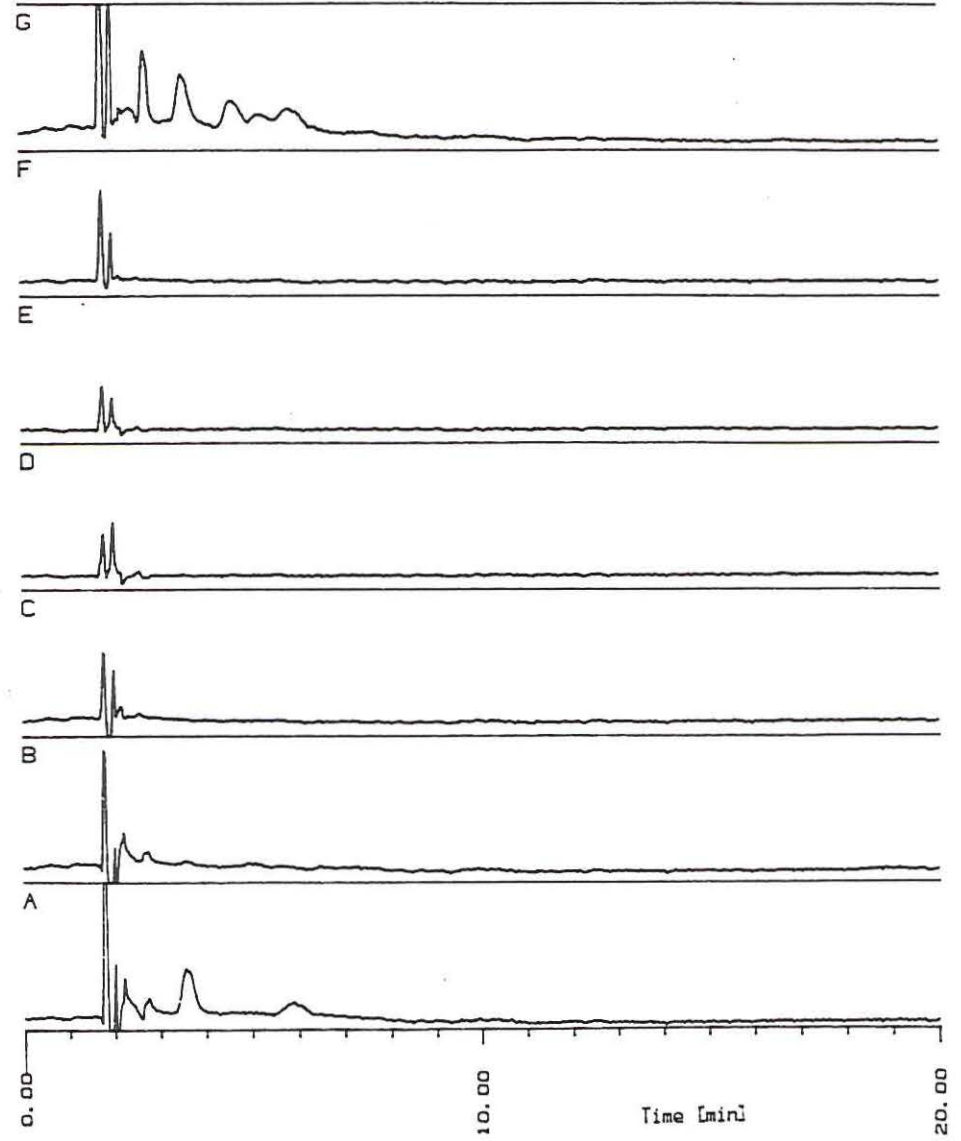
Date: 07/10/1986

Inj. Time: 12:10

| | | | | |
|---|------|-------------|-----|-----|
| A | 2.1: | 5.0 (8.1) | mAU | 10% |
| B | 3.1: | 5.0 (4.0) | mAU | 10% |
| C | 4.1: | 5.0 (2.4) | mAU | 10% |
| D | 5.1: | 5.0 (1.8) | mAU | 10% |
| E | 6.1: | 5.0 (1.5) | mAU | 10% |
| F | 7.1: | 5.0 (3.1) | mAU | 10% |
| G | 8.1: | 5.0 (12.3) | mAU | 10% |

hp 1040A

| Wavelength | |
|------------|---------|
| 1. | 550, 10 |
| 2. | 254, 4 |
| 3. | 280, 4 |
| 4. | 313, 4 |
| 5. | 365, 4 |
| 6. | 380, 4 |
| 7. | 330, 4 |
| 8. | 230, 4 |



Control plasma sample:

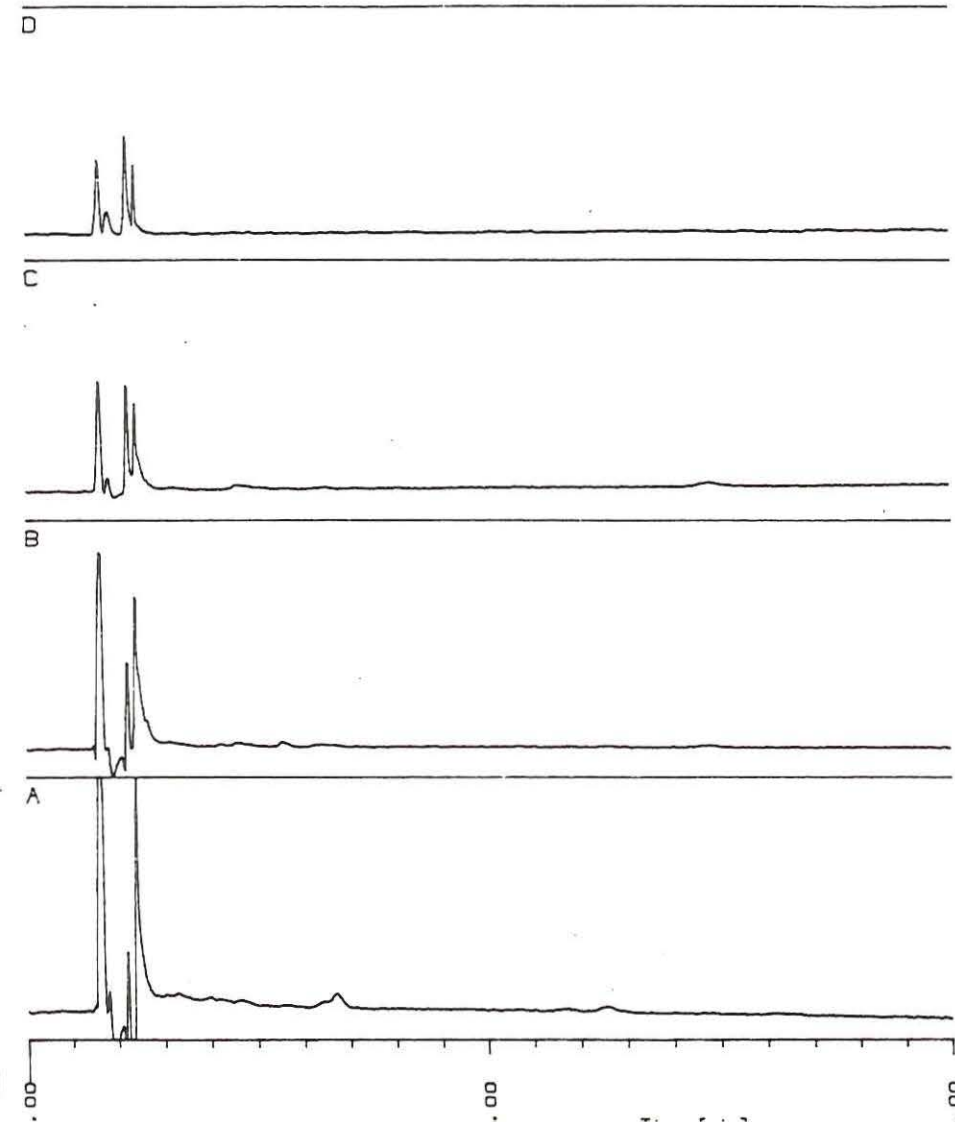
mobile phase: 0.25M KH₂PO₄-CH₃CN 800-200

File: da1081
Date: 09/04/1986
Inj. Time: 17:57

A 2.1: 10.0 (16.5) mAU 10Z
B 3.1: 10.0 (7.8) mAU 10Z
C 4.1: 10.0 (4.3) mAU 10Z
D 5.1: 10.0 (3.9) mAU 10Z

hp 1040A

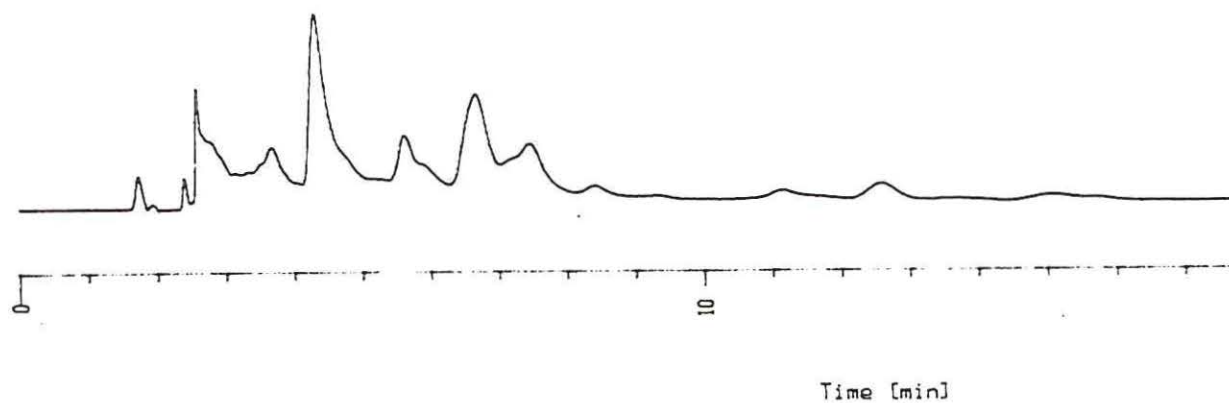
Wavelength
1. 550, 10
2. 254, 4
3. 280, 4
4. 313, 4
5. 365, 4
6. 320, 20
7. 450, 50
8. 550, 100



Control faeces sample; mobile phase: 0.25M KH₂PO₄-CH₃CN 800-200

File: da1071
Date: 08/11/1986
Inj. Time: 07:31
Attn [mAU]: 100.0 (30.4)
Zero%: 10
Signal: C: 4, 1

Wavelength [nm]
1. 550, 10
2. 254, 4
3. 280, 4
4. 313, 4
5. 365, 4
6. 320, 20
7. 450, 50
8. 550, 100



Tabel 9. Dierexperimenteel onderzoek

| Kip nr. | Gecanu- leerd | Toegediend geneesmiddel 75 mg/kip | Bloed/plasmaverzameling na t= | | | | | | | | Mestopvang na t= (dagen) | | | | | | Gelegde eieren op dag t.o.v. toediening dgm. | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------------|---|-------------------------------|----|----|----|----|----|-----|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|---|
| | | | 30' | 1h | 2h | 4h | 6h | 8h | 12h | 24h | 1 | 1,5 | 2,5 | 3,5 | 4,5 | 5,5 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| 13 | ja | dimetridazol | + | + | + | + | + | + | + | 96 | 13 | 88 | 125 | 103 | 113 | + | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 15 | ja | dimetridazol | + | + | + | + | + | + | + | 83 | 129 | 97 | 74 | 63 | 63 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | ja | ipronidazol | + | + | + | + | + | + | + | 134 | 62 | 149 | 129 | 86 | 120 | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 20 | ja | ronidazol | + | + | + | + | + | + | + | 83 | 94 | 103 | 109 | 92 | 88 | + | + | - | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 | ja | (blanco)- | + | + | + | + | + | + | + | +* | +* | +* | +* | +* | +* | + | - | - | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | |
| 11 | nee | dimetridazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 12 | nee | dimetridazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | W | - | + | + | + | + | + | + | |
| 21 | nee | dimetridazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 22 | nee | ipronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 23 | nee | ipronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 24 | nee | ipronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 25 | nee | ipronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 26 | nee | ronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 27 | nee | ronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | |
| 28 | nee | 150 mg ronidazol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |

+ = bloed/plasma afgenomen
- = geen plasma gewonnen

* wel mest opgevangen
niet gewogen (mest gram)

+ = ei gelegd
- = geen ei gelegd

W = windei gelegd

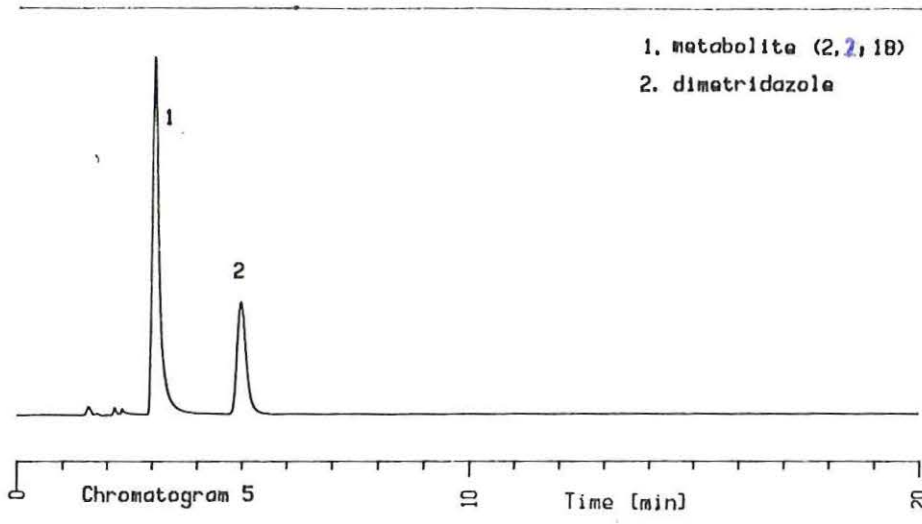
Mestopvang na t= (dagen)

1 : 15/8 9.00
1,5: 15/8 15.30
2,5: 16/8
3,5: 17/8
4,5: 18/8
5,5: 19/8

Gelegde eieren op dat t.o.v. toed. dgm.

