

Lab. Diergeneesmiddelen

1981-03-23

Verslag 81.28

Pr.nr. 7.384

Onderwerp: Sulfonamiden in mengvoeders en  
dierlijke produkten

Voorgaande verslagen: Pr.nr. 7.384 dd.  
1979-06-20  
Pr.nr. 7.384 dd.  
1980-05-19

Lab. Diergeneesmiddelen

1981-03-23

Verslag 81.28

Pr.nr. 7.384

Projekt: Ontwikkeling van methoden voor het aantonen en bepalen van sulfonamiden

Onderwerp: Sulfonamiden in mengvoeders en dierlijke produkten

Voorgaande verslagen: Pr.nr. 7.384 dd. 1979-06-20 en  
Pr.nr. 7.384 dd. 1980-05-19.

---

Doel:

Het omzetten van sulfadimidine-natrium in sulfanilamide ten behoeve van het ontwikkelen van een multi-detektiemethode voor sulfonamiden in mengvoeders en dierlijke produkten met behulp van ELISA.

Konklusie:

Het hydrolyseren met zwavelzuur van sulfadimidine-natrium levert in deze experimenten niet de volledige omzetting op in sulfanilamide. Meestal ontstaat een verdeling tussen de twee sulfonamiden en een derde onbekende komponent. Daar er weinig vooruitzichten zijn op volledige omzetting, is het aanbevelenswaardig om andere methoden te gaan toetsen voor de bepaling van sulfonamiden in mengvoeders en dierlijke produkten.

---

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

Medewerkers: Th.C.H. van Neer, G.D. van Bruchem.

*FGB*

*GB*

1. Inleiding:

De toepassingen en de toleranties van sulfonamiden worden beschreven in de inleiding van de voorgaande verslagen (pr.nr. 7.384 dd. 1979-06-20 en pr.nr. 7.384 dd. 1980-05-19).

2. Methode van onderzoek:

2.1 Apparatuur en hulpmiddelen:

2.1.1 waterbad

2.1.2 verwarmingsplaat

2.1.3 koeler

2.1.4 rotavapor

2.1.5 centrifuge, 3000 tpm

2.1.6 dunnelaagchromatografie-instrumentarium + exsiccator

2.1.7 dc-fertigplatten Kieselgel 60 (ohne fluoreszenzindikator) Merck art. 5721

2.1.8 SiO<sub>2</sub>G-25 HR Macherey-Nagel + CO

2.1.9 dc-alufolien Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 60 F 254 neutral (typ E) Merck art. 5550

2.1.10 dc-fertigplatten cellulose Merck art. 5716

2.2 Reagentia en chemicaliën

Alle gebruikte chemicaliën dienen van p.a.-kwaliteit te zijn.

2.2.1 zwavelzuur 95-97%

2.2.2 water, Millipore gezuiverd

2.2.3 natriumhydroxide 1N

2.2.4 ethanol absoluut

2.2.5 benzeen

2.2.6 azijnzuur 100%

2.2.7 aceton

2.2.8 chloroform

2.2.9 n-hexaan

2.2.10 zoutzuur 37%

2.2.11 methanol

2.2.12 silicagel GF 254 (Merck art. 7730)

2.2.13 silicagel G nach Stahl (Merk art. 7731)

2.2.14 loopvloeistof: benzeen 600 vol.

azijnzuur 240 "

aceton 60 "

water 24 "

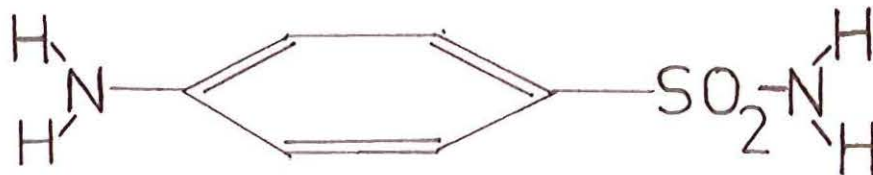
- 2.2.15 loopvloeistof: chloroform 1 vol.  
ethanol 1 "  
n-heptaan 1 "  
+ 1,5% water
- 2.2.16 sulfadimidinestandaard 100 µg/ml in methanol
- 2.2.17 sulfanilamidestandaard 100 µg/ml in methanol
- 2.2.18 4-dimethylaminbenzaldehyde
- 2.2.19 sproeimiddel: 300 mg 2.2.18  
15 ml 2.2.10  
15 ml 2.2.4

2.3 Bereiding dunnelaagplaten:

Voor 5 platen: Schud 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> minuut 70 gram silicagel (2.2.12 of 2.2.13) met 140 ml water en spreid dit m.b.v. een spreider uit over de 5 platen, laagdikte 0,8 mm. Laat de platen een kwartier aan de lucht drogen en daarna drie kwartier bij 120°C in de stoof. Bewaar de platen in een exsiccator met silicagel.

