

Afdeling Diergeneesmiddelen 1985-05-06
RAPPORT 85.37 Pr.nr. 404.0850
Onderwerp: Bepaling van dapson, mono- en
diacetyldapson in runderbloed-
plasma.

Bijlagen: 8.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling DGM,
medewerkers, projektleider, projektbeheer, circulatie.

Projekt: Farmacokinetisch en toxicologisch onderzoek van dapson toegediend aan melkgevende runderen

Onderwerp: Bepaling van dapson, mono- en diacetyldapson in runderbloedplasma.

Bijlagen: 8.

Doel:

Het testen van de bepalingsmethoden voor dapson, mono- en diacetyldapson in bloedplasma van melkgevende runderen en het vaststellen van het kinetisch profiel van genoemde stoffen na orale en intramusculaire toediening.

Tevens wordt deglucuronidering en eiwitbinding onderzocht.

Samenvatting:

Na een acclimatiseringsperiode van zeven dagen kregen twee runderen gedurende drie achtereenvolgende dagen 1 x daags dapson toegediend, oraal respectievelijk intramusculair.

De analyse in bloedplasma van zowel het totale als ook het eiwitgebonden materiaal werd uitgevoerd met behulp van isocratisch "reversed phase" HPLC met UV-detektie bij 292 nm.

Deglucuronidering werd, na incubatie met het enzym sulfatase/glucuronidase, bekeken via eenzelfde werkwijze.

Conclusie:

De ontwikkelde methode voor de dapson en acetylmetabolieten bepaling in bloedplasma voldoet.

Het concentratieniveau van DDS respectievelijk MADDs is bij de orale toedieningsvorm, $3 \frac{1}{3}$ respectievelijk $4 \frac{1}{2}$ dag na de laatste medicatie gedaald tot 0,2 ppm. Bij een intramusculaire behandeling worden na 6 dagen nog gehalten van 0,3 ppm DDS en 0,6 ppm MADDs aangetroffen. Eiwitbinding bedraagt meer dan 99%, glucuronides en sulfaten werden niet aangetoond.

Verantwoordelijk : drs M.M.L. Aerts AB
Medewerker/samensteller: M.J.B. de Reuver MR
Projectleider : drs M.M.L. Aerts/dr ir H.A. Kuiper deAK

1. Introductie

1.1 Toepassingsgebied

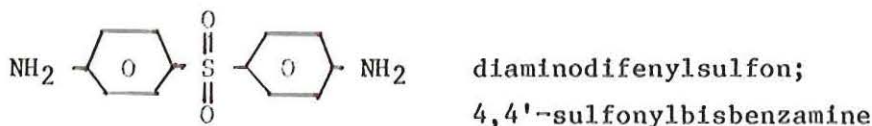
Dapson heeft een effectief bacteriostatische werking tegen een groot aantal gram-positieve en gram-negatieve bacteriën. Rond 1910 werd dapson in de humane en rond 1940 in de veterinaire geneeskunde geïntroduceerd.

In de humane geneeskunde wordt dapson voorgeschreven ter bestrijding van lepra en tuberculose, echter in combinatie met andere preparaten (pyrimethamine) ook ter bestrijding van malaria.

In de veterinaire geneeskunde is dapson, zonder tussenkomst van een dierenarts, vrij in de handel te verkrijgen. Opschriften vermelden dat de stof een positief effect heeft op de meeste acute infecties, toch wordt dapson slechts gebruikt bij de behandeling van tussenklauwontsteking, mastitis (uierontsteking), baarmoederontsteking en longontsteking.

1.2 Chemische en fysische eigenschappen

Strukturformule dapson:



Molecuulformule: $C_{12}H_{12}N_2SO_2$

Molecuulgewicht: 248,31

Smelttraject : 175-181°C

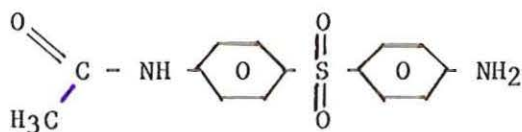
Het witte poeder is goed oplosbaar in acetonitril, ethylacetaat en methanol; matig in water en slecht in hexaan.

Dapson behoort tot de groep sulfonen en komt tevens onder de volgende benamingen voor: DDS, DADPS, diafenylsulfon, disulone en sulfonyldiamine.

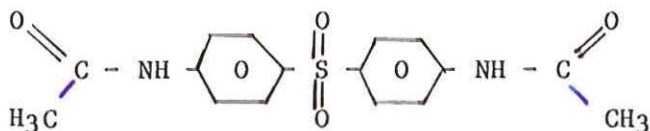
Handelsnamen: Dapsone, Bovisone, Sandisone, Medisone, Infeksone, Panex, Biomasto, Hapol, Steron, Bosona, Medicanen en Holydap.

Dapson (DDS) kan gezien de enzymatische omzettingmogelijkheden geacetyleerd worden tot mono-acetyldapson (MADDS) en diacetyldapson (DADDS). Tevens is de mogelijkheid aanwezig dat DADDS gehydrolyseerd wordt tot MADDS en DDS.

Strukturformules van de metabolieten:



MADDs, een rose-bruin poeder met korrelige structuur



DADDs, een wit amorf poeder

1.3 Kinetiek

Afhankelijk van de toedieningswijze komt dapson al dan niet snel in de bloedbaan terecht. Intraveneuze toediening, (direkte injectie in de ader) zal een direkt hoge dapsonconcentratie in het bloed tot gevolg hebben. Bij orale, intramusculaire (injectie in de spier) en intramammaire (injectie in de uier) toediening zal de concentratie in het bloed langzaamaan toenemen als gevolg van het resorbtieproces.

Bij de mens wordt dapson in sterke mate omgezet in mono- en diacetylderivaten. Deze acetylering vindt in geval van orale toediening betrekkelijk snel plaats, binnen een tijdsbestek van 15 minuten. De snelheid van acetylering is afhankelijk van de activiteit van het N-acetyltransferase enzym, welke in de lever voorkomt.

De halfwaardetijd van dapson varieert sterk per diersoort: muis 2-4 uur, rat 6 uur en mens 14-53 uur. De relatief lange halfwaardetijd bij de mens kan mogelijk verklaard worden door het feit dat dapson en monoacetyldapson zeer sterk aan plasma-eiwitten binden (75 resp. 100%).

Een inleidend onderzoek van het Proefstation voor de Rundveehouderij (PR) in Lelystad en de Keuringsdienst van Waren in Utrecht, met melkgevende runderen, heeft uitgewezen dat de excretiesnelheid van dapson en acetylmetabolieten via de melk, zeer sterk afhankelijk is van de toedieningswijze.

Zo wordt bij orale toediening, vier dagen nadat de medicatie heeft plaatsgevonden, een residu-niveau van 0,1 ppm aan DDS en MADDs bereikt; bij intramammaire toediening wordt eenzelfde niveau reeds na twee dagen bereikt. Wordt echter intramusculaire medicatie toegepast dan blijkt er na zeven dagen nog een gehalte van 0,2 ppm te worden aangetroffen.

1.4 Toxiciteit, carcinogeniteit en mutageniteit

Zoals bijna alle geneesmiddelen, heeft ook dapson een aantal nevenwerkingen.

Bij de mens zijn dit o.a. - hemolytische anemie

- gastro-intestinale symptomen
- neurologische verschijnselen
- dermatologische verschijnselen

Via de moedermelk kan dapson getransporteerd worden naar zuigelingen, wat kan leiden tot hemolytische anemie bij het kind.

Chronisch gebruik kan resulteren in methemoglobinemie, waarschijnlijk als gevolg van de vorming van N-oxydatiemetabolieten (4). Methemoglobine is een bruinachtig oxidatieproduct van haemoglobine. Wanneer er te veel methemoglobine in het bloed aanwezig is, of wel, een tekort aan zuurstofdragend haemoglobine, dan kan dit resulteren in cyanose, een blauwachtige kleur van huid en slijmvliezen.

In vitro-onderzoek van hersenen en lever bij rat en muis (4) heeft aangetoond dat dapson de activiteit van de enzymen remt, welke betrokken zijn bij de aerobe omzetting van koolhydraten. Tevens wordt de anaerobe glycolyse in de hersenen van zowel muis als rat geremd; bij de rat vindt ook in het spierweefsel remming van genoemde glycolyse plaats.

Wat betreft carcinogeniteit van dapson voor de mens, zijn er te weinig gegevens bekend om hierover een juiste uitspraak te doen. Bij één van de drie uitgevoerde carcinogeniteitsexperimenten met ratten echter, bleken er tumoren voor te kunnen komen in voornamelijk milt, schildklier en buikvlies.

Mutageniteitstesten hebben uitgewezen dat dapson zelf niet mutageen is, enkele analoge, zoals sulfoxide en sulfide-verbindingen, daarentegen blijken na metabole aktivering wel mutageniteit te vertonen.

2. Probleemstelling

Daar dapson intensief gebruikt wordt bij melkgevende runderen, is het van belang om het farmacokinetisch gedrag van de stof in deze doeldieren te onderzoeken. Dit in verband met het vaststellen van een wachperiode. Het experiment zal bestaan uit een voor- en een hoofdproef. De voorproef dient voor het ontwikkelen en testen van een analysemethode voor dapson en de acetylmethylmetabolieten.

Bovendien wordt een kwantitatief excretiepatroon vastgelegd. De hoofdproef, welke medio april 1985 van start zal gaan, zal uitwijzen welke medicatiemethode het meest geschikt is en tevens zal hieruit, in combinatie met toxiciteitsgegevens, een veilige wachttijd worden vastgesteld.