-1: 13/8 5: 19/8 11: 25/8
0: 14/8 6: 20/8 12: 16/8
1: 15/8 7: 21/8 13: 27/8
2: 16/8 8: 22/8 14: 28/8
3: 17/8 9: 23/8
4: 18/8 10: 24/8

PLASMA SAMPLES; CHROMATOGRAMS



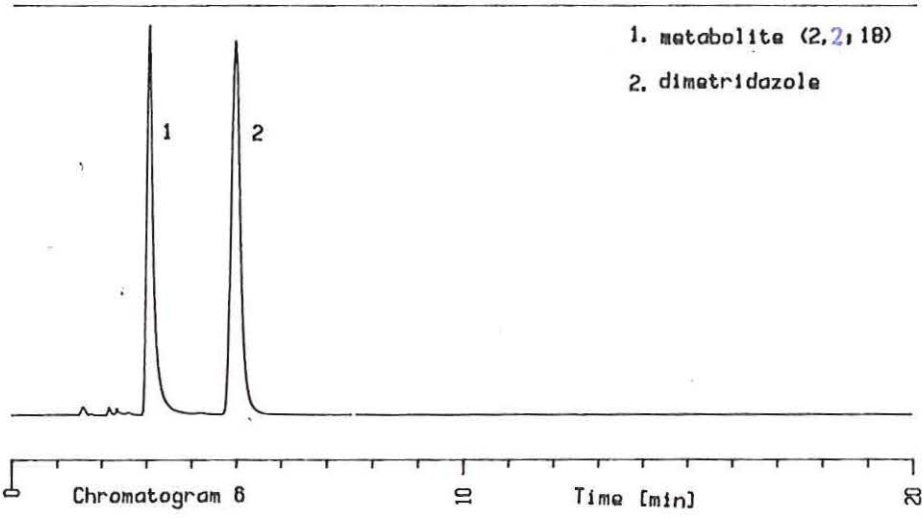
1. metabolite (2.2, 18)
2. dimetridazole

Inj. Time: 15:46
Attn (mAU): 250.0 (198.1)
Zero%: 10%
Signal: C: 4, 1 Set

7.

| Wavelength |
|-------------|
| 1. 550, 10 |
| 2. 254, 4 |
| 3. 280, 4 |
| 4. 313, 4 |
| 5. 365, 4 |
| 6. 320, 20 |
| 7. 450, 50 |
| 8. 550, 100 |

HEN 15
DIMETRIDAZOLE
Plasma 9, 15 (14/8)
WITHOUT GLUCURONIDASE/SULFATASE

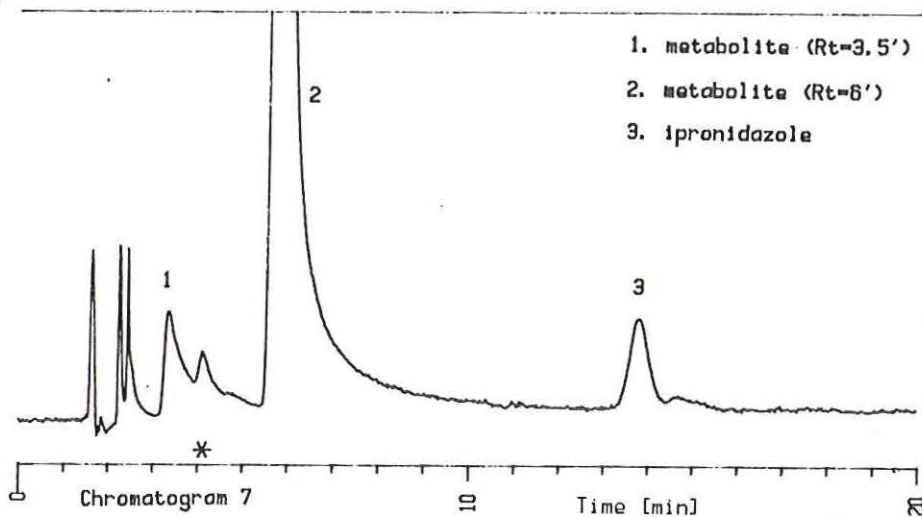


1. metabolite (2.2, 18)
2. dimetridazole

Inj. Time: 18:24
Attn (mAU): 250.0 (214.3)
Zero%: 10%
Signal: C: 4, 1 Set

| Wavelength |
|-------------|
| 1. 550, 10 |
| 2. 254, 4 |
| 3. 280, 4 |
| 4. 313, 4 |
| 5. 365, 4 |
| 6. 320, 20 |
| 7. 450, 50 |
| 8. 550, 100 |

HEN 15
DIMETRIDAZOLE
Plasma (9, 15 (14/8)
WITH GLUCURONIDASE/SULFATASE

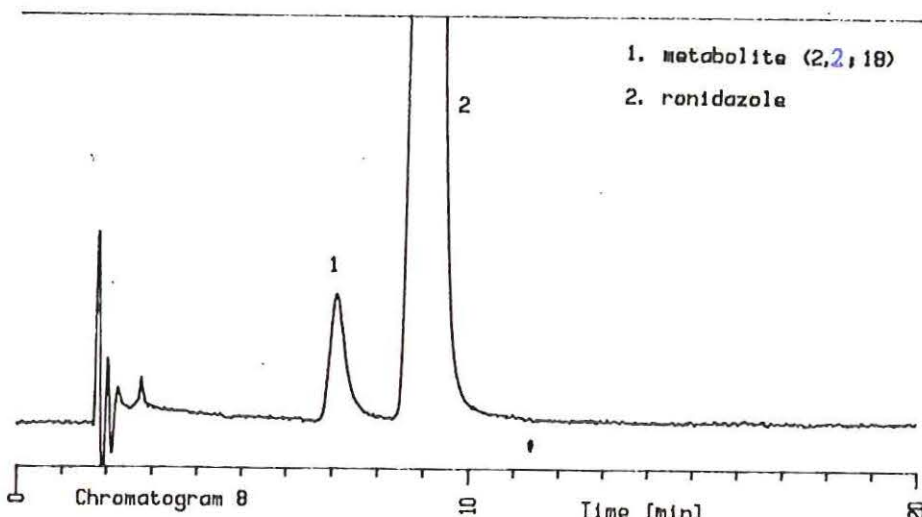


1. metabolite (Rt=3.5')
2. metabolite (Rt=6')
3. ipronidazole

Inj. Time: 19:16
Attn (mAU): 10.0 (92.6)
Zero%: 10%
Signal: C: 4, 1 Set

| Wavelength |
|-------------|
| 1. 550, 10 |
| 2. 254, 4 |
| 3. 280, 4 |
| 4. 313, 4 |
| 5. 365, 4 |
| 6. 320, 20 |
| 7. 450, 50 |
| 8. 550, 100 |

HEN 18
IPRONIDAZOLE
Plasma 10, 15 (14/8)
WITHOUT GLUCURONIDASE/SULFATASE



1. metabolite (2.2, 18)
2. ronidazole

Inj. Time: 16:31
Attn (mAU): 10.0 (147.9)
Zero%: 10%
Signal: C: 4, 1 Set

| Wavelength |
|-------------|
| 1. 550, 10 |
| 2. 254, 4 |
| 3. 280, 4 |
| 4. 313, 4 |
| 5. 365, 4 |
| 6. 320, 20 |
| 7. 450, 50 |
| 8. 550, 100 |

HEN 20
RONIDAZOLE
Plasma 14, 15 (14/8)
WITH GLUCURONIDASE/SULFATASE

Tabel 10. Gehalten plasma*

| Kip nr. | Verbinding | Glucuronidase | Tijd na toediening nitro-imidazol | | | | | | | |
|---------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | | 14/8;8.45 0,5 uur | 14/8;9.15 1 uur | 14/8;10.15 2 uur | 14/8;12.15 4 uur | 14/8;14.15 6 uur | 14/8;16.15 8 uur | 14/8;20.15 12 uur | 15/8;8.15 24 uur |
| 13 | dimetridazol | -- | 2,5 | 2,9 | 0,63? | 2,5 | 1,9 | 0,63 | 0,32 | 0,1 |
| | metaboliet | -- | 2,2 | 8,2 | 18,5 | 22,2 | 18,8 | 15,8 | 6,7 | 0,34 |
| | dimetridazol | + | - | - | 13,8 | - | 4,4 | - | - | 0,34 |
| | metaboliet | + | - | - | 18,1 | - | 19,2 | - | - | 0,60 |
| 15 | dimetridazol | -- | 3,8 | 11,8 | 7,4 | 2,3 | 1,3 | 0,21 | 0,11 | <0,1 |
| | metaboliet | -- | 13,4 | 23,2 | 29,6 | 31,8 | 27,2 | 17,8 | 8,2 | 0,50 |
| | dimetridazol | + | - | 61,5 | - | - | 3,4 | - | - | 1,3 |
| | metaboliet | + | - | 22,9 | - | - | 29,7 | - | - | 0,50 |
| 18 | ipronidazol | -- | 5,5 | 10,9 | 1,9 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |
| | metaboliet | -- | 0,17 | 0,50 | 1,0 | 1,3 | 0,84 | 0,50 | 0,17 | <0,1 |
| | Rt=3,5'*** metaboliet | -- | 8,2 | 21,8 | 22,5 | 9,4 | 2,0 | 0,67 | <0,1 | <0,1 |
| | ipronidazol | + | - | - | 1,8 | - | 0,34 | - | - | <0,1 |
| | metaboliet | + | - | - | 1,3 | - | 1,1 | - | - | <0,1 |
| | Rt=3,5'*** metaboliet | + | - | - | 20,8 | - | 2,8 | - | - | <0,1 |
| 20 | ronidazol | -- | 72,6 | 70,6 | 66,4 | 57,1 | 49,1 | 43,0 | 30,2 | 8,9 |
| | metaboliet | -- | 0,25 | 0,34 | 0,50 | 0,67 | 0,76 | 0,84 | 0,67 | 0,25 |
| | ronidazol | + | - | 69,1 | - | - | 48,2 | - | - | 9,0 |
| | metaboliet | + | - | 0,50 | - | - | 0,71 | - | - | 0,27 |

- Niet geanalyseerd met glucuronidase.