3. Experimenten en resultaten:

De hypothese om door middel van hydrolyse van de diverse sulfonamiden eenzelfde brokstuk over te houden is experimenteel getoetst met sulfadimidine-natrium. Uitgaande van sulfadimidine-natrium is geprobeerd het molecuul met zwavelzuur te splitsen tot sulfanilamide (figuur 1A). Het sulfanilamide zou dan met behulp van een ELISA-bepaling gemeten kunnen worden. Hierdoor zou een eventueel totaal sulfonamiden gehalte bepaald kunnen worden.



figuur 1 A

3.1 Werkwijze:

Sulfadimidine-natrium (100 µg) wordt met 20 ml zwavelzuur van resp. 1, 2, 5, 10 en 25% voor een bepaalde tijd gekookt (koeler op de erlenmeyer).

Na het afkoelen van de oplossing wordt voorzichtig 80 ml water toegevoegd en daarna 60 ml 1 N natriumhydroxide (pH onder de 7 houden). De waterige oplossing wordt met behulp van een rotavapor bij 80°C afgedampt tot ongeveer 40 ml. Hieraan wordt 100 ml ethanol toegevoegd waardoor een wit neerslag van natriumsulfaat ontstaat. Dit inhomogene mengsel wordt gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 3000 toeren per minuut. Het supernatant wordt afgeschonken en hieraan wordt opnieuw 100 ml ethanol toegevoegd om het eventueel nog aanwezige natriumsulfaat neer te slaan. Het mengsel wordt opnieuw gecentrifugeerd en het supernatant wordt afgeschonken en ingedampt bij 50°C met behulp van de rotavapor tot droog. Het residu wordt opgelost in 2 ml methanol. Op de dunnelaagplaat worden respectievelijk standaarden van sulfadimidine (100 µl van 2.2.16) en sulfanilamide (100 µl van 2.2.17) opgebracht en diverse hoeveelheden van de gehydrolyseerde standaard. De loopvloeistof is 2.2.14 of 2.2.15 en het sproeimiddel 2.2.19.

### 3.2 Resultaten

De resultaten worden weergegeven in tabel 1 met daarbij een verwijzing (figuur ...) naar de foto genomen van de ontwikkelde plaat.

Tabel 1

	<u>%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></u>	<u>sulfadimidine</u>	<u>sulfanilamide</u>	<u>onbekend</u>	<u>plaat</u>	<u>loopvloeistof</u>
figuur 1	25	-	-	+	2.1.7	2.2.14
" 2	10	-	-	+	2.1.7	2.2.14
" 3	5	-	-	+	2.1.7	2.2.14
" 4	2	+	+/-	+	2.1.7	2.2.14
" 5	1	+	+/-	+	2.1.7	2.2.14
" 6	5,10,25	+/-	-	+	2.2.12	2.2.14
" 7	1,2	+/-	-	-	2.2.12	2.2.14
" 8	5,10	-	-	+	2.1.8	2.2.14
" 9	1,2	-	-	+	2.1.8	2.2.14
" 10	1,2,5,10	-	-	+	2.1.9	2.2.14
" 11	1,2,5,10	+/-	-	+	2.1.10	2.2.14
" 12	5,10	-	+/-	-	2.2.13	2.2.15
" 13	1,2,5,10	+/-	+/-	-	2.1.8	2.2.15

	%H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfadimidine	sulfanilamide	onbekend	plaat	loopvloeistof
figuur 14	1,2	+/-	-	-	2.2.13	2.2.15
" 15	1,2,5,10	+/-	+/-	-	2.1.7	2.2.15
" 16	1,2,5,10	+/-	+/-	+	2.1.9	2.2.15
" 17	1,2	+	+	+	2.1.9	2.2.15
" 18	1,2	+	+	+	2.1.7	2.2.15
" 19	1,2	+	+/-	++	2.1.8	2.2.15
" 20	1,2	+	+	-	2.2.12	2.2.15
" 21	1,2	+	+	+	2.1.9	2.2.15
" 22	5,10	+	+	+	2.1.9	2.2.15
" 23	2,5,10,25	+/-	+/-	+	2.1.9	2.2.15
" 24	2,5,10,25	+/-	+/-	+	2.2.12	2.2.14
" 25	2,5,10,25	-	+	+	2.2.12	2.2.14

figuur 1 t/m 16 10 minuten koken met zwavelzuur

figuur 17 t/m 22 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> uur koken met zwavelzuur

figuur 23 t/m 25 8 uur koken met zwavelzuur

+/- = mogelijk aanwezig

- = afwezig

+ = aanwezig

2.1.7 = dc-fertigplatten Kieselgel 60 (ohne fluoreszenzindikator)

2.1.8 = SiO<sub>2</sub> G-25 HR

2.1.9 = dc-alufolien Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 60 F254 neutral (type E)

2.1.10 = dc-fertigplatten cellulose

2.2.12 = silicagel GF 254 zelf vervaardigde platen

2.2.13 = silicagel G nach Stahl

2.2.14 = benzeen/azijnzuur/acetone/water 600:240:60:24

2.2.15 = chloroform/ethanol/n-heptaan 1:1:1 + 1,5% water.