3. Methoden

3.1 Dierproef

Aan twee runderen, werd na een acclimatiseringsperiode van ca. 7 dagen, oraal en intramusculair dapson toegediend. Toediening van de preparaten heeft drie opeenvolgende dagen, éénmaal daags, plaatsgevonden (oraal: 50 g per 500 kg lichaamsgewicht; intramusculair: 33 1/3 g per 500 kg lichaamsgewicht).

De dieren werden zowel tijdens de acclimatiseringsperiode als ook tijdens en na de medicatieperiode, gevoerd met voer, vrij van antibiotica en chemotherapeutica.

Gedurende de laatste twee dagen van de acclimatiseringsperiode werden tweemaal per dag bloedmonsters genomen. Op de eerste dag van medicatie vond bemonstering plaats op de tijdstippen 1/2, 1, 2, 4 en 7 uur na toediening, op de tweede en derde dag geschiedde dit 0, 1, 2, 4 en 7 uur na toediening.

Om een volledig kinetisch profiel te verkrijgen werd er tot tien dagen na de eerste medicatie doorgegaan met tweemaal daags bemonstering en vervolgens van de 11e t/m 18e dag éénmaal daags.

Het bloed, ca. 10 ml, werd opgevangen in heparine-bevattende buizen. Tevens werd ca. 10 ml opgevangen in buizen zonder heparine. Centrifugerende van beide oplossingen levert in het eerste geval bloedplasma en in het tweede geval serum.

3.2 Chemisch onderzoek

De bepaling van DDS, MADDS en DADDS in bloedplasma werd uitgevoerd volgens het voorschrift opgenomen in bijlage 8.

Het principe van de bepaling berust op vloeistof-vloeistof extractie op een extrelutkolom, waarna analyse plaats vindt met behulp van isocratische "reversed phase" HPLC met UV detectie bij 292 nm.

Zowel de totale hoeveelheid aan DDS, MADDS en DADDS werd bepaald, als ook de hoeveelheid niet-eiwitgebonden (vrij) in het plasma aanwezig. Eiwitvrij monstermateriaal werd verkregen na centrifugatie in een ultrafiltratie unit. Deze unit bevat een membraan waar de macromoleculen - en dus ook het eiwitgebonden materiaal - niet doorheen kunnen penetreren.

Om het percentage glucuronide- en sulfaatmetabolieten te bepalen werd, alvorens het voorschrift in bijlage 8 te volgen, eerst gedurende drie uur bij 37°C geïncubeerd met het enzym glucuronidase/sulfatase, welk het eventueel gevormde metaboliet afbreekt tot vrije DDS en MADDS.

4. Bespreking

4.1 Dierproef

Eén van de dieren, degene welke het medicijn via orale toedieningswijze heeft gekregen, heeft op de derde dag van toediening een inwendige bloeding gehad.

Het is mogelijk dat hierdoor lagere concentraties in het bloedplasma gemeten zijn.

4.2 Lineariteit van de standaardreeksen

De grafische weergave van de lineariteit van de standaardreeksen DDS, MADDS en DADDS is te zien in figuur 5.

De ijklijnen blijken binnen het gebied van 0 tot 25 µg/ml lineair te verlopen. De concentraties van 257 µg/ml DDS, 140 µg/ml en 154 µg/ml DADDS bleken niet meer binnen de ijklijn te vallen (niet in figuur 5 zichtbaar).

Daar de concentraties aan dapson in bloedplasma niet boven de 30 ppm komen (figuur 1 en 2), kan men met de standaardreeks volstaan.

4.3 DDS, MADDS en DADDS in bloedplasma

De resultaten van de analyses in bloedplasma zijn weergegeven in de tabellen 1 en 3 (orale resp. intramusculaire toedieningswijze).

In de figuren 1 resp. 2 is hiervan het farmacokinetisch profiel zichtbaar gemaakt.

De concentraties DDS en MADDs in bloedplasma nemen duidelijk toe na nieuwe medicatie; zowel bij orale als intramusculaire toediening. Aangezien MADDs reeds in het eerste half uur na toediening al gevormd blijkt te zijn, mag men aannemen dat er sprake is van een snelle acetylering.

DADDs daarentegen wordt veel later gevormd in geval van orale medicatie (tabel 1); bij intramusculaire medicatie is de stof slechts één maal aangetoond (tabel 2).

De concentraties aan DADDs zijn dusdanig laag, dat de betrouwbaarheid van de gevonden gehalten klein is. Zou er intraveneus dapson toegediend worden, dan kan men verwachten dat de concentraties aan DDS, MADDs en daardoor ook DADDs in plasma hoger zijn. Deze resultaten zullen dan waarschijnlijk met grotere zekerheid weergegeven kunnen worden. Een maximum aan DDS en MADDs in bloedplasma wordt al snel bereikt (oraal: na ± 3 resp. ± 5 uur; intramusculair: na ± 1 resp. ± 3 uur), waarna een lineaire eliminatiefase duidelijk zichtbaar is. Het maximum van het MADDs-profiel komt echter, bij beide toedieningswijzen, iets later dan het maximum van het DDS-profiel (gemiddeld 2 uur). Oorzaak is enerzijds een snellere eliminatie van dapson en anderzijds loopt de vorming van mono-acetyldapson achter bij de resorptie van DDS.



+

andere DDS derivaten

In geval van orale medicatie zijn de concentraties aan dapson en metabolieten beduidend hoger dan in geval van intramusculaire medicatie. Komt de stof via orale weg het lichaam binnen dan komt het via het maagdarkanaal, haarvaten en poortader in de lever (hier worden de meeste metabolieten gevormd) en vervolgens in het bloedvatenstelsel; wordt er in de spier geïnjecteerd, dan komt het via de weefsels en het lymfevatstelsel in het bloedvatenstelsel terecht. Het laatst genoemde is een langzamer proces.

Een mogelijke verklaring voor het lagere concentratieniveau welke verkregen wordt bij intramusculaire toediening, is depotvorming. Dapson blijft lang in het spierweefsel (het resorbtieproces is langzaam), waardoor de concentratie in bloed langzaam toeneemt. Daar tevens de eliminatie begint zodra het bloed éénmaal de lever heeft gepasseerd, blijft de concentratie laag. Op langere termijn zijn de concentraties DDS en MADDS bij intramusculaire toediening juist hoger dan die bij orale toediening. Ook dit is te verklaren met de depotvorming; er komt nog steeds dapson van de spier in de bloedbaan terecht.

Het concentratieniveau van dapson resp. mono-acetyldapson is bij orale toediening \pm 80 resp. \pm 110 uur na de laatste toediening gedaald tot 0,2 ppm.

Intramusculaire medicatie geeft een minder snel dalend profiel. Daar bedraagt het concentratieniveau 0,3 ppm dapson en 0,6 ppm mono-acetyldapson, \pm 150 uur na de laatste toediening. MADDS is als residu dus belangrijk; het is in hoge concentratie aanwezig en ook nog biologisch actief als gevolg van de vrije NH_2 -groep.

4.4 Eiwitbinding

Voorgaand onderzoek heeft uitgewezen dat, met de analysemethode m.b.v. extrelut (bijlage 8), de concentratie van zowel vrije als eiwitgebonden DDS en MADDS wordt bepaald.

Het onderzoek bestond uit het toevoegen van bekende hoeveelheden DDS, MADDS en DADDS aan bloed en deze drie dagen te laten staan bij 37°C , zodat de stoffen aan de eiwitten konden binden. Vervolgens is zowel de analysemethode met extrelut als met ultrafiltratie nagewerkt.

Bekend was, dat met de laatste, alleen het vrij, in het plasma aanwezige, DDS, MADDS en DADDS gemeten werd. Onbekend was, wat er met de extrelut-methode werd gemeten.

Resultaten van dit onderzoek.

Recovery van (%)	Methode	
	Extrelut	Ultrafiltratie
DDS	98	6
MADDS	96	9
DADDS	92	8

Hieruit werd geconcludeerd, dat met de extrelut-methode zowel de vrije- als eiwitgebonden gehalten van DDS, MADDS en DADDS werden bepaald.

Een aantal monsters, allen van de eerste dag van medicatie, werd, na centrifugatie over een membraan, onderzocht op het gehalte aan vrij in het plasma aanwezige dapson en acetylmethylmetabolieten.

Het percentage vrij- en eiwitgebonden dapson en mono-acetyldapson in bloedplasma.

Toediening	Tijd bemonstering na medicatie (uur)	Eiwitgebonden DDS (%)	Eiwitgebonden MADDS (%)
oraal	1	>99	>99
	4	>99	>99
intramusc.	0,5	>99	>99
	1	>99	>99
	4	99	>99

Bij zowel orale als intramusculaire medicatie zijn DDS en MADDS voor meer dan 99% aan eiwitten gebonden, in het plasma aanwezig.

4.5 Deglucuronidering

Na incubatie met het enzym glucuronidase/sulfatase werden een aantal monsters onderworpen aan dapson- en mono-acetyldapsonanalyse.

In geen van de monsters werd een hoger gehalte aan DDS en MADDS gevonden dan het gehalte welk bepaald was zonder toevoeging van het enzym. Er werden zelfs lagere concentraties gemeten; waarvoor geen verklaring voorhanden is.

Gezien deze resultaten kunnen glucuronide- en sulfaatmetabolieten als afwezig gesteld worden.

4.6 Andere pieken dan die van DDS, MADDS en DADDS, voorkomend in het chromatogram

Zowel in de chromatogrammen van bloedplasma, afkomstig van het dier welk dapson op orale wijze toegediend heeft gekregen, als in die van het dier, behandeld op intramusculaire wijze, kwamen steeds terugkerende pieken voor van nog onbekende stoffen, welke afwezig zijn in blanco bloed.