-- Gehaltebepaling zonder voorbehandeling met sulfatase/glucuronidase

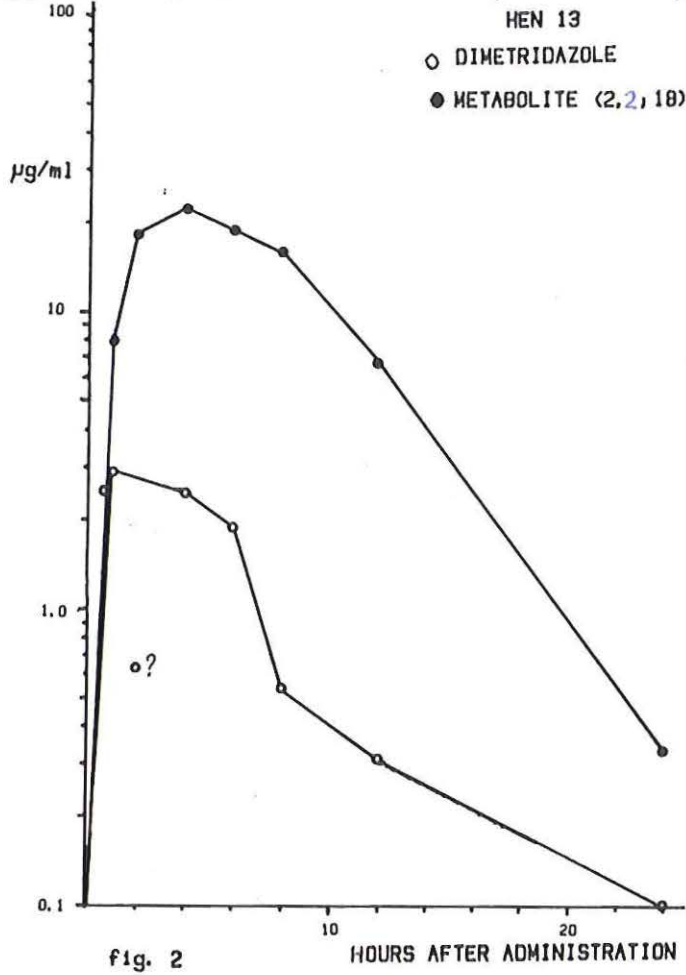
+ Gehaltebepaling met voorbehandeling met sulfatase/glucuronidase

? Waarschijnlijk te lage waarde; echter geen plasma aanwezig om de gehaltebepaling nog eens uit te voeren

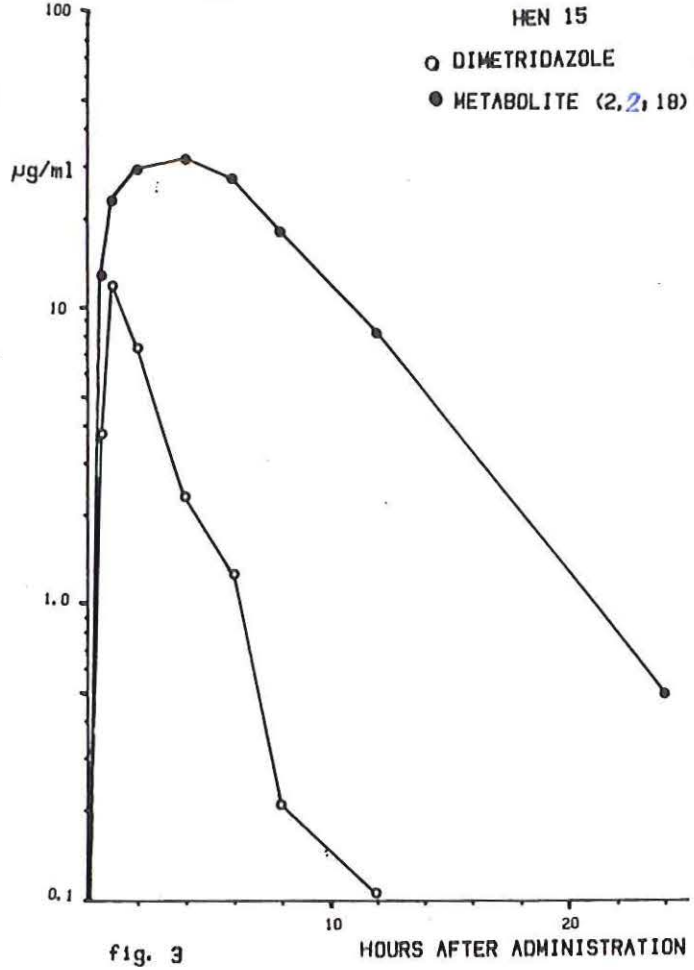
* Gehalten in µg/ml plasma, waarbij gecorrigeerd is voor de bij methodenontwikkeling plasma (5.1) genoemde recoveries