Deze pieken komen ook voor na de glucuronidase-behandeling. Daar dit mogelijk metaboliëten van dapson kunnen zijn, is de concentratie hiervan uitgedrukt in de concentratie dapson (tabellen 3 resp. 4), om ook hiervan een kinetisch profiel te construeren (figuren 3 resp. 4).

- Orale toedieningswijze

De pieken met retentietijd van ± 5 en ± 7 minuten worden pas enige dagen na de eerste medicatie in het chromatogram waargenomen. Het verloop van de bijbehorende curve's komt totaal niet overeen met die van dapson en mono-acetyldapson; de concentraties variëren sterk. Op grond van deze feiten kan men aannemen dat genoemde pieken niet afkomstig zijn van metaboliëten van dapson.

De pieken met retentietijd ± 16 en ± 20 minuten daarentegen zijn vanaf het begin aanwezig en het kinetisch profiel van beide stoffen vertoont sterke gelijkënis met dat van dapson en mono-acetyldapson; na medicatie loopt het gehalte op en vervolgens weer af. Na de derde dag worden geen van beide stoffen meer aangetoond; de concentraties zullen beneden het meetbereik liggen of het komt door verstoring van het metabolisme, als gevolg van het ziek zijn van het dier.

Op grond van de gelijkvormige curven mag men aannemen dat de pieken met genoemde retentietijden waarschijnlijk afkomstig zijn van enkele nog onbekende metaboliëten van dapson. Daar beide stoffen later van de chromatografische kolom afkomen dan DDS, MADDS en DADDS, zullen ze minder polair van karakter zijn.

- Intramusculaire toedieningswijze:

Hier komen eveneens pieken voor met retentietijd van ± 5 en ± 7 minuten, echter met dit verschil dat de eerstgenoemde nu wel van meet af aan aanwezig is.

Bij geen van beide komt het kinetisch profiel overeen met die van DDS en MADDS en kan men stellen dat het geen dapsonmetaboliëten zijn. Slechts één maal wordt een piek zichtbaar met een retentietijd van 22 minuten.

Bij beide medicatievormen zijn bij een aantal tussenliggende monsters geen "extra" pieken teruggevonden. Daarom zijn in de figuren 3 en 4 geen vloeiende curven getekend.

4.7 Recovery

Met elke serie monsters zijn een aantal blanco monsters meegenomen, waar een bekend aantal ml van de verschillende standaardoplossingen aan zijn toegevoegd, teneinde het terugvindingspercentage (recovery) te bepalen.

Er zijn dusdanige volumina standaardoplossing toegevoegd dat de blanco monsters 1 of 10 ppm aan DDS, MADDS en DADDS bevatten.

De gemiddelde recovery met standaarddeviatie:

<u>Stof</u>	<u>Recovery (%)</u>	<u>Standaarddeviatie (%)</u>
dapson	100	12
mono-acetyldapson	103	17
diacetyldapson	101	20

5. Conclusies

De bepalingsmethode, opgenomen in bijlage 8 is, gezien de hoge recovery's en de lineariteit van de standaardreeksen, geschikt voor de analyse van dapson, mono- en diacetyldapson in bloedplasma.

Diacetyldapson is echter in zeer lage concentraties aanwezig en vaak niet aantoonbaar (detektiegrens: 0,05 ppm).

Oraal toegediend dapson resulteert in een hogere bloedspiegel dan intramusculair toegediend dapson. Het concentratieniveau van dapson resp. mono-acetyldapson is bij de orale toedieningsvorm, 3 1/3 resp. 4 1/2 dag na de laatste medicatie gedaald tot 0,2 ppm. Bij een intramusculaire behandeling worden echter na 6 dagen nog gehalten van 0,3 ppm dapson en 0,6 ppm MADDS aangetroffen. De halfwaardetijd van de dapson en mono-acetyldapson is bij orale toediening 6 1/2 resp 12 uur; bij intramusculaire toediening is deze voor dapson \pm 8 weken en voor mono-acetyldapson \pm 1 week.

Dapson en mono-acetyldapson blijken voor meer dan 99% aan eiwitten in het bloedplasma gebonden te zijn.

Deglucuronidering heeft uitgewezen dat het glucuronide- en sulfaat-metaboliet niet gevormd wordt; er zijn echter vermoedelijk wel andere metabolieten in het bloedplasma aanwezig. Deze hebben een retentietijd van 16 en 20 minuten bij een elutiesnelheid van 2,0 ml/min.

Bijlagen

1. Farmacokinetisch profiel van dapson en mono-acetyldapson; orale toediening.
2. farmacokinetisch profiel van dapson en mono-acetyldapson; intramusculaire toediening.
3. Concentratieverloop "vreemde" stoffen; orale toediening.
4. Concentratieverloop "vreemde" stoffen; intramusculaire toediening.
5. Tabellen, behorende bij de figuren 1 t/m 4.
6. IJklijn dapson, mono- en diacetyldapson.
7. Chromatogrammen; A - orale en intramusculaire behandeling
b - blanco met standaardaddities
- monster met "onbekende" dapsonmetabolieten.
8. Intern Analysevoorschrift
Bloed - Bepaling van dapson, mono-acetyldapson en diacetyldapson - HPLC.
1e oplage (1985-02-01).

Literatuur

1. M.B.C. Brinkman, E.M. Mattern, H.W. van Gend; Geautomatiseerde bepaling van diaminodifenylnsulfon (DDS) en zijn acetylmetabolieten (MADDS en DADDS) in melk, met behulp van het FAST-LC systeem. Rapportnr. IR/73/07/84/D06, augustus 1984. Keuringsdienst van Waren voor het gebied Utrecht.
2. H.J.J. Huikeshoven; Patient compliance with dapsone administration in leprosy. Rodopi, Amsterdam 1980, p. 13-16.
3. A. Dekker, R. Hageman; Absorbtion, distribution and elimination of dapsone in goats. Refuah. Vet., 35 (2) 1978, p. 41, 51, 54-55.
4. Dr ir H.A. Kuiper; Farmacokinetisch/toxicologisch onderzoek dapson; projekt nr. 404.0850, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
5. J.Vansant, R.L. Woosley, J.T. John, J.S. Sergent; Normal distribution of acetylation phenotypes in systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism, vol. 21, no. 2 (maart 1978), p. 194.

FIGURE 1:
DISPOSITION OF DAPSONE (DDS) AND N⁴-MONOACETYLMETABOLITE (MADDS) IN COW PLASMA
AFTER THREEFOLD ORAL ADMINISTRATION AT A DOSE LEVEL OF 100 MG/KG

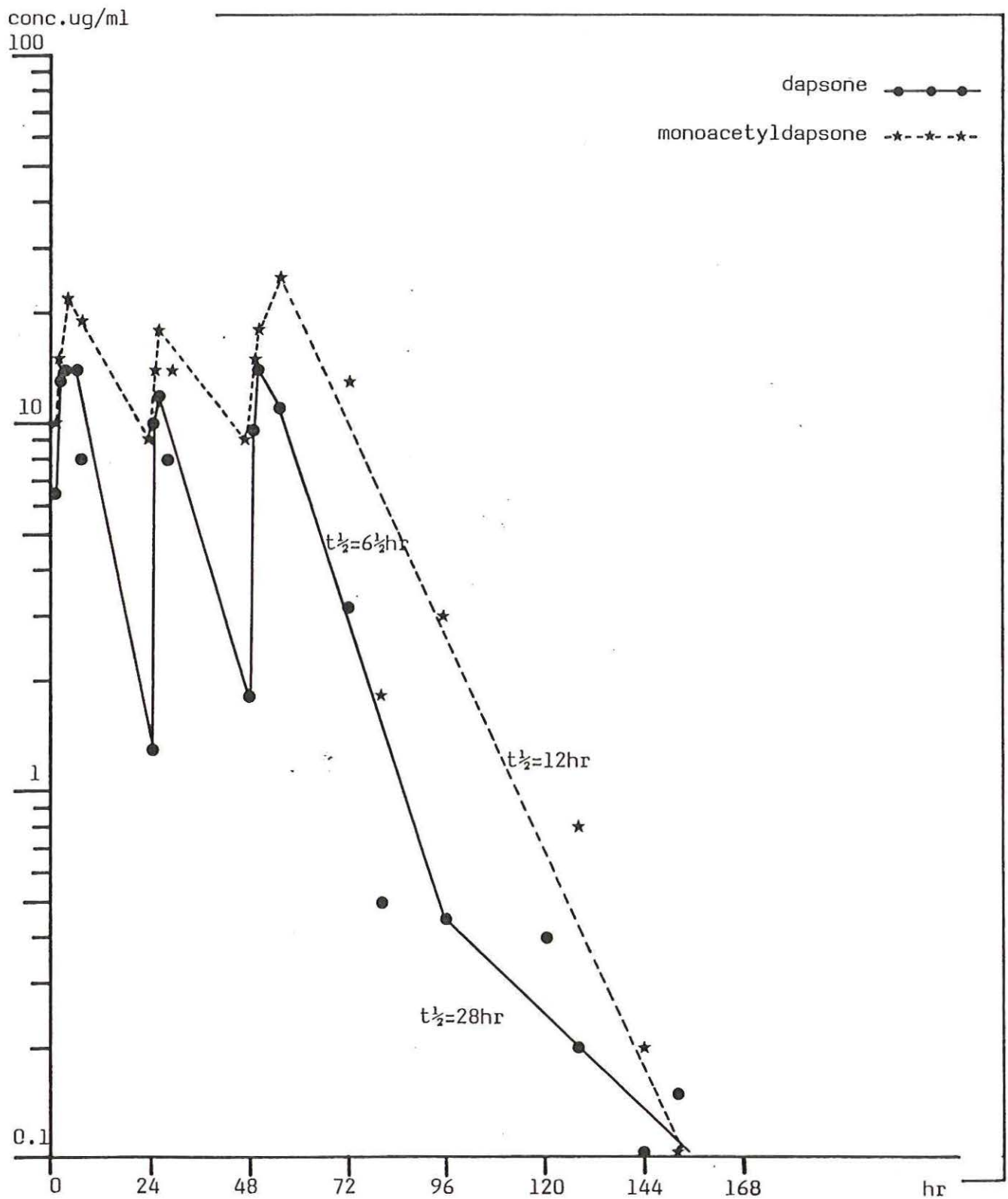
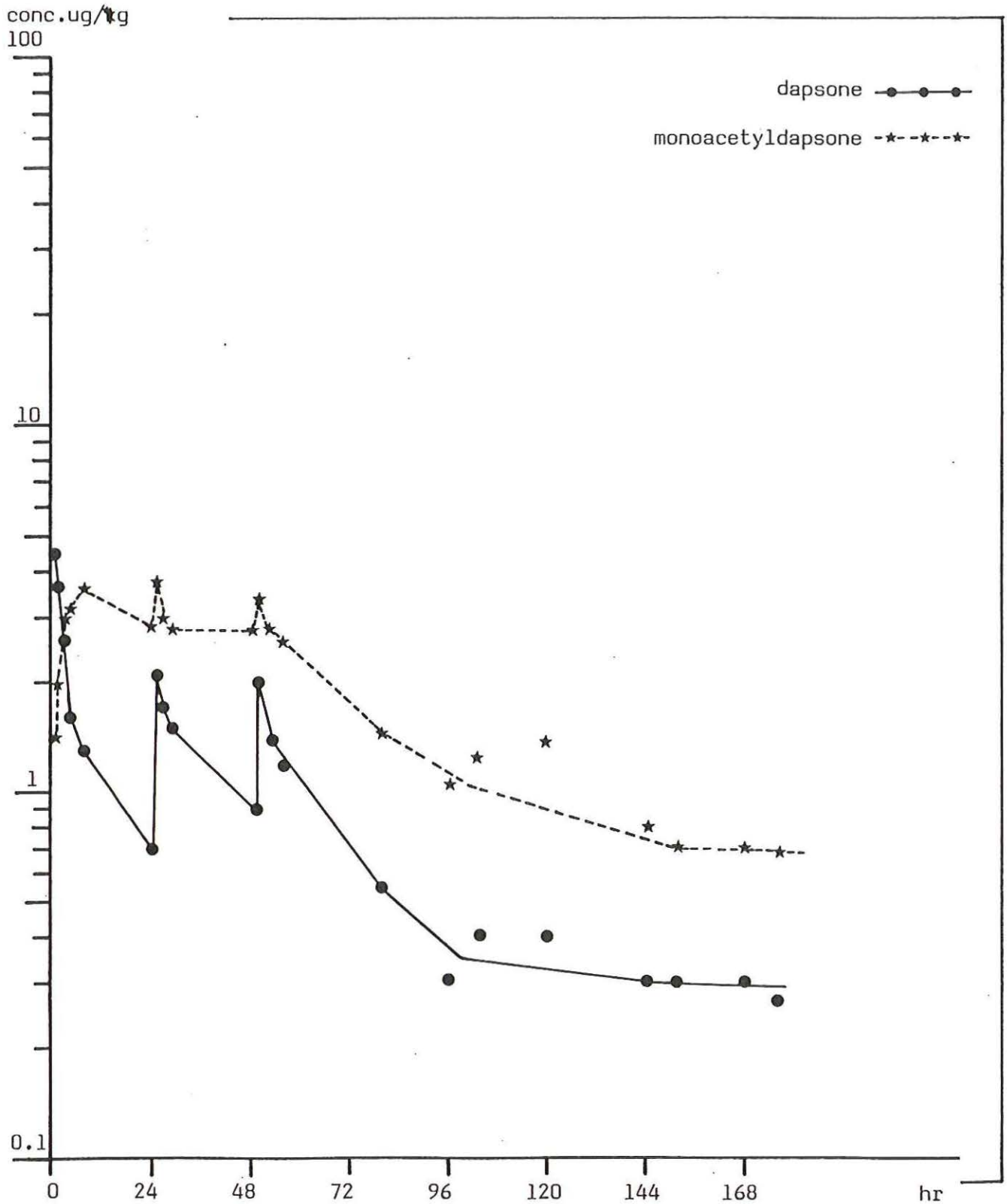


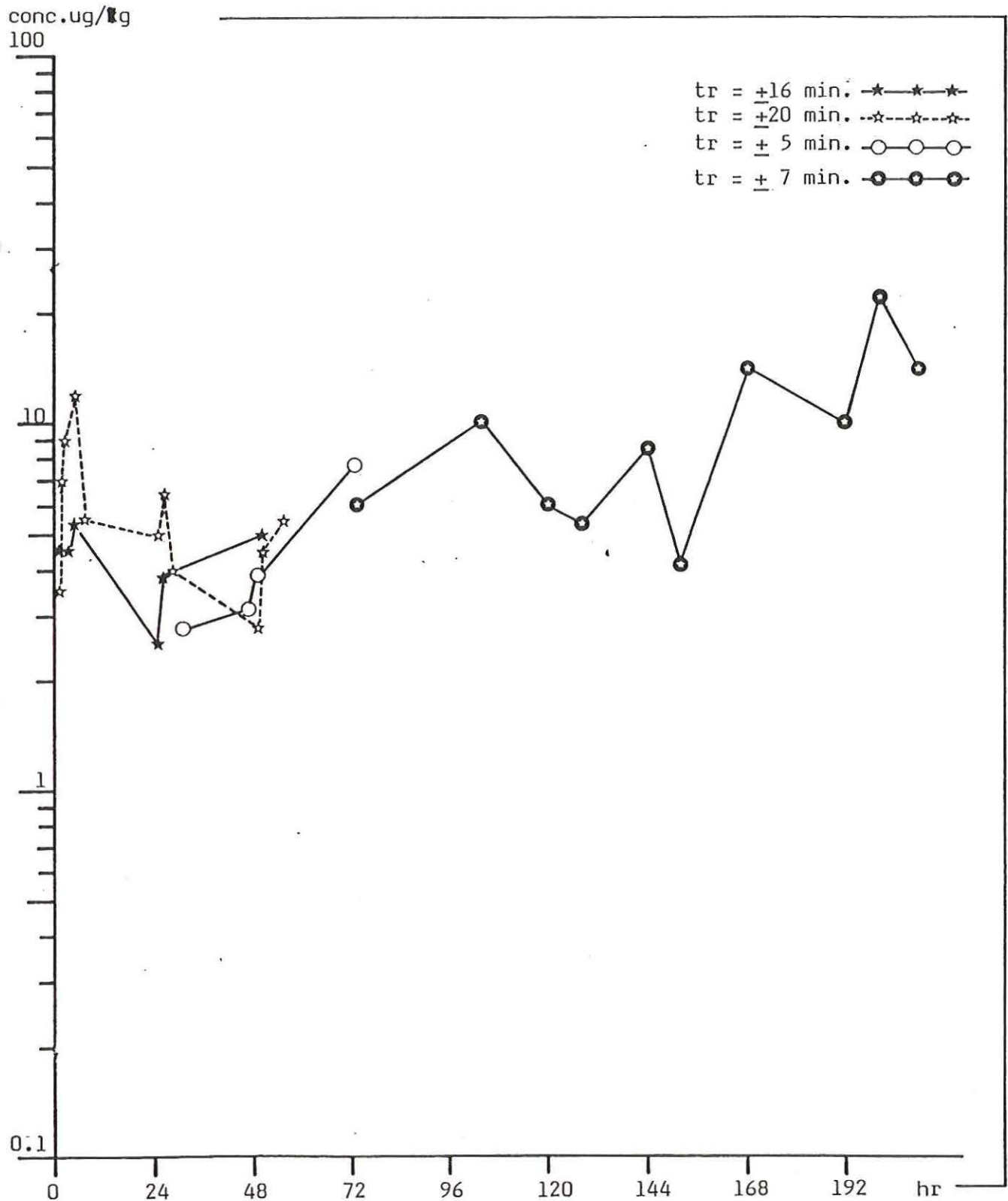
FIGURE 2 :

DISPOSITION OF DAPSONE (DDS) AND N⁴-MONOACETYLMETABOLITE (MADDS) IN PLASMA
AFTER THREEFOLD INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION AT A DOSE LEVEL OF 80 MG/KG