** Gehalten berekend met standaardoplossingen van ipronidazol

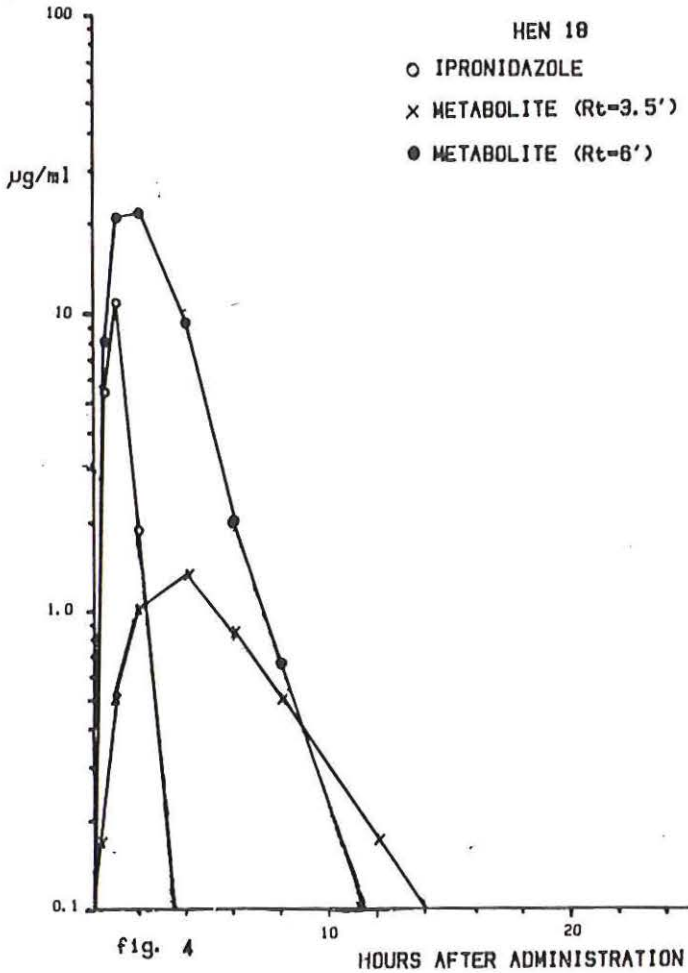
PLASMA CONCENTRATION



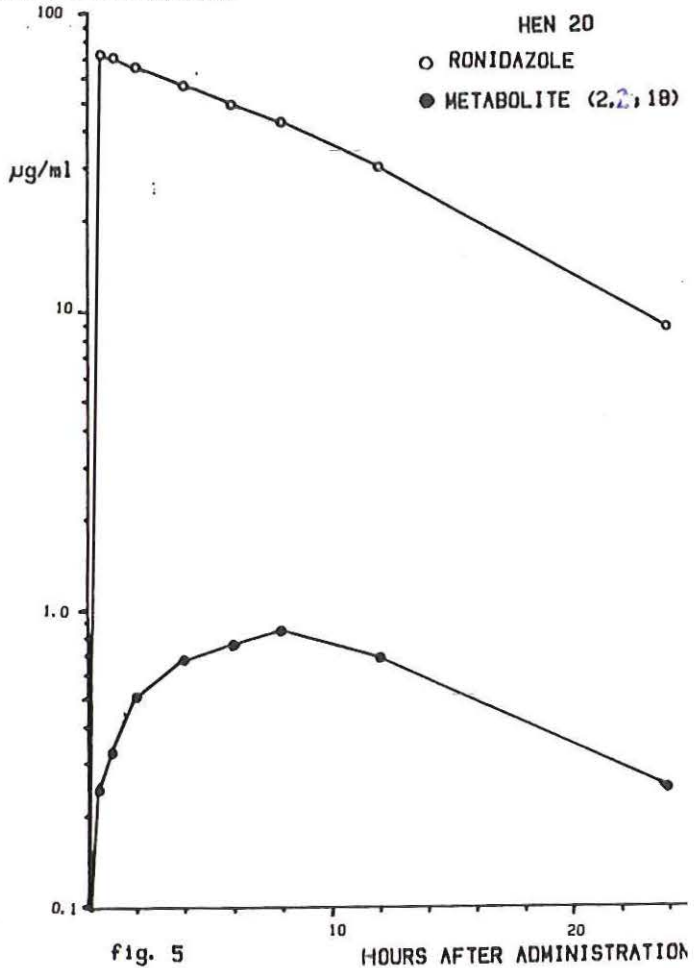
PLASMA CONCENTRATION



PLASMA CONCENTRATION



PLASMA CONCENTRATION



Tabel 11. Gehalten mengmonsters, heel-ei*

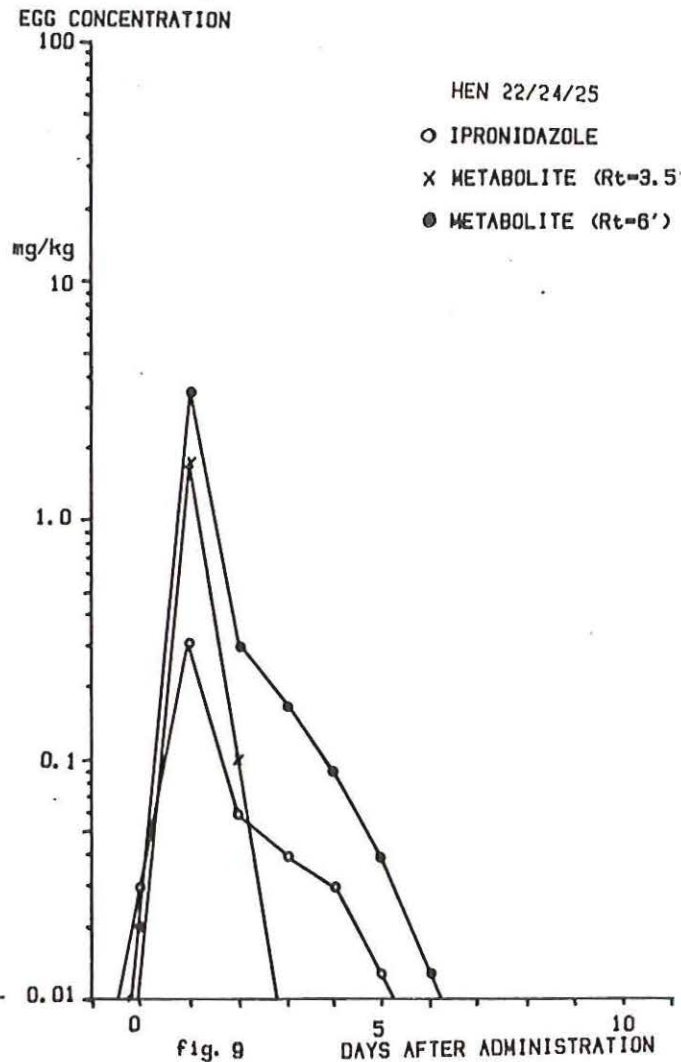
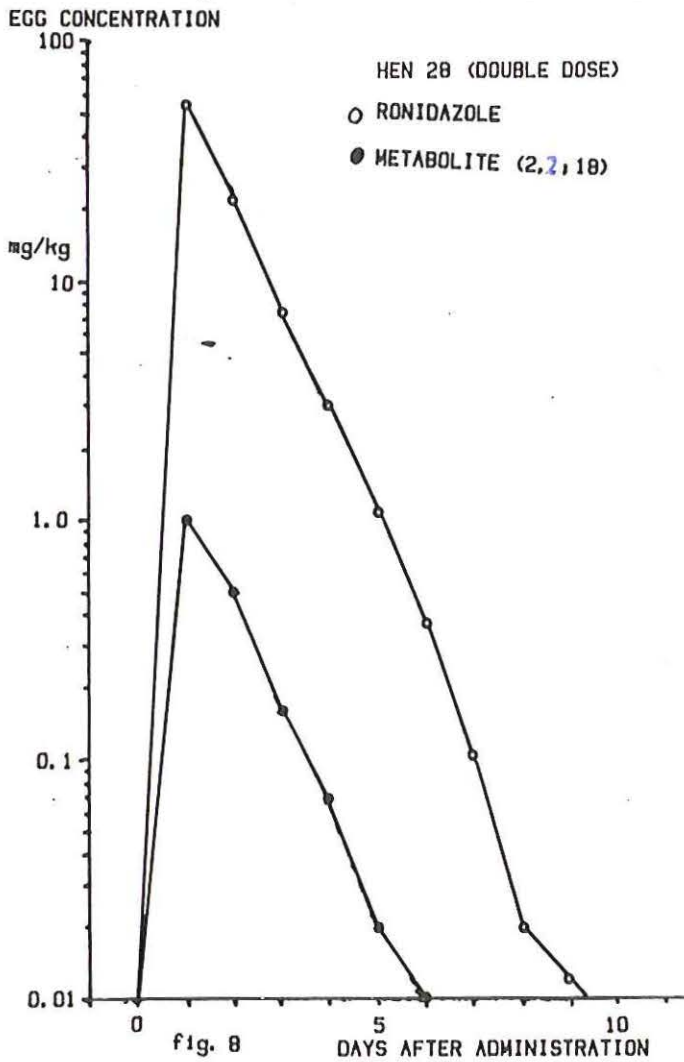
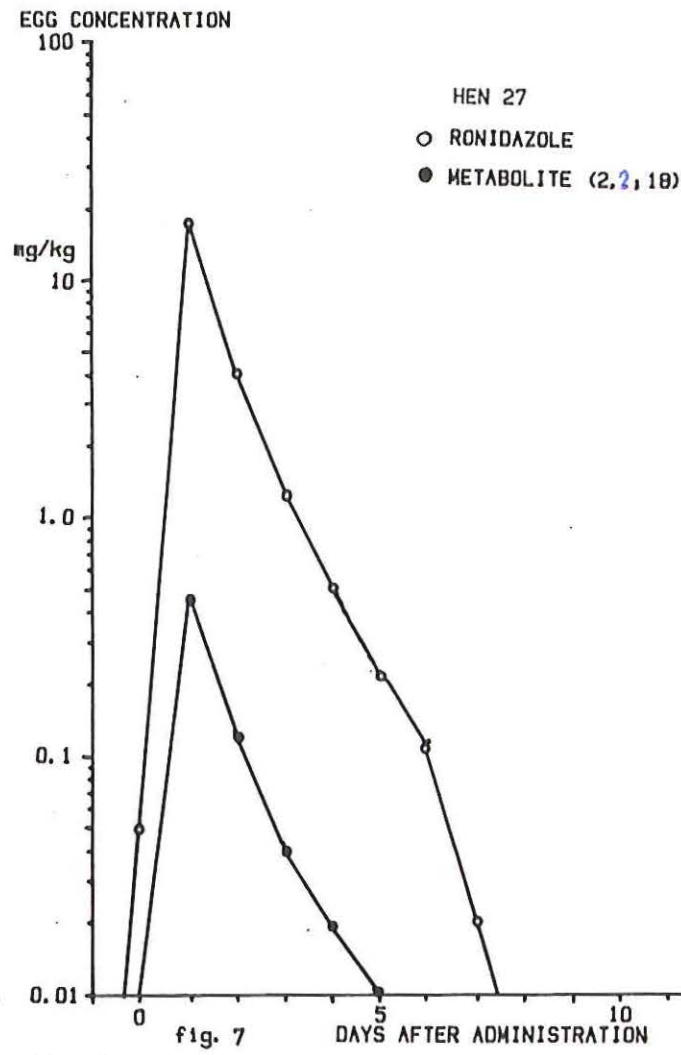
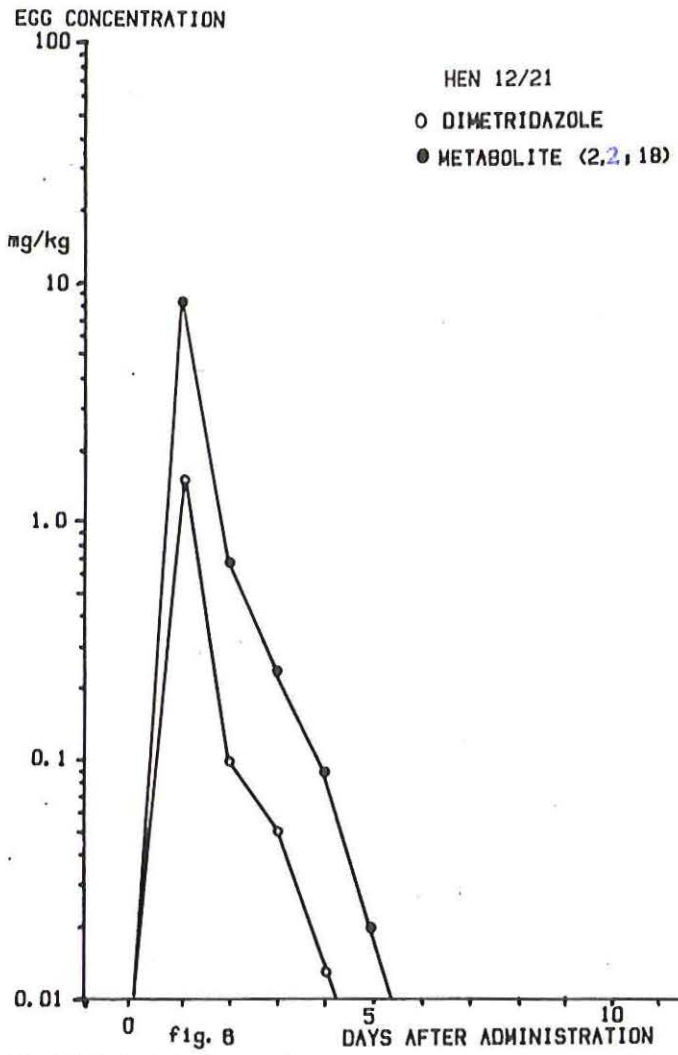
| Mengmonster van kipprs. | Verbinding | Datum/dag | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|------------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 13/8 -1 | 14/8 0 | 15/8 1 | 16/8 2 | 17/8 3 | 18/8 4 | 19/8 5 | 20/8 6 | 21/8 7 | 22/8 8 | 23/8 9 | 24/8 10 | 25/8 11 | 26/8 12 | 27/8 13 | 28/8 14 |
| 12-21 | dimetridazol metaboliet | <0,01 | <0,01 | 1,5 | 0,10 | 0,05 ⁰ | 0,013 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - |
| | | <0,01 | <0,01 | 8,4 | 0,69 | 0,24 | 0,09 ¹ | 0,019 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - |
| 22-24-25 | ipronidazol metaboliet Rt=3,5' ** | <0,01 | 0,028 | 0,31 | 0,060 | 0,04 ¹ | 0,03 ² | 0,013 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - |
| | | <0,01 | <0,01 | 0,31 | 0,021 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - |
| | metaboliet Rt=6' ** | <0,01 | 0,021 | 3,5 | 0,30 | 0,17 | 0,090 | 0,039 | 0,013 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - |
| 27 | ronidazol metaboliet | <0,01 | 0,050 | 17,5 | 4,1 | 1,3 | 0,52 | 0,22 | 0,11 | 0,02 ¹ | <0,01 | - | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - |
| | | <0,01 | <0,01 | 0,46 | 0,12 | 0,04 ¹ | 0,018 | 0,010 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - |
| 28 dubbele dosis | ronidazol metaboliet | <0,01 | <0,01 | 53,9 | 22,2 | 7,5 | 3,1 | 1,1 | 0,38 | 0,10 | 0,020 | 0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| | | <0,01 | <0,01 | 1,0 | 0,51 | 0,16 | 0,07 ² | 0,021 | 0,010 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 |

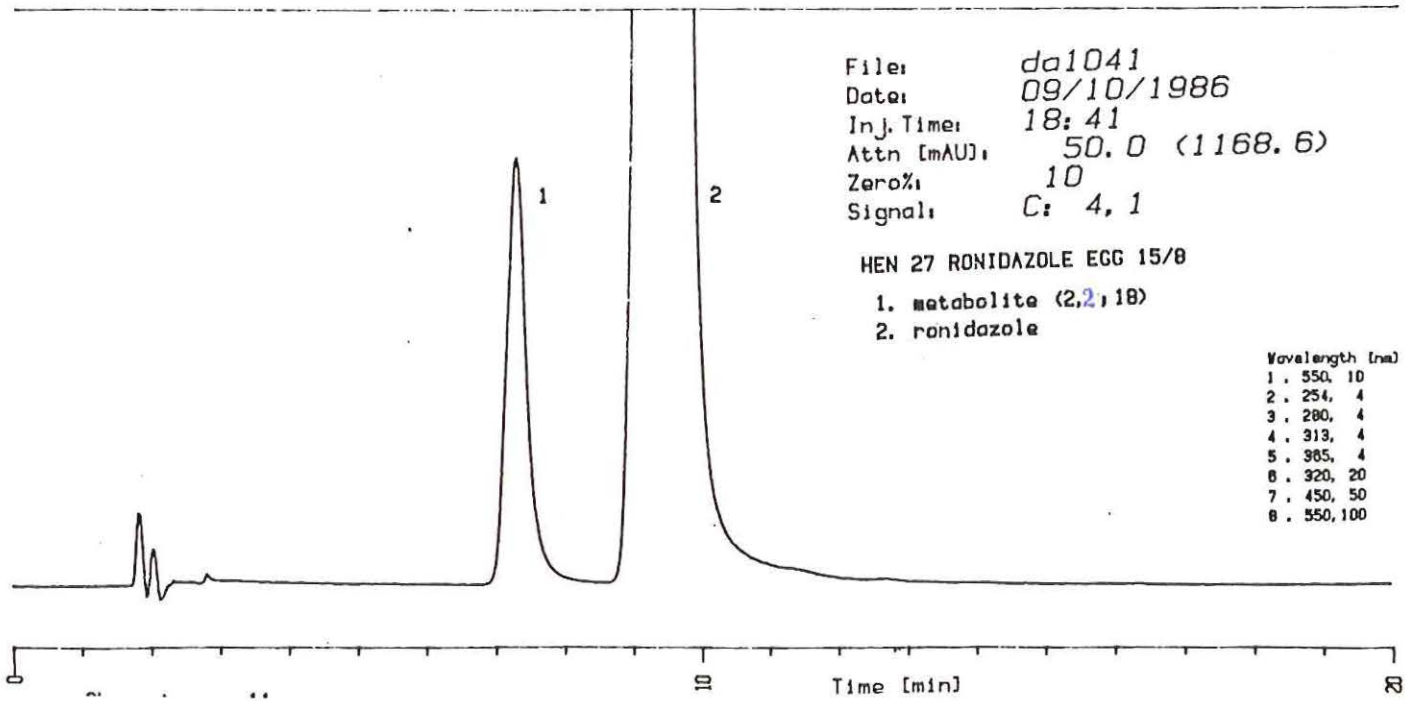
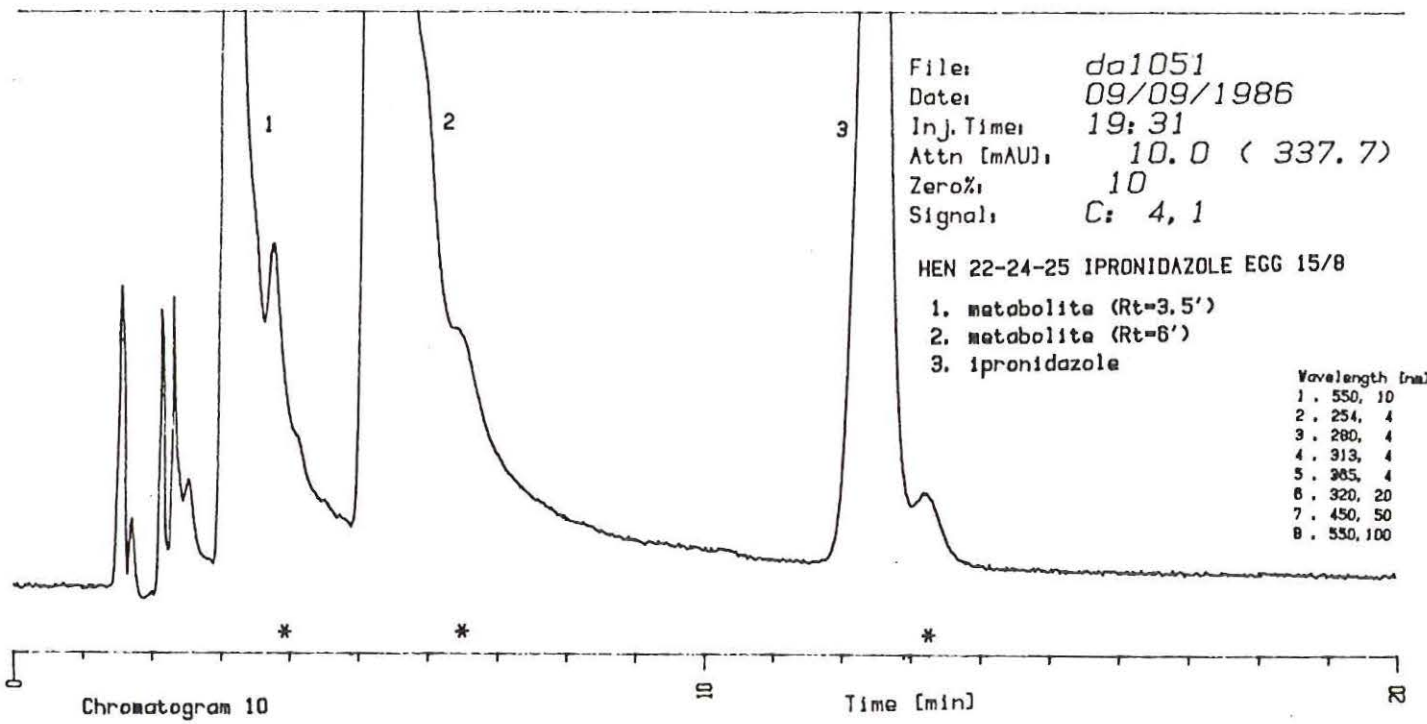
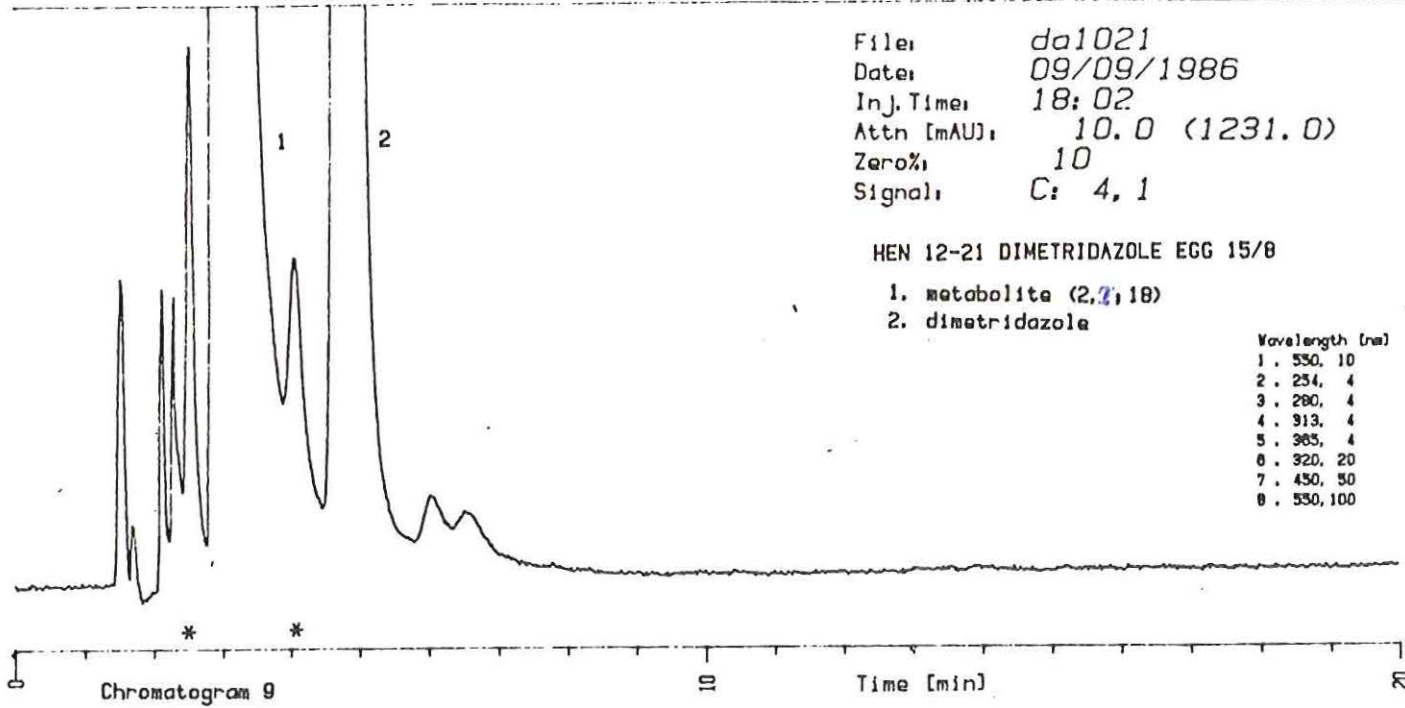
- Geen analyse uitgevoerd of geen ei aanwezig

* Gehalten in mg/kg heel-ei, waarbij gecorrigeerd is voor de bij recovery (3.5)
genoemde recoveries

** Gehalten, berekend m.b.v. standaardoplossingen van ipronidazol

EGG CONCENTRATION





Tabel 12. Gehalten eiwit/eigeel*

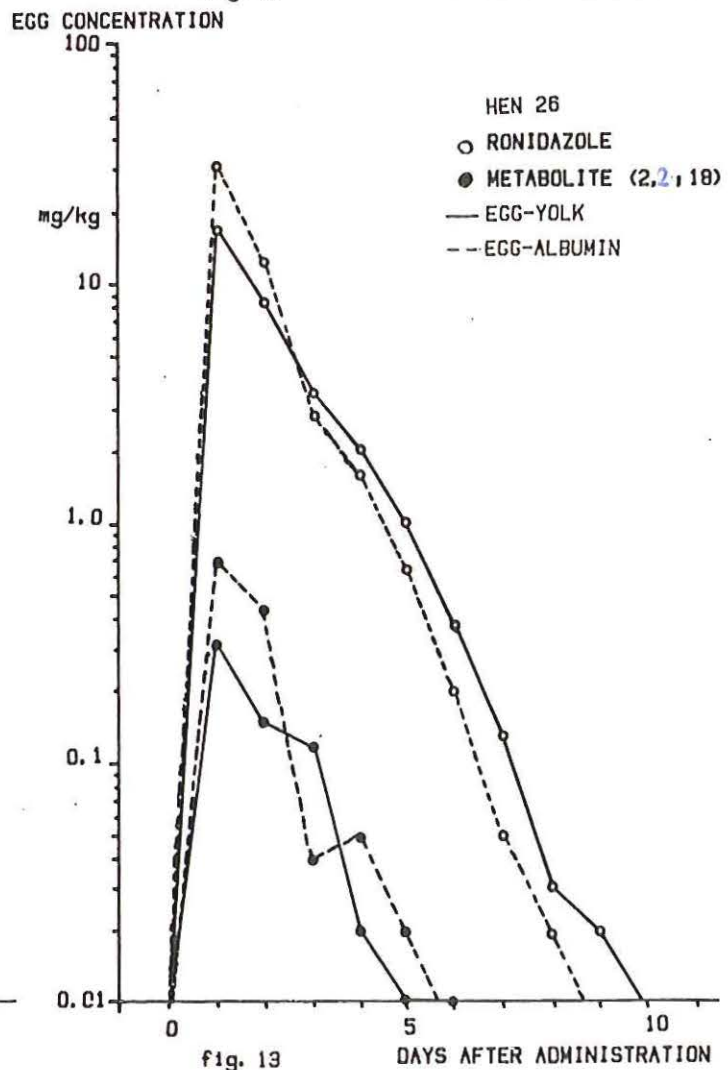
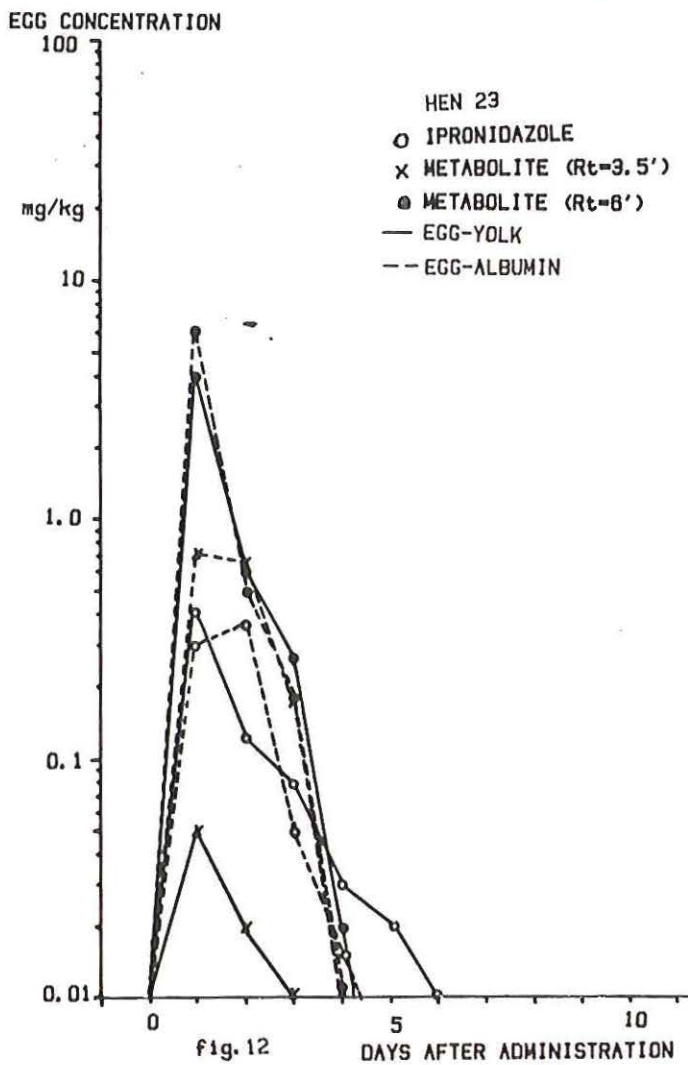
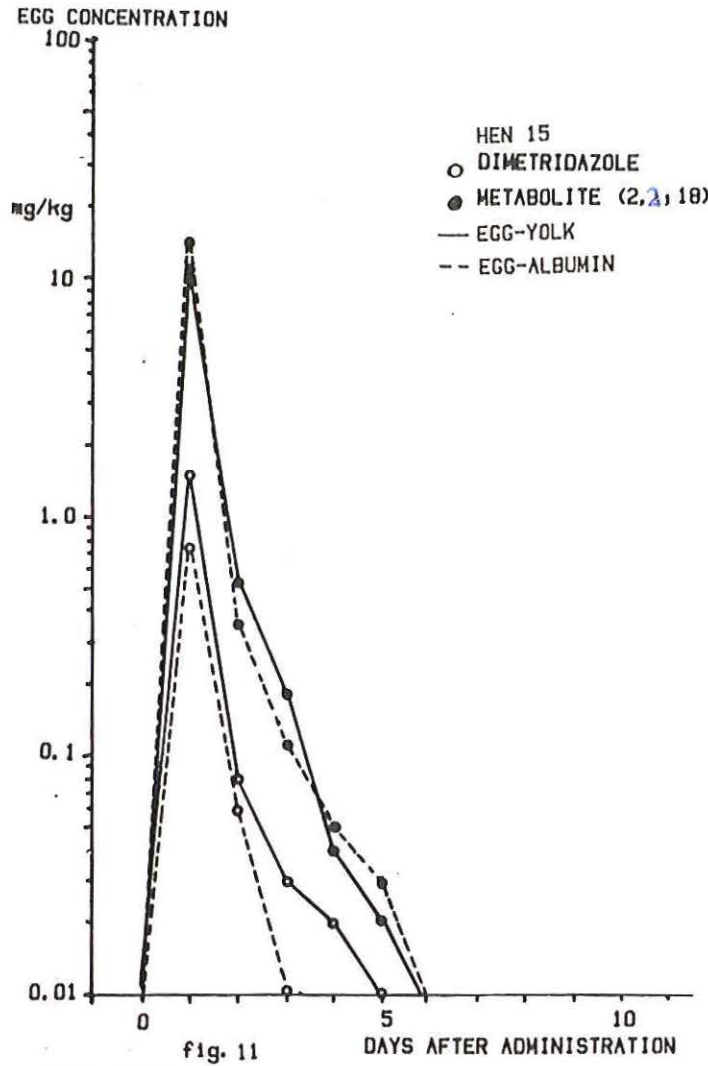
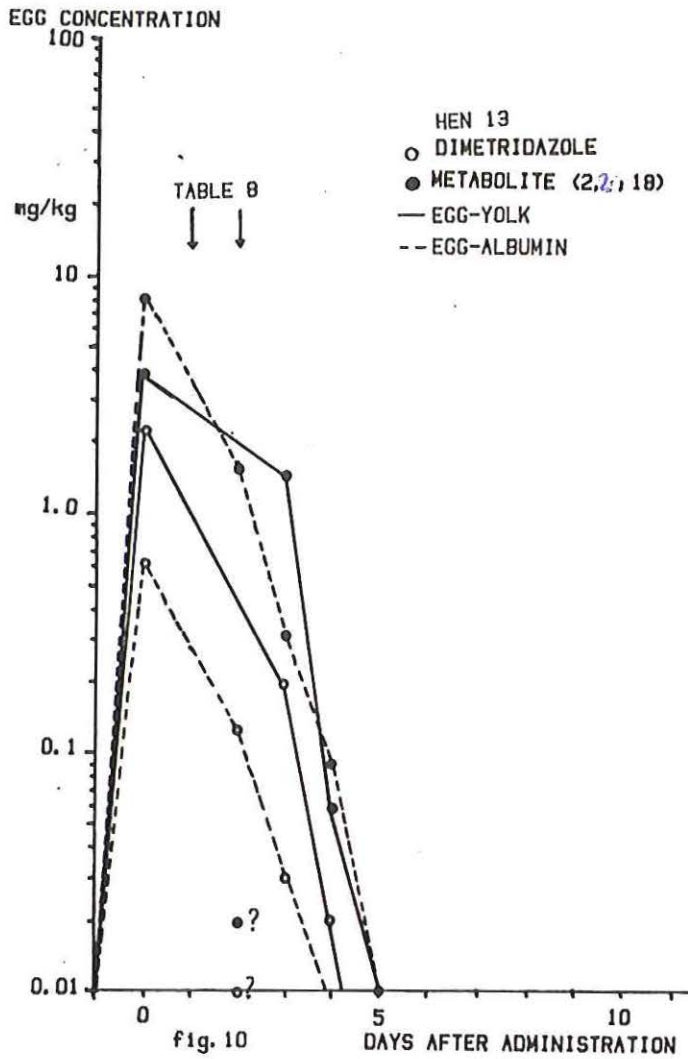
| Kip nr. | Verbinding | Matrix | Datum/dag | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | 13/8 -1 | 14/8 0 | 15/8 1 | 16/8 2 | 17/8 3 | 18/8 4 | 19/8 5 | 20/8 6 | 21/8 7 | 22/8 8 | 23/8 9 | 24/8 10 | 25/8 11 | 26/8 12 | 27/8 13 | 28/8 14 |
| 13 | dimetridazol | eiwit | <0,01 | 0,63 | - | 0,13 | 0,031 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | metaboliët | eiwit | <0,01 | 8,2 | - | 1,6 | 0,32 | 0,090 | 0,012 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | dimetridazol | eigeel | <0,01 | 2,5 | - | <0,01? | 0,20 | 0,020 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | metaboliët | eigeel | <0,01 | 3,9 | - | 0,022? | 1,5 | 0,059 | 0,012 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | - | |
| 15 | dimetridazol | eiwit | - | <0,01 | 0,76 | 0,061 | 0,013 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | metaboliët | eiwit | - | <0,01 | 14,4 | 0,36 | 0,12 | 0,051 | 0,031 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | dimetridazol | eigeel | - | <0,01 | 1,5 | 0,078 | 0,032 | 0,019 | 0,013 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | metaboliët | eigeel | - | <0,01 | 10,8 | 0,53 | 0,18 | 0,042 | 0,019 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| 23 | ipronidazol | eiwit | <0,01 | <0,01 | 0,30 | 0,38 | 0,048 | 0,015 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | metaboliët | eiwit | <0,01 | <0,01 | 0,72 | 0,69 | 0,017 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | Rt=3,5'* | metaboliët | eiwit | <0,01 | <0,01 | 6,2 | 0,49 | 0,18 | 0,011 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | Rt=6' | ipronidazol | eigeel | <0,01 | <0,01 | 0,42 | 0,12 | 0,080 | 0,029 | 0,020 | 0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | |
| | metaboliët | eigeel | <0,01 | <0,01 | 0,050 | 0,021 | 0,011 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | - | |
| | Rt=6' | metaboliët | eigeel | <0,01 | <0,01 | 4,0 | 0,58 | 0,27 | 0,020 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | - | - | - | |
| 26 | ronidazol | eiwit | <0,01 | <0,01 | 31,0 | 12,5 | 2,8 | 1,6 | 0,64 | 0,20 | 0,049 | 0,013 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | |
| | metaboliët | eiwit | <0,01 | <0,01 | 0,70 | 0,45 | 0,041 | 0,049 | 0,022 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | |
| | ronidazol | eigeel | <0,01 | <0,01 | 17,0 | 8,5 | 3,6 | 2,1 | 1,0 | 0,38 | 0,13 | 0,030 | 0,018 | <0,01 | <0,01 | - | - | |
| | metaboliët | eigeel | <0,01 | <0,01 | 0,32 | 0,15 | 0,12 | 0,020 | 0,010 | 0,010 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | <0,01 | - | - | |