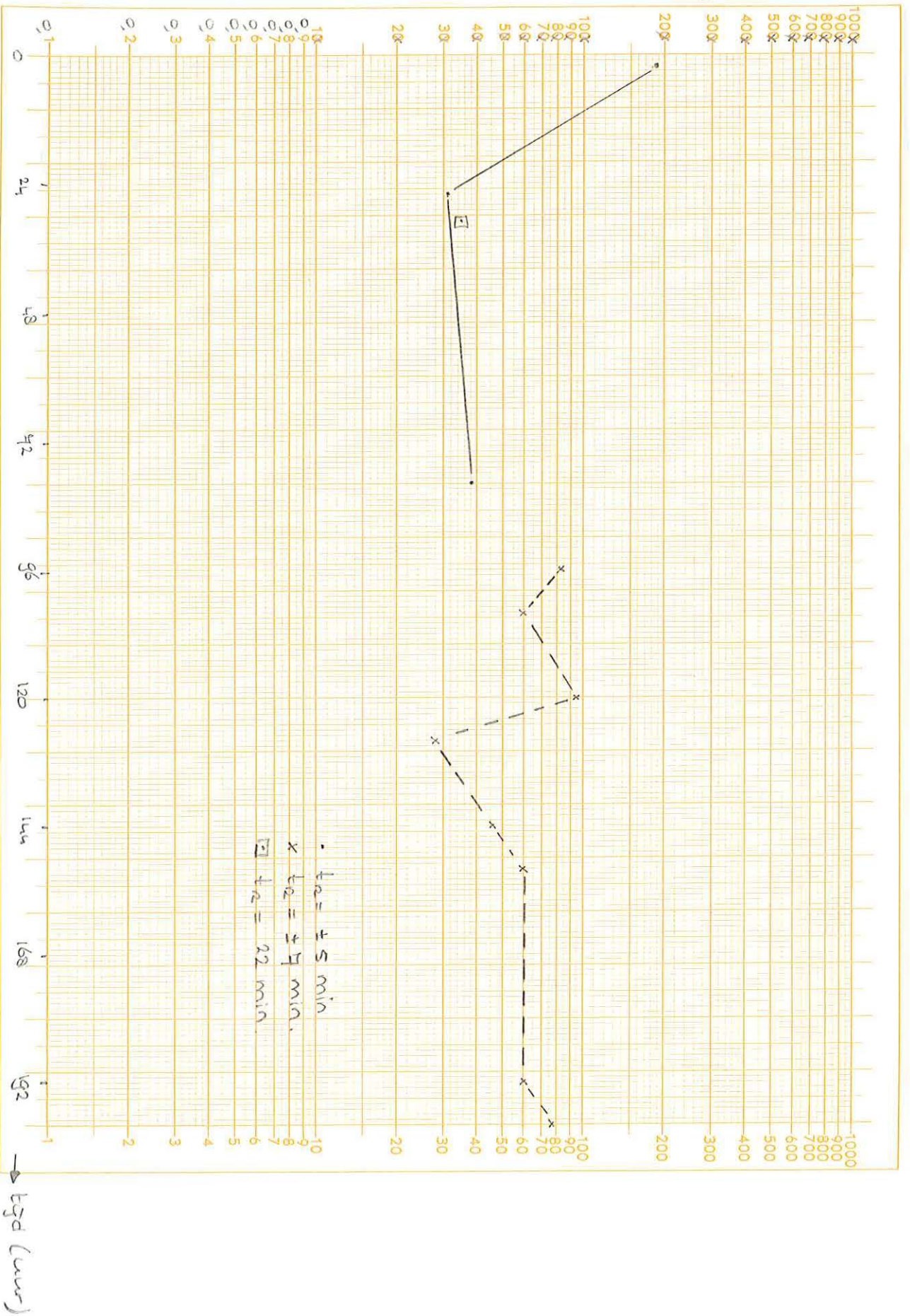


FIGUUR 3: CONCENTRATIEVERLOOP VAN 'VREEMDE' STOFFEN IN BLOEDPLASMA

TOEDIENING DAPSON: ORAAL / FLOWRATE: 2.0 ML/MIN



conc (ppm)
 uitgedrukt in
 de conc.
 clapsen
 vermenigvuldigd
 met de factor
 177,82.



meeppapier - wormer Na 32 H X-as verdeeld in mm, Y-as log. verdeeld 1:10² Eenheid 50 mm.
 Figuur-4: Concentratieverloop van 'vreemde' stoffen in ble-plasma.
 toediening clapsen: intramusculair / flowrate: 2,0 ml/min.

Tabel 1. Dapson, mono- en diacetyldapson in bloedplasma; oraal

Tijd na eerste toediening (uur)	Concentratie DDS ($\mu\text{g/ml}$)	Concentratie MADDs ($\mu\text{g/ml}$)	Concentratie DADDs ($\mu\text{g/ml}$)
0	-	-	-
0,5	6,4	3,5	-
1	12,9	9,6	-
2	14,1	15,1	-
4	13,9	22,4	-
7	8,0	18,9	-
24	1,3	9,2	-
25	10,2	14,1	-
26	12,4	16,5	0,2
28	7,8	13,8	0,08
31	1,4	3,4	0,09
48	1,8	9,0	0,09
49	9,7	14,8	0,07
50	14,2	17,9	-
55	11,2	24,6	0,2
73	3,2	13,1	0,09
80	0,5	1,8	-
96	0,4	3,1	-
104	0,1	1,6	-
120	0,4	-	-
128	0,2	0,9	-
144	0,1	0,2	-
152	0,15	0,1	-
168	0,06	0,05	-
176	0,06	0,03	-
192	0,05	0,1	-
200	0,1	-	-
216	0,1	-	-

Tabel 2. Dapson, mono- en diacetyldapson in bloedplasma; intramusculair

Tijd na eerste toediening (uur)	Concentratie DDS (µg/ml)	Concentratie MADDs (µg/ml)	Concentratie DADDs (µg/ml)
0	-	-	-
0,5	4,5	1,4	-
1	3,7	1,9	-
2	2,7	3,0	-
4	1,6	3,2	-
7	1,3	3,6	-
24	0,7	2,9	-
25	2,1	3,7	-
26	1,7	3,0	-
28	1,5	2,9	-
31	5,9	15,5	0,09
48	0,9	2,8	-
49	2,0	3,3	-
52	1,4	2,8	-
55	1,2	2,6	-
80	0,6	1,5	-
96	0,3	1,0	-
104	0,4	1,2	-
120	0,4	1,3	-
128	0,1	0,4	-
144	0,3	0,8	-
152	0,3	0,7	-
168	0,3	0,7	-
176	0,27	0,7	-
192	0,29	0,5	-
200	0,3	0,6	-

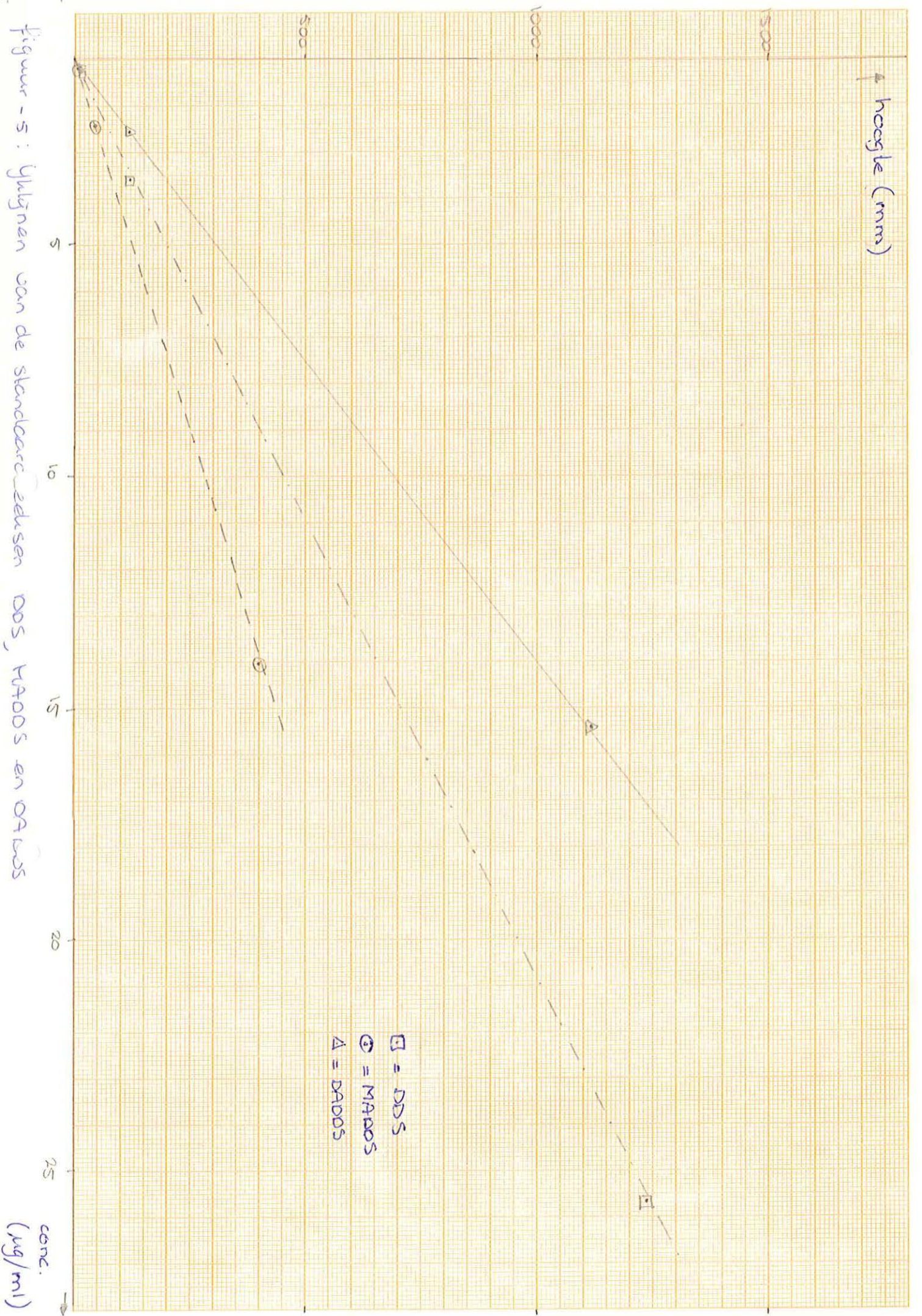
Tabel 3. Concentratie vreemde stoffen uitgedrukt in de concentratie dapson vermenigvuldigd met de faktor 77,82; oraal (flowrate 2,0 ml/min)

Tijd na eerste toediening (uur)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 16 \text{ min}$	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 20 \text{ min}$	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 5 \text{ min}$	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 7 \text{ min}$
0,5	3,5	3,5	-	-
1	4,6	6,7	-	-
2	4,6	9,1	-	-
4	5,3	11,9	-	-
7	-	5,6	-	-
25	2,5	4,9	-	-
26	3,9	6,3	-	-
28	-	3,9	-	-
31	-	-	2,8	-
48	-	-	3,2	-
49	-	2,8	3,9	-
50	4,9	4,6	-	-
55	-	5,6	-	-
73	-	-	7,7	6,0
104	-	-	-	10,2
120	-	-	-	6,0
128	-	-	-	5,3
144	-	-	-	8,4
152	-	-	-	4,2
168	-	-	-	14,4
192	-	-	-	9,8
200	-	-	-	21,7
216	-	-	-	13,7

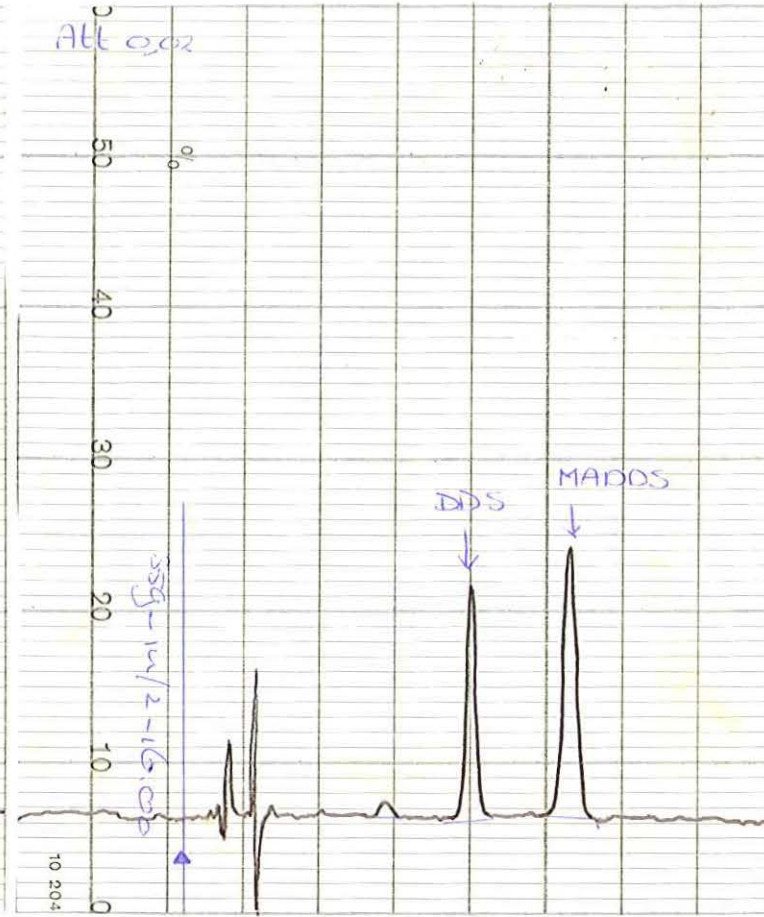
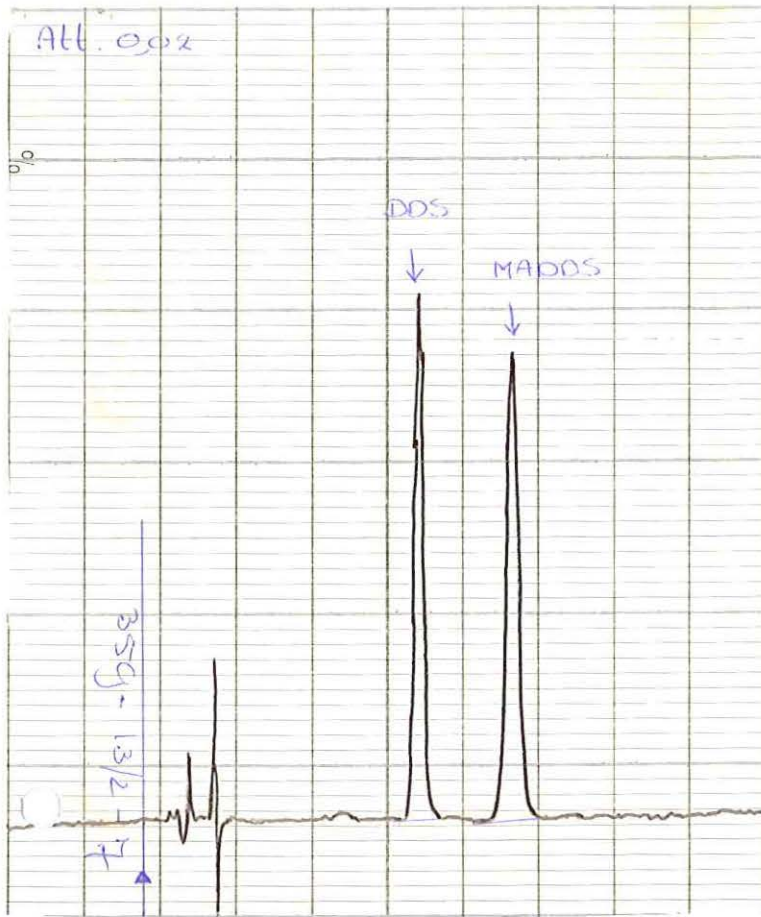
Tabel 4. Concentratie vreemde stoffen uitgedrukt in de concentratie dapson vermenigvuldigd met de faktor 77,82; intramusculair (flowrate 2,0 ml/min)

Tijd na eerste toediening (uur)	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 5 \text{ min}$	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 22 \text{ min}$	Conc. ($\mu\text{g/ml}$) $t_r = 7 \text{ min}$
0,5	-	-	-
1	-	-	-
2	18,9	-	-
4	-	-	-
7	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	3,2	-	-
28	-	-	-
31	-	3,5	-
48	-	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-
52	-	-	-
55	-	-	-
80	3,9	-	-
96	-	-	8,4
104	-	-	5,6
120	-	-	9,5
128	-	-	2,8
144	-	-	4,6
152	-	-	6,0
192	-	-	6,0
200	-	-	7,7

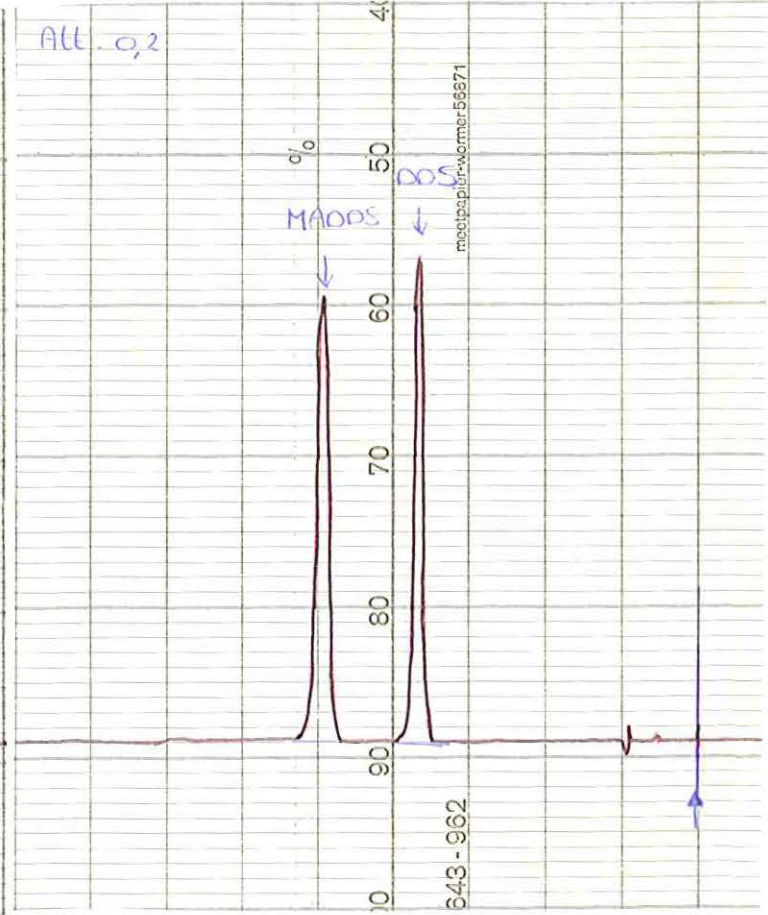
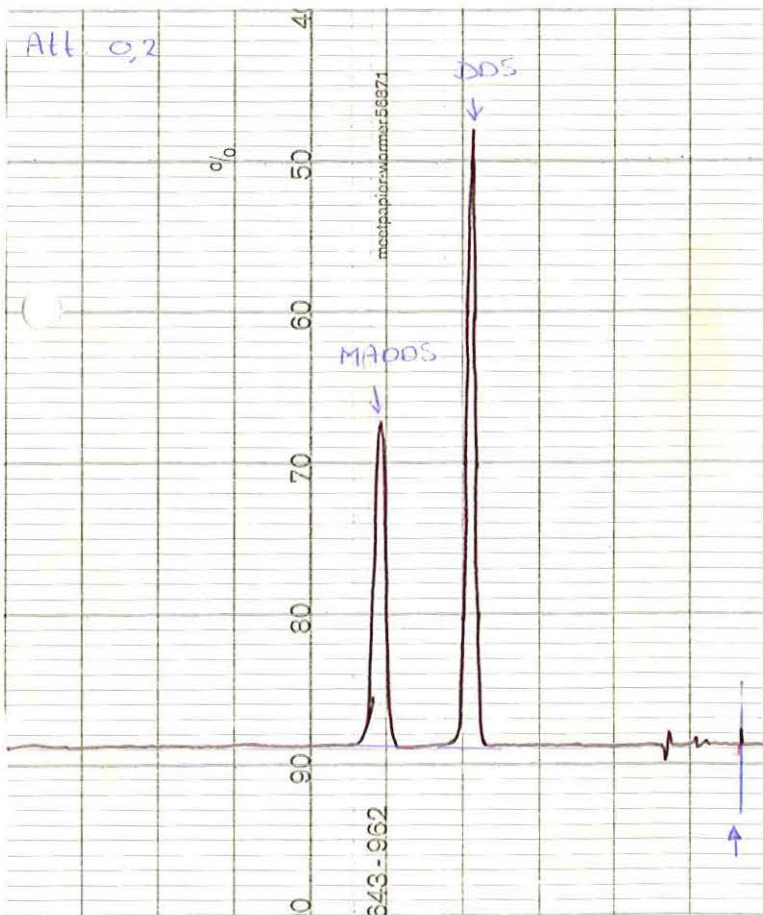
figuur -5 : ylijnen van de standaardzaden DDS, MADDOS en DADDOS