- geen ei aanwezig of geen analyse uitgevoerd

? Waarschijnlijk a.g.v. onvolledige extractie te lage waarde; geen eigeel meer voorhanden om de analyse nog eens uit te voeren

* Gehalten in mg/kg eiwit of eigeel, waarbij gecorrigeerd is voor de bij de methodenontwikkeling eigeel/eiwit (4.) genoemde recoveries

** Gehalten berekend m.b.v. standaardoplossingen van ipronidazol



Tabel 13. Gehalten mestmonsters*

| Kip nr. | Verbinding | Glucoronidase | Tijd na verzamelen mest na toediening nitro-imidazol | | | | | |
|---------|--------------------------------------|---------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | 15/8;9.00 1 dag | 15/8;15.30 1,5 dag | 16/8;15.30 2,5 dag | 17/8;15.30 3,5 dag | 18/8;15.30 4,5 dag | 19/8;15.30 5,5 dag |
| 13 | dimetridazol | -- | 40 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | metaboliet | -- | 246 | 2,9 | 3,3 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | dimetridazol | + | 103 | - | < 1 | - | - | - |
| | metaboliet | + | 375 | - | 5,4 | - | - | - |
| 15 | dimetridazol | -- | 21 | 5,3 | 2,4 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | metaboliet | -- | 120 | 44 | 5,4 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | dimetridazol | + | 49 | - | 5,1 | - | - | - |
| | metaboliet | + | 272 | - | 11 | - | - | - |
| 18 | ipronidazol | -- | 6,9 | 23 | 2,8 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | metaboliet Rt=3,5 min** | -- | 7,0 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | metaboliet Rt=6 min** | -- | 175 | 406 | 23 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | metaboliet Rt=13 min** | -- | 8,6 | 8,0 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | ipronidazol | + | 8,2 | - | 3,2 | - | - | - |
| | metaboliet Rt=3,5 min** | + | 6,7 | < 1 | < 1 | - | - | - |
| | metaboliet Rt=6 min** | + | 271 | - | 31 | - | - | - |
| | metaboliet Rt=13 min** | + | 7,9 | - | < 1 | - | - | - |
| 20 | ronidazol | -- | 306 | 221 | 29 | 4,2 | 1,7 | 1,8 |
| | metaboliet | -- | 3,2 | 3,3 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | metaboliet ¹ Rt=11 min*** | -- | 1,4 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| | ronidazol | + | 304 | - | 27 | - | - | 1,0 |
| | metaboliet | + | 4,0 | - | < 1 | - | - | - |
| | metaboliet ¹ Rt=11 min*** | + | 1,9 | - | < 1 | - | - | - |

- Niet geanalyseerd met glucuronidase.

-- Gehaltebepaling zonder voorbehandeling met sulfatase/glucuronidase

+ Gehaltebepaling met voorbehandeling met sulfatase/glucuronidase

* Gehalten in mg/kg mest, waarbij gecorrigeerd is voor de bij methodenontwikkeling faeces (6.) genoemde recoveries

** Gehalten berekend m.b.v. standaardoplossingen van ipronidazol

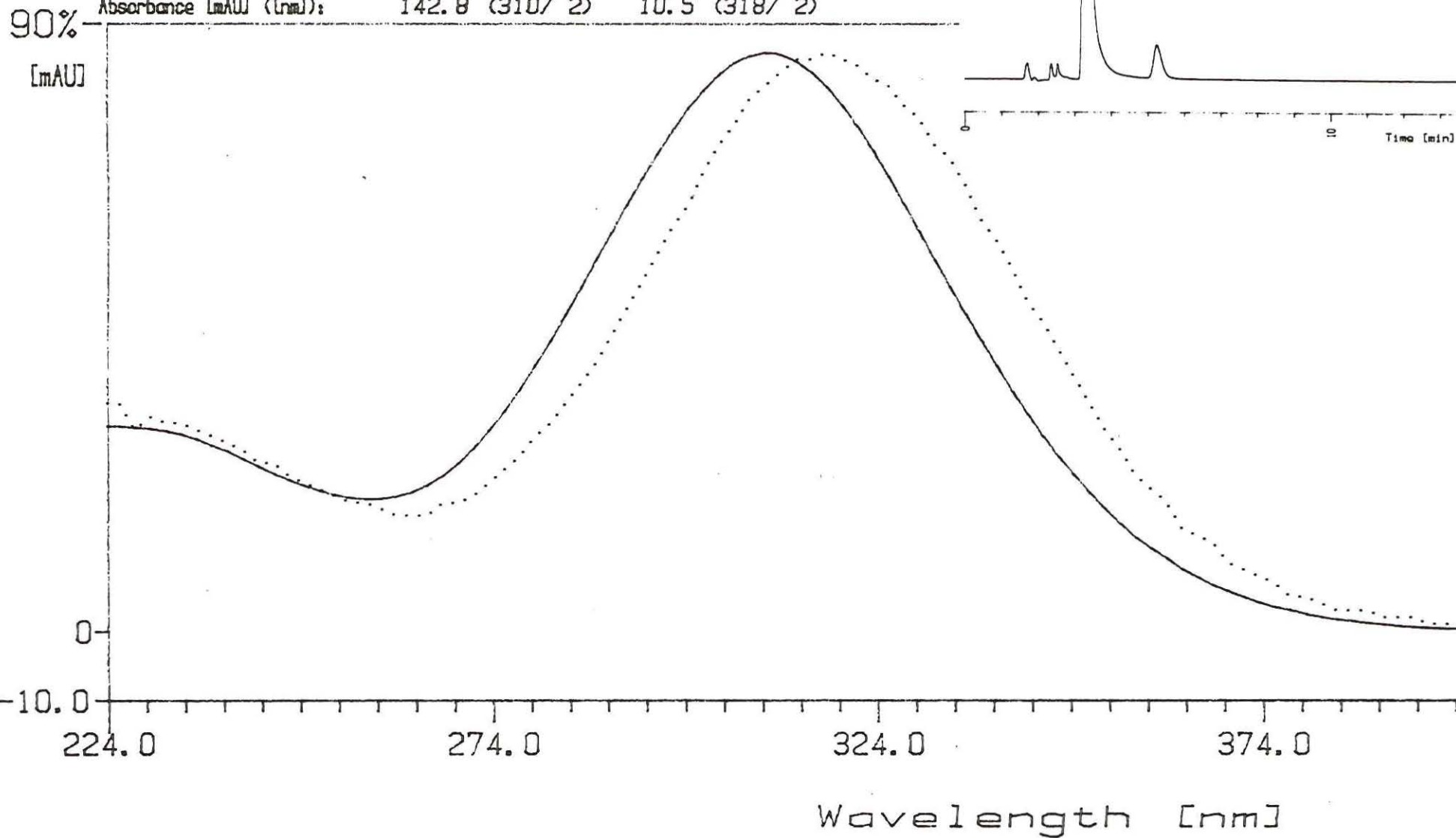
*** als **, maar nu ronidazol

ANALYSE FAECES DIMETRIDAZOLE

| | | |
|--------------------------|----------------------|---------------|
| Component: | METABOLITE (2,2; 18) | DIMETRIDAZOLE |
| Date: | 10/02/1986 | 10/02/1986 |
| Spectrum [min]: | 3.2453 | 5.2408 |
| Reference [min]: | 4.4517 | 6.0293 |
| Attn [mAU]: | 166.6 | 12.2 |
| Absorbance [mAU] ([nm]): | 142.8 (310/ 2) | 10.5 (318/ 2) |

| | |
|-------------|----------------|
| File: | da1061 |
| Date: | 12/31/1899 |
| Inj. Time: | 07:05 |
| Attn [mAU]: | 100.0 (141.3) |
| Zero%: | 10 |
| Signal: | C: 4, 1 |

| |
|-----------------|
| Wavelength [nm] |
| 1. 330. 10 |
| 2. 334. 4 |
| 3. 338. 4 |
| 4. 342. 4 |
| 5. 346. 4 |
| 6. 350. 20 |
| 7. 354. 20 |
| 8. 358. 10 |

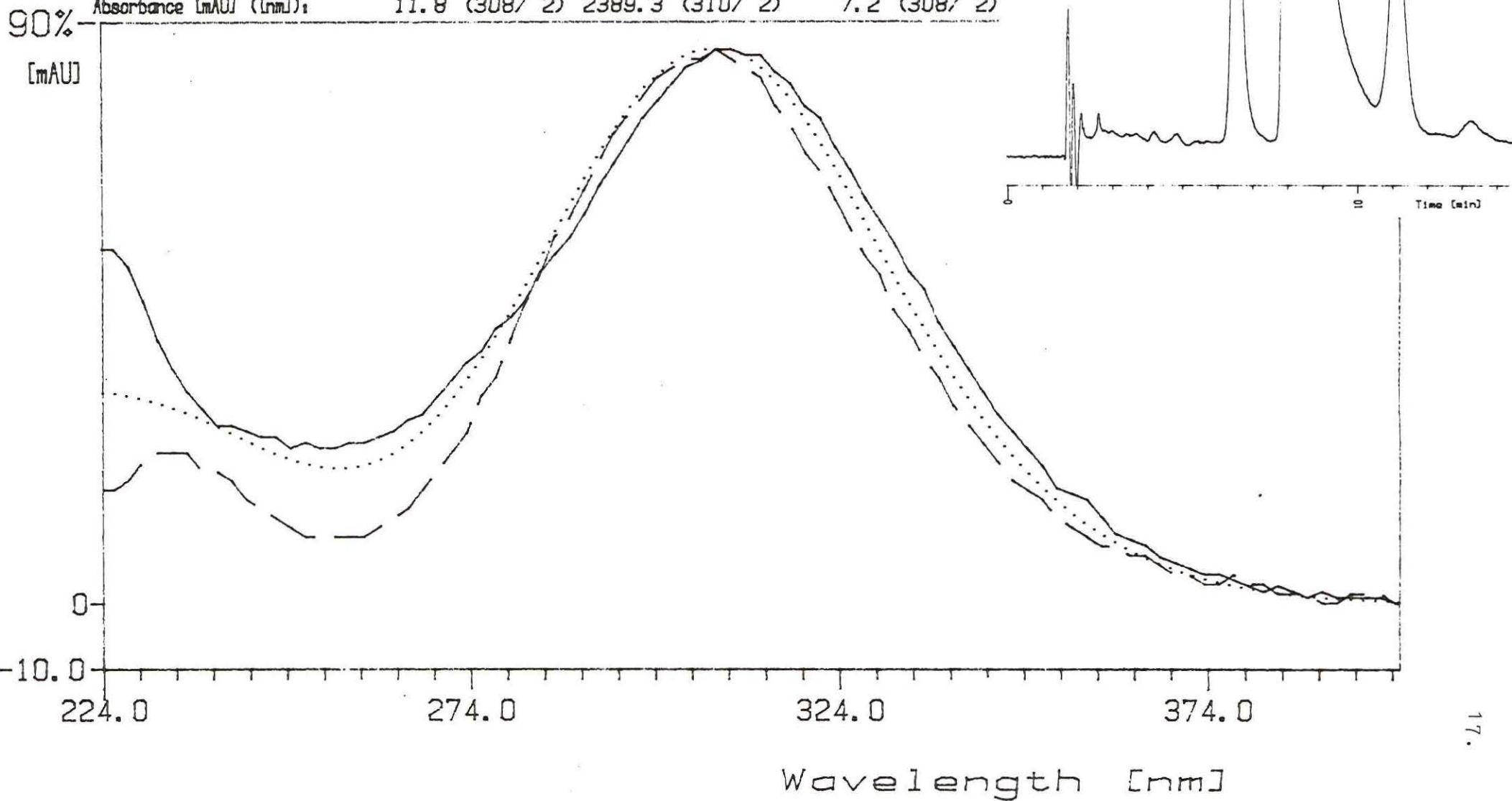


ANALYSE FAECES RONIDAZOLE

File: da1021
 Date: 10/01/1986
 Inj. Time: 10:23
 Attn [mAU]: 10.0 (2332.9)
 Zero: 10
 Signal: C: 4, 1