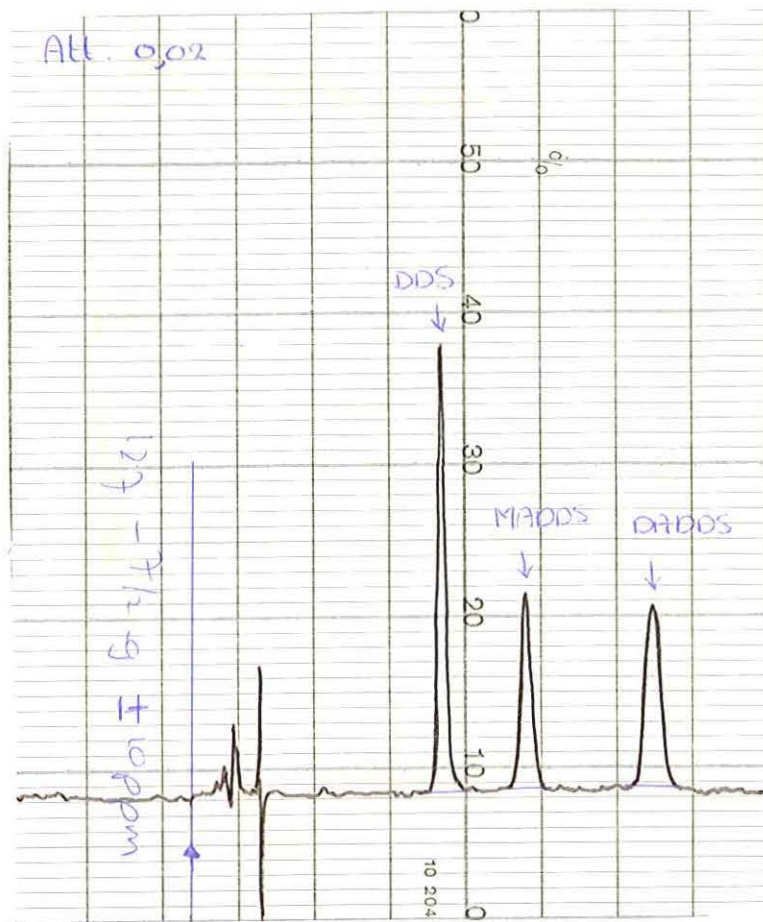
□ = DDS
 ⊕ = MADDOS
 Δ = DADDOS



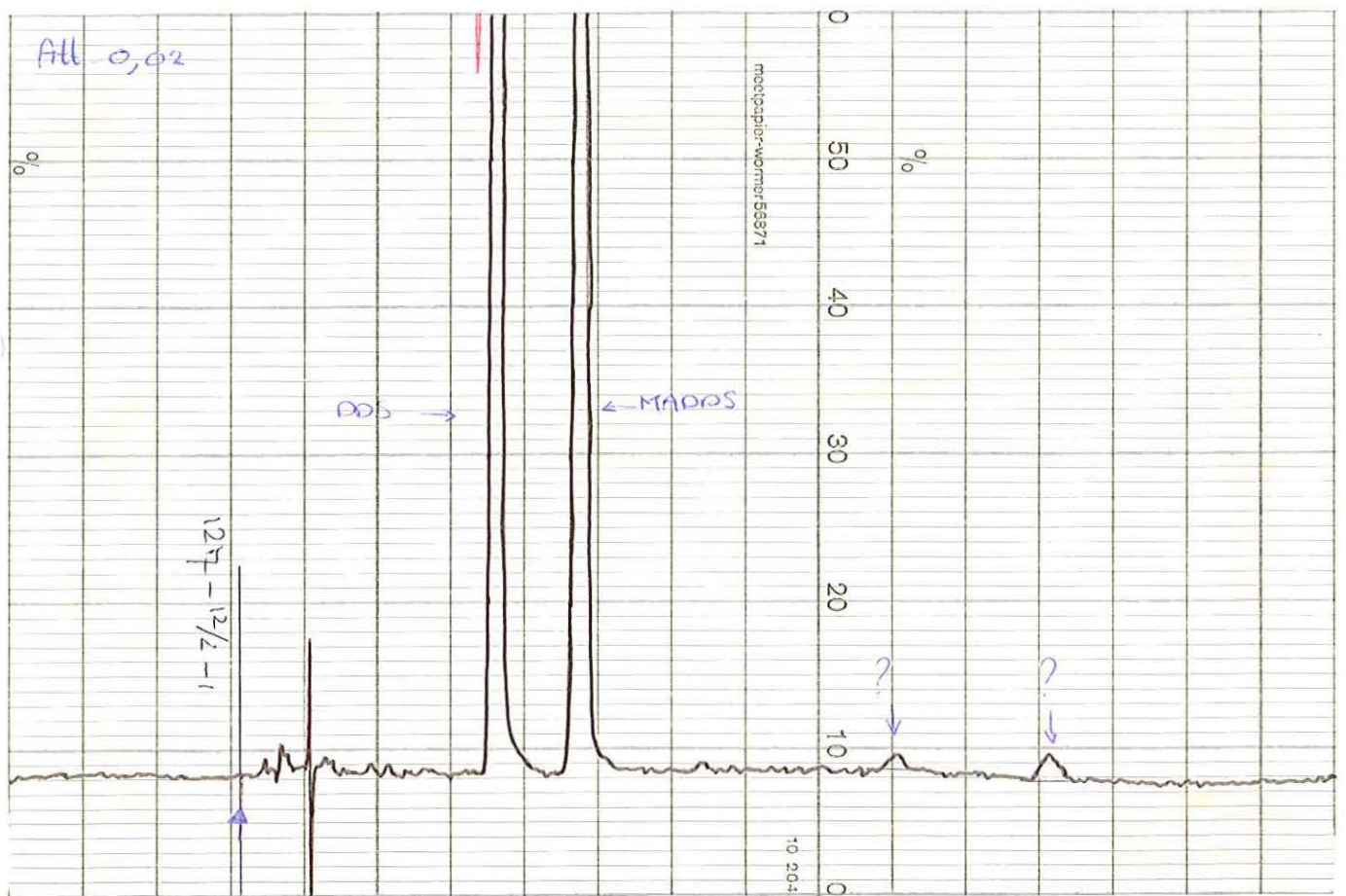
Intramusculaire toediening van dapson.
 links: 7 uur na de laatste medicatie, rechts: 32 uur na de laatste medicatie.



Orale toediening van dapson.
 links: 2 uur na de laatste medicatie, rechts: 7 uur na de laatste medicatie



blanco bloedmonster met toegevoegd 10,28 ppm DDS
 11,20 ppm MADDS
 9,86 ppm DADDS



Chromatogram van bloedplasma met pieken van nog onbekende stoffen. (orale behandeling)

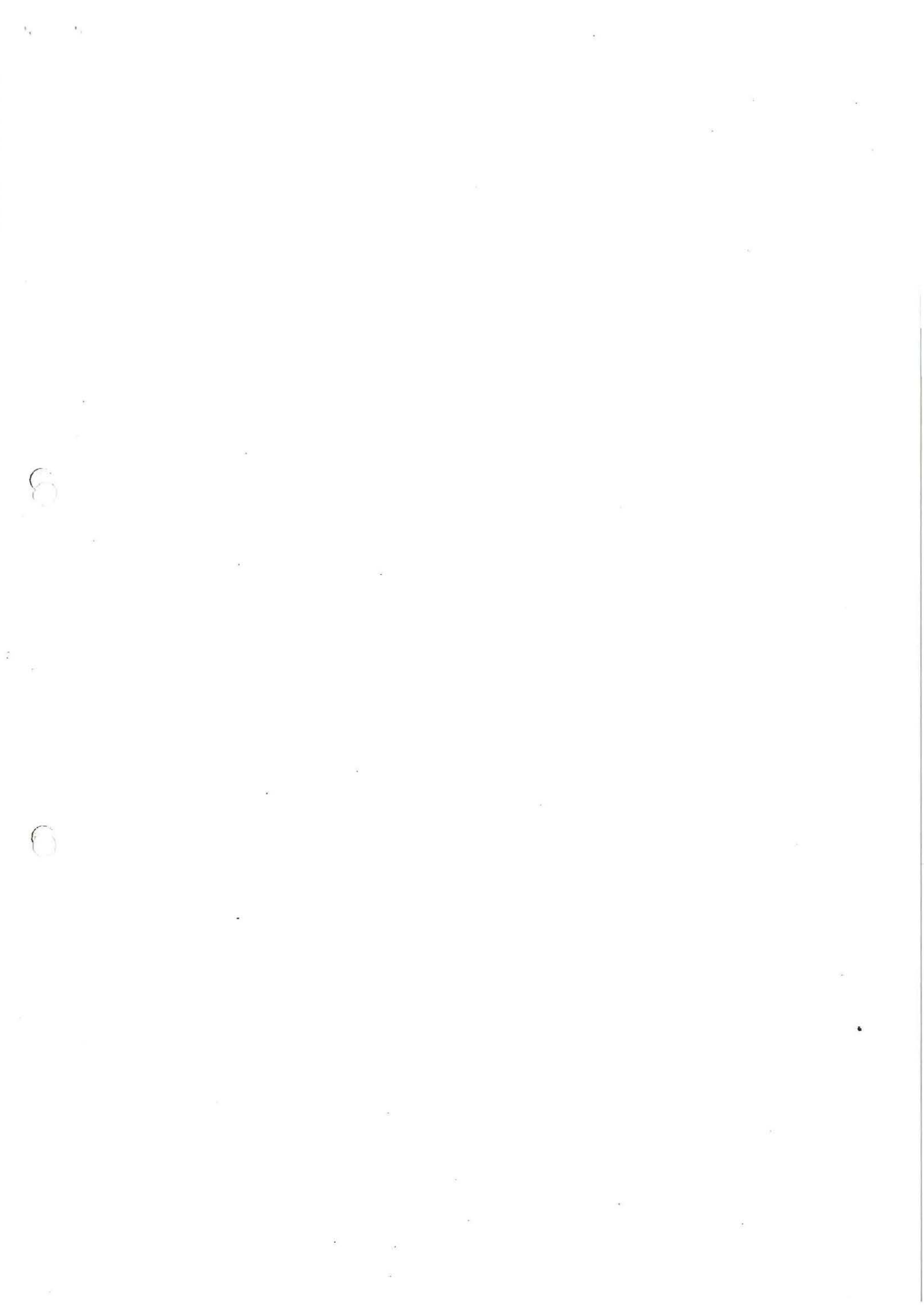
AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 404
1e oplage (1985-02-01)