Component: METABOLITE (2.2; 18) RONIDAZOLE METABOLITE (Rt=11')

| | 10/01/1986 | 10/01/1986 | 10/01/1986 |
|--------------------------|---------------|-----------------|--------------|
| Date: | 10/01/1986 | 10/01/1986 | 10/01/1986 |
| Spectrum [min]: | 6.5398 | 8.3148 | 11.1277 |
| Reference [min]: | 7.2793 | 9.7692 | 12.1603 |
| Attn [mAU]: | 13.8 | 2787.5 | 8.4 |
| Absorbance [mAU] ([nm]): | 11.8 (308/ 2) | 2389.3 (310/ 2) | 7.2 (308/ 2) |

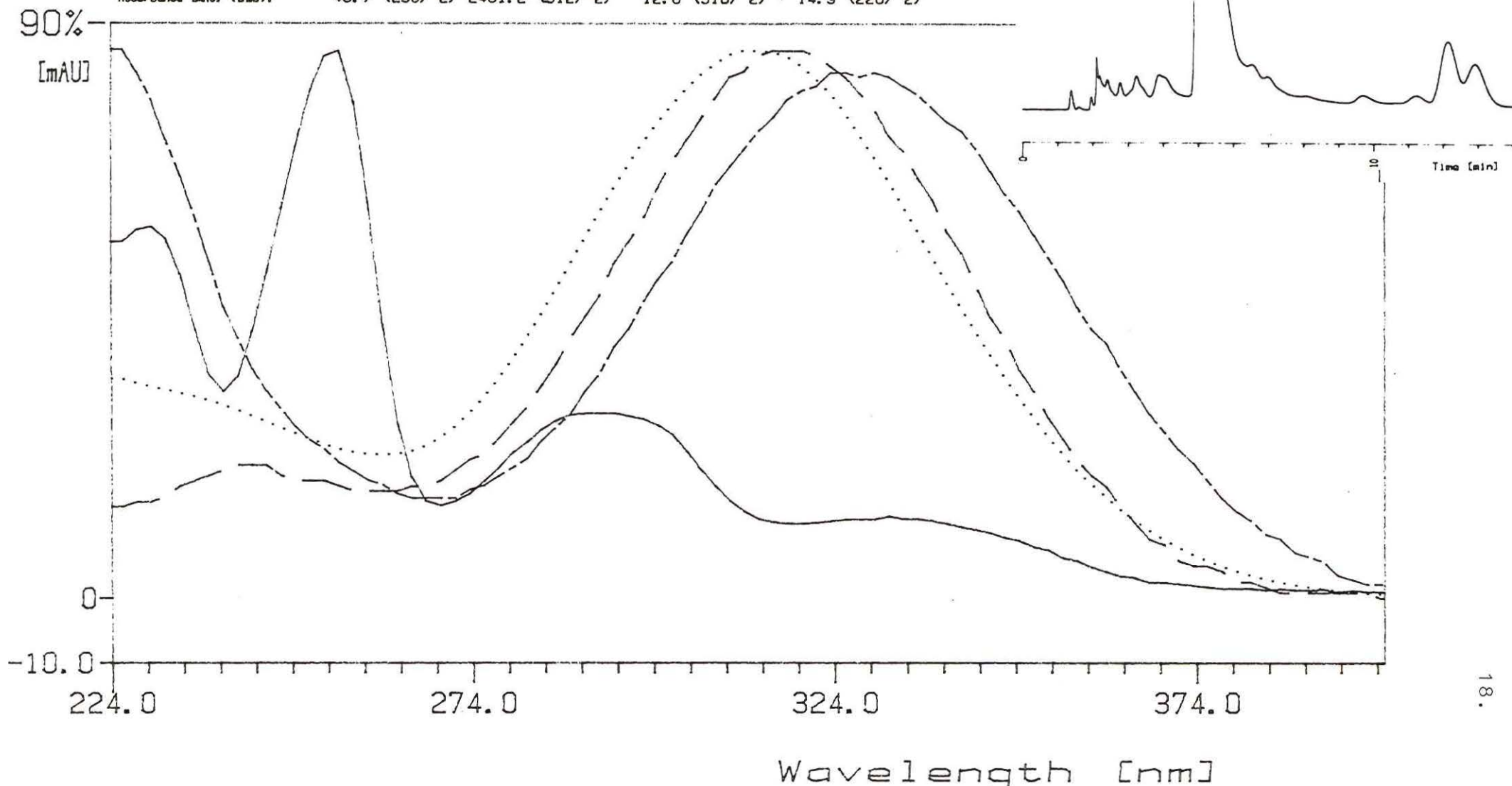


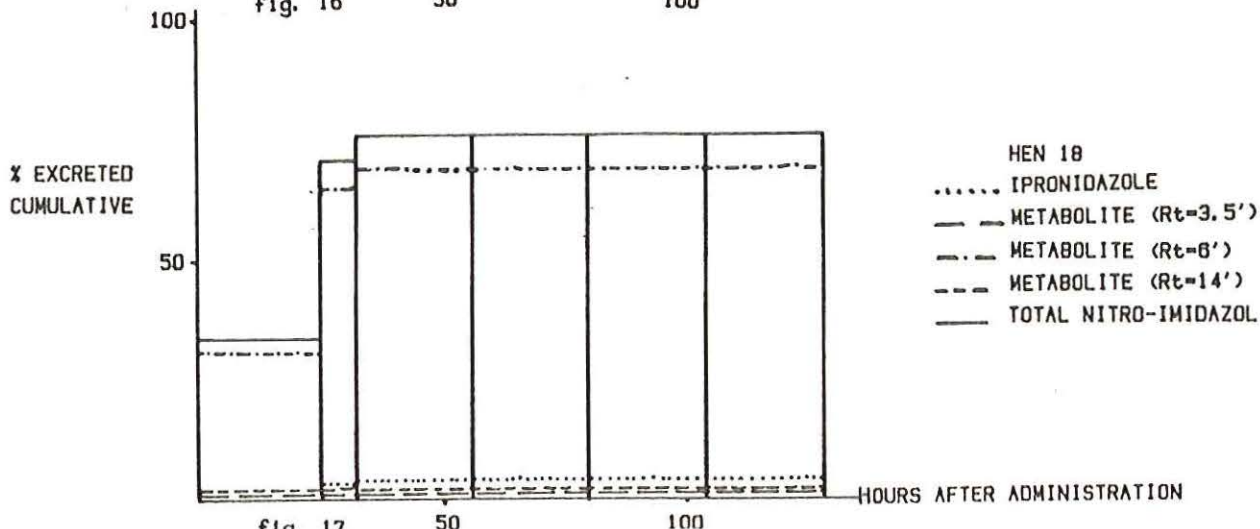
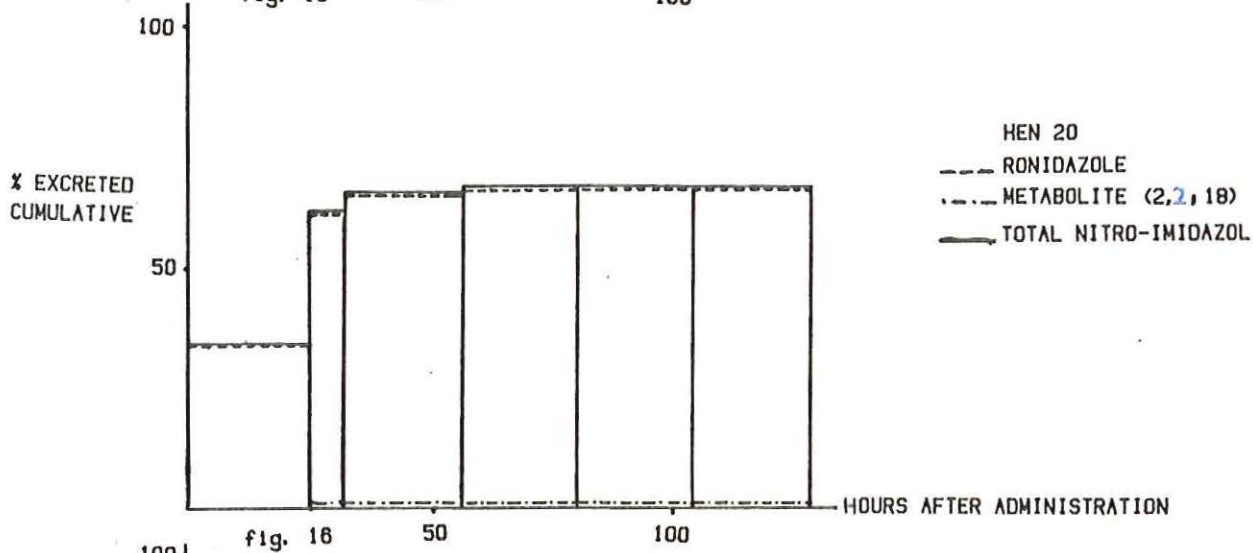
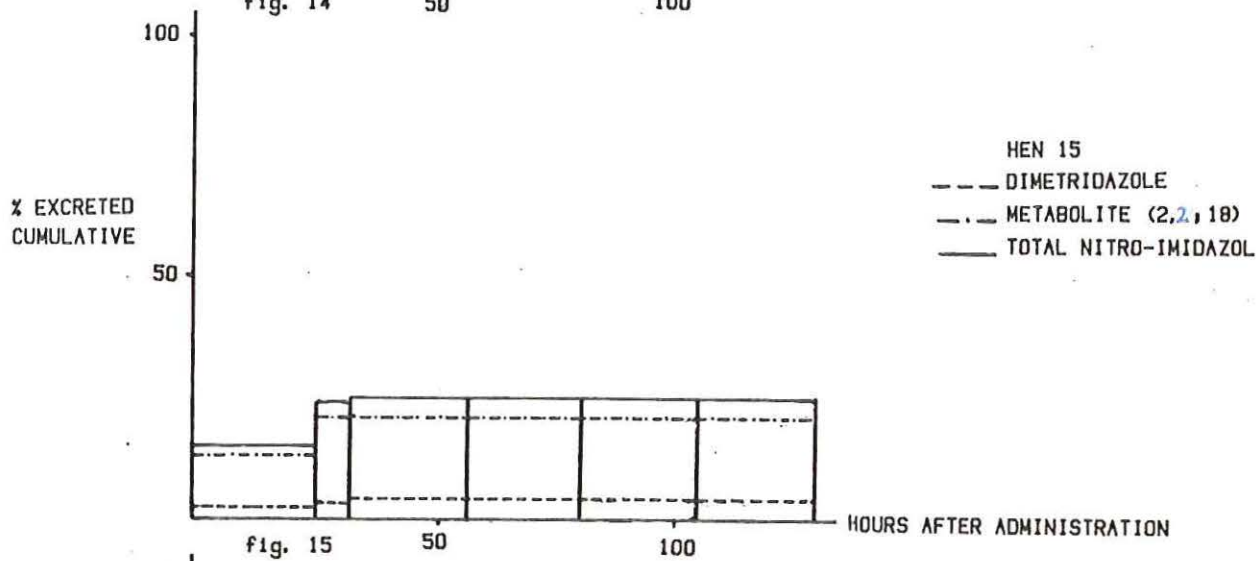
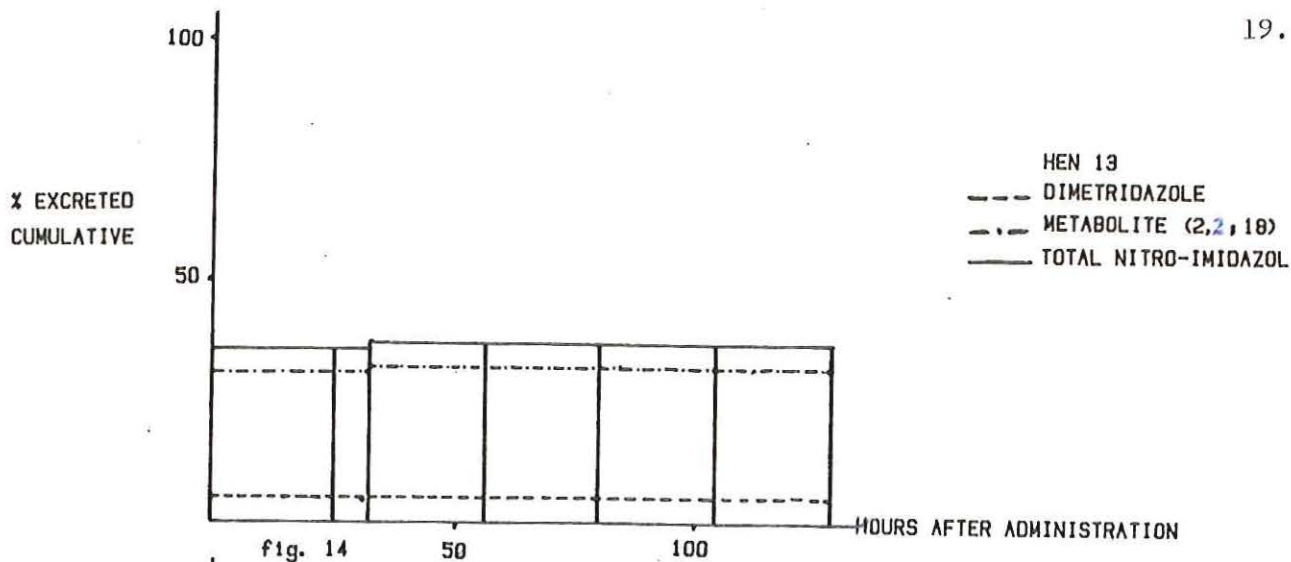
File: d81011
 Date: 10/10/1986
 Inj. Time: 15:26
 Attn [mAU]: 100.0 (2474.5)
 Zero: 10
 Signal: C: 4, 1