BLOED - BEPALING VAN DAPSON, MONOACETYLDAPSON en DIACETYLDAPSON - HPLC

Verzendlijst: bibliotheek (5x), afdeling Diergeneesmiddelen (4x), sek-
torhoofd.

404.0



Bloed - Bepaling van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson - HPLC

1. Doel en toepassingsgebied

De bepaling is geschikt voor de gelijktijdige kwantitatieve analyse van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in bloed, serum en plasma.

De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 0,05 µg/ml (10 maal de ruis). Het toepassingsgebied ligt tussen 0,1 µg/ml en 100 µg/ml.

Het terugvindingspercentage (recovery) van de methode voor dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson bedraagt ca. 95%.

2. Principe

Bij een bekend volume monstermateriaal wordt water toegevoegd en gemengd. De waterige oplossing wordt op een Extrelut-kolom gebracht. Dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson worden van de extrelut-kolom geelueerd met behulp van dichloormethaan.

De organische fase wordt verdampt tot er een droog restant wordt verkregen. Na oplossen van het restant in HPLC eluens volgt analyse met behulp van isocratische "reversed phase" HPLC met UV detectie bij 292 nm.

Met de methode wordt het totale, zowel vrij als ook eiwitgebonden dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in het materiaal bepaald.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Millipore water.

3.2 Acetonitril, Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck art. 30).

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

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

3.5 HPLC eluens

Meng 800 ml millipore water met 200 ml acetonitril (Lichrosolv).

3.6 Extrelut kolommen (3 ml) (Merck art. 15372) met aan de onderzijde een naald.

3.7 Ultrafiltratie units (Amicon produkt no. 4104).

3.8 Dapson standaardstof.

3.8.1 Dapson standaardoplossingen

Weeg op 0,1 mg nauwkeurig 25 mg standaardstof af in een maatkolf van 100 ml en los op in methanol, vul aan en meng (oplossing A). Breng 10,0 ml van deze oplossing in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing B).

Breng 10,0 ml van oplossing B in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing C).

Breng 10,0 ml van oplossing C in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing D).

Breng 10,0 ml van oplossing D in een 100 ml maatkolf, vul aan met methanol en meng (oplossing E).

Breng van oplossing A, B, C, D, en E precies 2,0 ml in afzonderlijke cultuurbuizen. Verdamp de methanol met behulp van een stikstofstroom en los het residu op in precies 2,0 ml HPLC eluens.

De aldus verkregen standaardoplossingen bevatten 250 µg/ml; 25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,025 µg/ml aan dapson ten behoeve van HPLC.

3.9 Monoacetyldapson standaardstof

3.9.1 Monoacetyldapson standaardoplossingen

Weeg af en handel als bij dapson om standaardoplossingen te verkrijgen met eenzelfde concentratie.

3.10 Diacetyldapson standaardstof

3.10.1 Diacetyldapson standaardoplossingen

Weeg af en handel als bij dapson om standaardoplossingen te verkrijgen met eenzelfde concentratie.

3.11 Sulfatase/glucuronidase (Sigma S-3009).

3.12 Fosfaatbuffer pH 5,0 (1 Molair)

Los 174,09 g dikaliumfosfaat op in 500 ml water en stel de pH in op 5,0 met zoutzuur (6 N). Vul hierna aan tot 1 liter en meng.

3.13 Glucuronidaseoplossing (\pm 40 mg/ml)

Los 10 mg sulfatase/glucuronidase (3.11) op in 250 μ l buffer pH 5,0.

4. Apparatuur

4.1 Vibro-fix (Ika).

4.2 Centrifuge.

4.3 HPLC opstelling voor isocratische "reversed phase" met een variabele golflengte.

UV-detektor en een CP Spher C18 (250 x 4,6) 10 μ kolom.

Als voorkolom een Bondapak/Corasil C18 kolom (20 x 3,9) 37-50 μ .

4.4 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Analyse monstermateriaal (0,5 μ g/ml - 100 μ g/ml)

Pipetteer 0,5 ml monstermateriaal in een cultuurbuis. Pipetteer hierbij 3,0 ml water en meng op een vortex menger gedurende 15 seconden.

Pipetteer 2,0 ml van het mengsel op de Extrelut-kolom en laat 15 minuten in het pakkingsmateriaal trekken.

Elueer nu dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson van de extrelut met behulp van 15 ml dichloormethaan via de naald in een 25 ml buis met ingeslepen stop.

Verdamp de organische fase onder een stikstofstroom tot droog.

Los het restant op in precies 0,5 ml HPLC eluens (gebruik een vortex mixer). Injecteer 50 μ l van deze oplossing in het HPLC systeem.

5.2 Analyse monstermateriaal (0,05 μ g/ml-0,5 μ g/ml)

Pipetteer 0,5 ml monstermateriaal in een cultuurbuis. Pipetteer hierbij 3,0 ml water en meng op een vortex mixer gedurende 15 seconden.

Pipetteer 30 ml van het mengsel op de Extrelut-kolom en laat 15 minuten in het pakkingsmateriaal trekken.

Elueer nu dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson van de extrelut met behulp van 15 ml dichloormethaan via de naald in een 25 ml buis met ingeslepen stop.

Verdamp de organische fase onder een stikstofstroom tot droog.

Los het restant op in precies 0,25 ml HPLC eluens (gebruik een vortex mixer). Injecteer 100 μ l van deze oplossing op het HPLC systeem.

5.3 Eiwitbinding

Breng 1 ml monstermateriaal in een ultrafiltratieunit (Amicon produkt nr. 4104) en centrifugeer net zolang totdat voldoende monstermateriaal is verkregen (2000 rpm).

Injecteer het eiwitvrije monstermateriaal direkt in het HPLC systeem (injectievolume 50 μ l).

5.4 Deglucuronidering

Breng 500 μ l monstermateriaal in een buis van 25 ml. Voeg toe 500 μ l 1 M fosfaatbuffer pH 5,0 en 10 μ l sulfatase/glucuronidase (Sigma S-3009; \pm 40 mg/ml in buffer) en meng het geheel.

Sluit de buis af en zet ze 3 uur in een stoof bij 37°C.

Vervolg nu de analyse zoals staat beschreven in 5.1 en houdt rekening met de verdunning.

6. HPLC opstelling

Kolommen

Analytische kolom: CP Spher C18 (250 x 4,6 mm)
10 μ (Chrompack)
Voorkolom : Bondapak C18 (320 x 3,9 mm)
37-50 μ (Waters)
Eluens : Water-acetonitril 800-200.
Eluensnelheid : 2,0 ml/min.
Detectie : UV 292 nm.
Injectievolume : 50 of 100 μ l.
Retentietijd : tussen 10-16 minuten.

7. Uitvoering

Breng 50 of 100 μ l van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de pieken met die, die met één van de standaardoplossingen wordt verkregen. Bereken het gehalte in μ g/ml aan dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson in het monster (let op de verdunning van het monster).

8. Opmerkingen

8.1 Voor recoveryproeven dient men van de standaardoplossingen in methanol een bekende hoeveelheid te pipetteren in een buis en af te dampen met behulp van stikstof.

Hierna bloed, plasma etc. in de buis brengen en de analyse volgen zoals staat beschreven.

Bij elke serie dient steeds een blanco monster en een blanco monster met toevoeging van dapson, monoacetyldapson en diacetyldapson meegenomen te worden.

9. Literatuur

9.1 Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of dapsone and monoacetyldapsone in biological fluids.

J. Zuidema, E.S.M. Modderman, H.W. Hilbers and F.W.H.M. Merkus
Journal of Chromatography, 182 (1980) 130-135.

9.2 Normal Distribution of Acetylation Phenotypes in Systemic Lupus Erythematosus.

J. Vansant, R.L. Woosley, J.T. John and J.S. Sargent.

Arthritis and Rheumatism vol. 21, no. 2 (March 1978) 192-195.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Samensteller : W.M.J. Beek

W.B.

AR