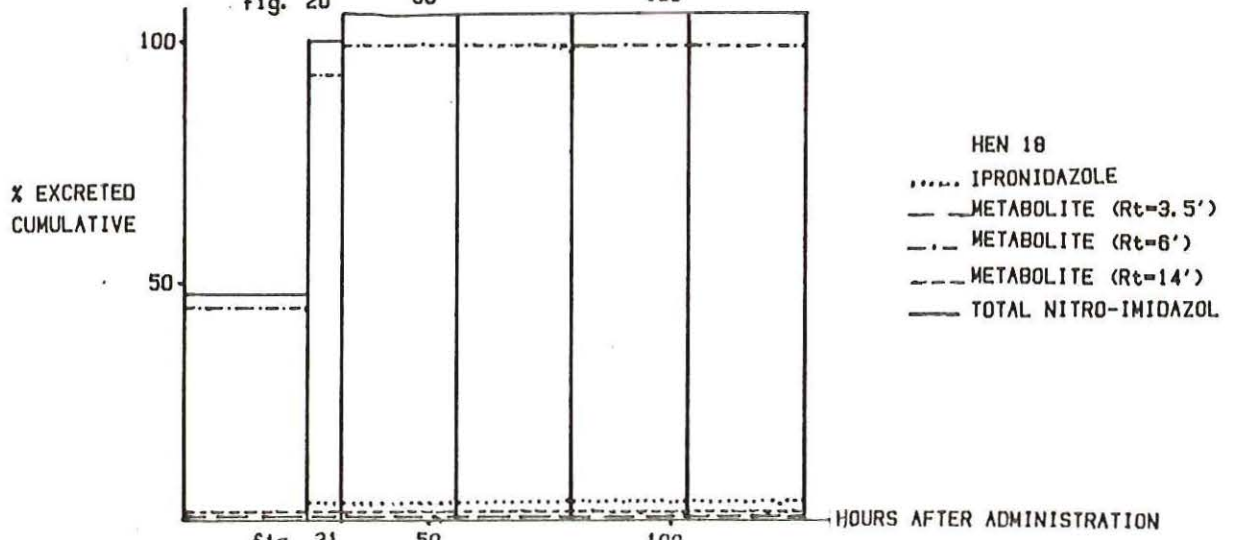
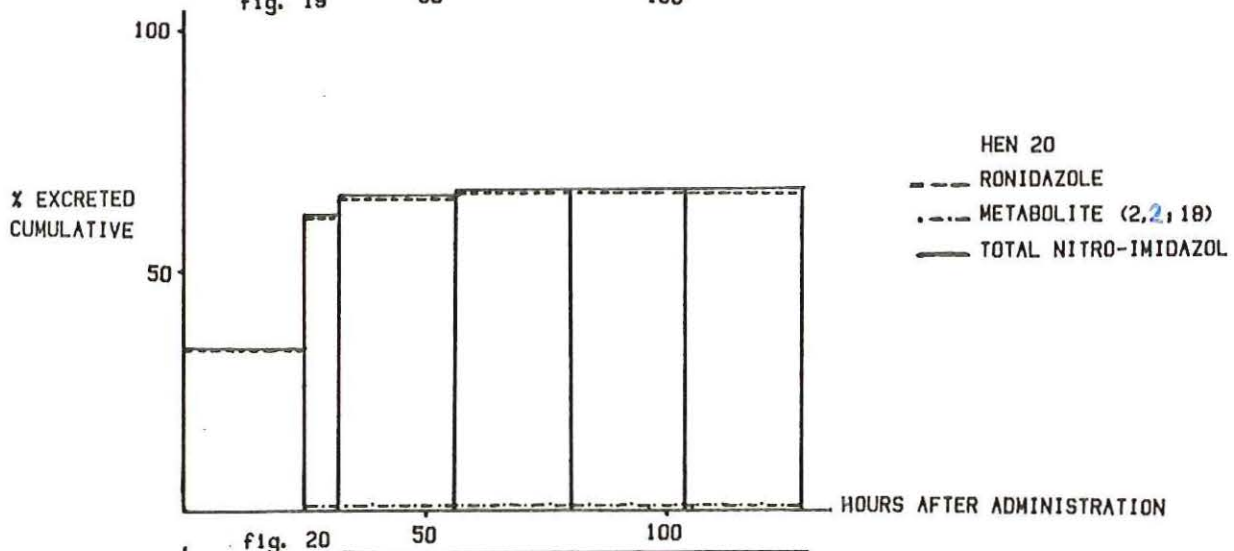
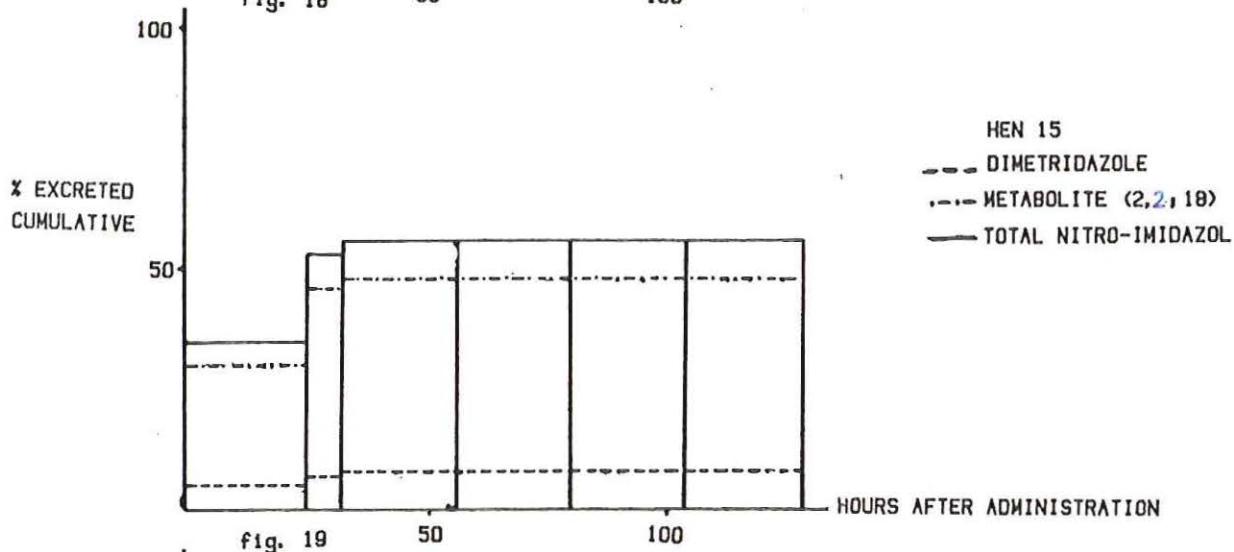
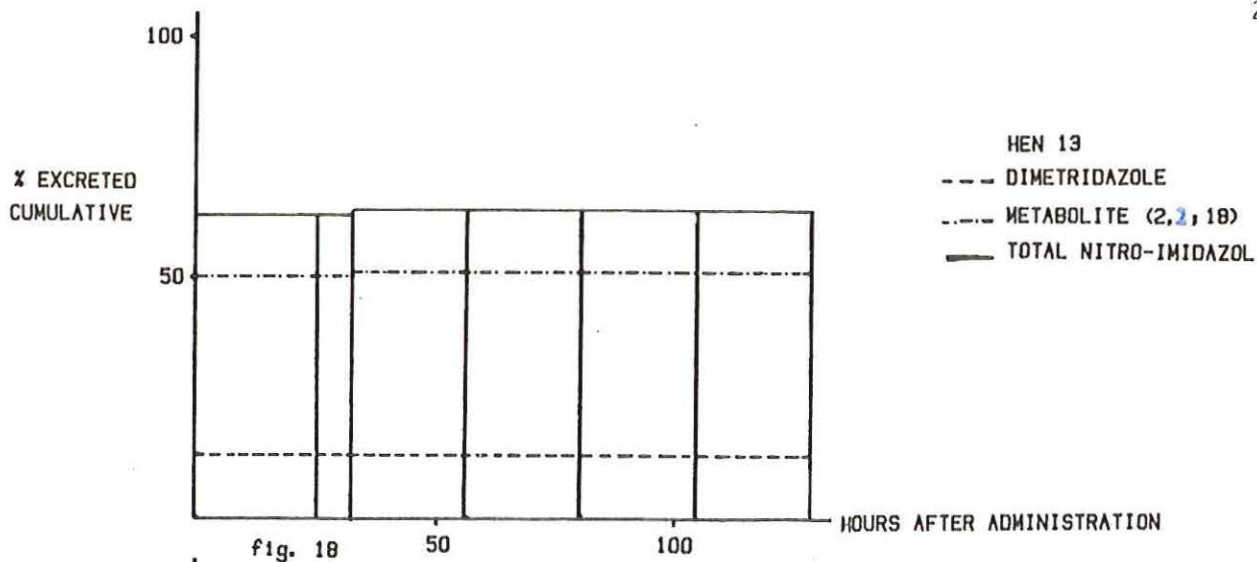
Wavelength
 1. 224.0
 2. 234.0
 3. 244.0
 4. 254.0
 5. 264.0
 6. 274.0
 7. 284.0
 8. 294.0

ANALYSE FAECES IPRONIDAZOLE

| Component: | METABOLITE (Rt=4') | METABOLITE (Rt=6') | IPRONIDAZOLE | METABOLITE (Rt=13') |
|------------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------------|
| Date: | 13/10/1986 | 10/10/1986 | 10/10/1986 | 10/10/1986 |
| Spectrum [min]: | 3.8865 | 6.0653 | 12.1290 | 12.8958 |
| Reference [min]: | 4.7068 | 6.8953 | 12.5645 | 13.9458 |
| Attn [mAU]: | 51.0 | 2871.4 | 14.7 | 17.4 |
| Absorbance [mAU] (nm): | 43.7 (256/ 2) | 2461.2 (312/ 2) | 12.6 (316/ 2) | 14.9 (226/ 2) |







MASS SPECTRUM
10/16/86 12:33:00 + 3:01
SAMPLE: METABOLITE (Rt=6') IPRONIDAZOLE
CONDS.: FLOW INJ., TEMP: 300 C, CAP: FUSED SILICA 50 UM I.O.

DATA: JPC30 #181
CALI: CAL2 #1

BASE M/Z: 186
RIC: 983160.