#### 4 Konklusie

Het hydrolyseren met zwavelzuur van sulfadimidine-natrium levert in deze experimenten niet de volledige omzetting op in sulfanilamide. Meestal ontstaat een verdeling tussen de twee sulfonamiden en een derde onbekende component. Daar er weinig vooruitzichten zijn op volledige omzetting, is het aanbevelenswaardig om andere methoden te gaan toetsen voor de bepaling van sulfonamiden in mengvoeders en dierlijke producten.

5 Literatuur:

5.1 Rijkslandbouwproefstation Maastricht 311/VL/77-D

Entwurf einer Methode

auteur: mej. C.M.J. Stegen.

5.2 Isolation and Identification of Drugs

E.G.C. Clarke

system T 22: Sulphonamides (unsubstituted)

blz. 57-58

cc: Van Doesburgh, adj. directeur, sektorhoofd (2x), direktie VKA,  
afdeling Diergeneesmiddelen, Bulzer, Van Bruchem, Van Neer,  
leesportefeuille (5x), Normalisatie, Projektbeheer.

vB/W

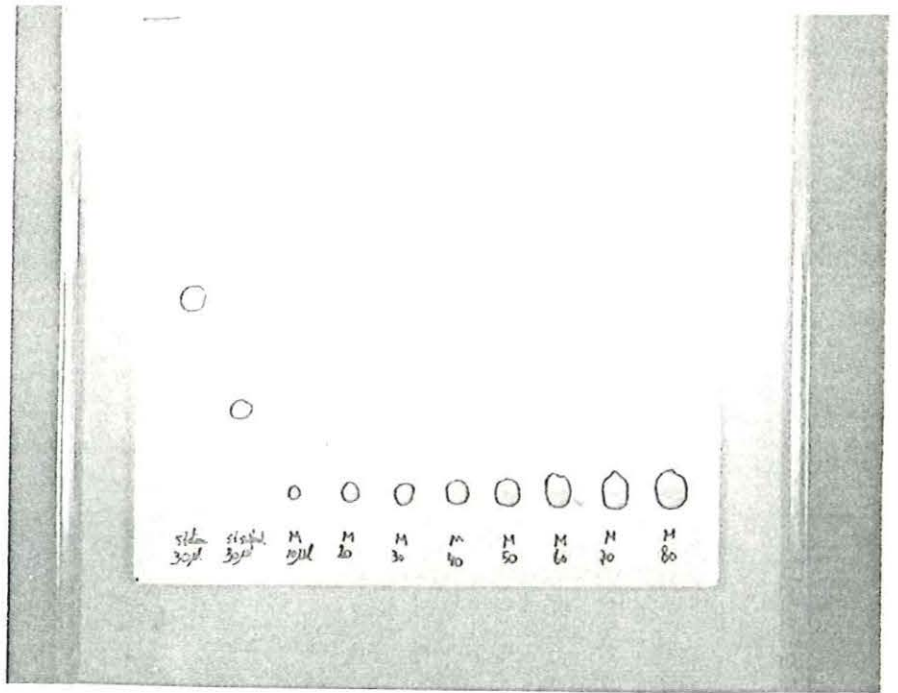


fig. 1

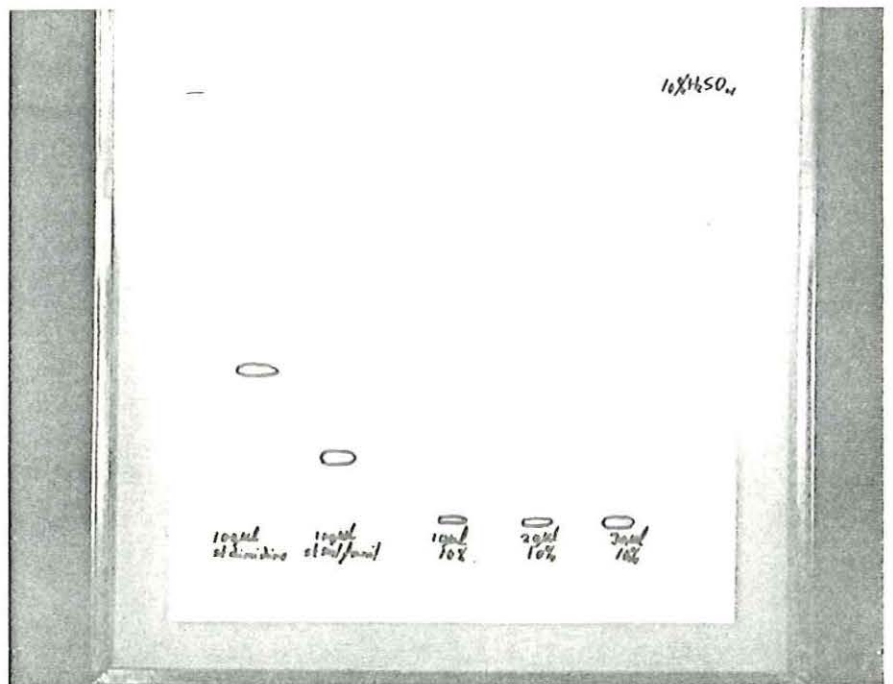


fig 2



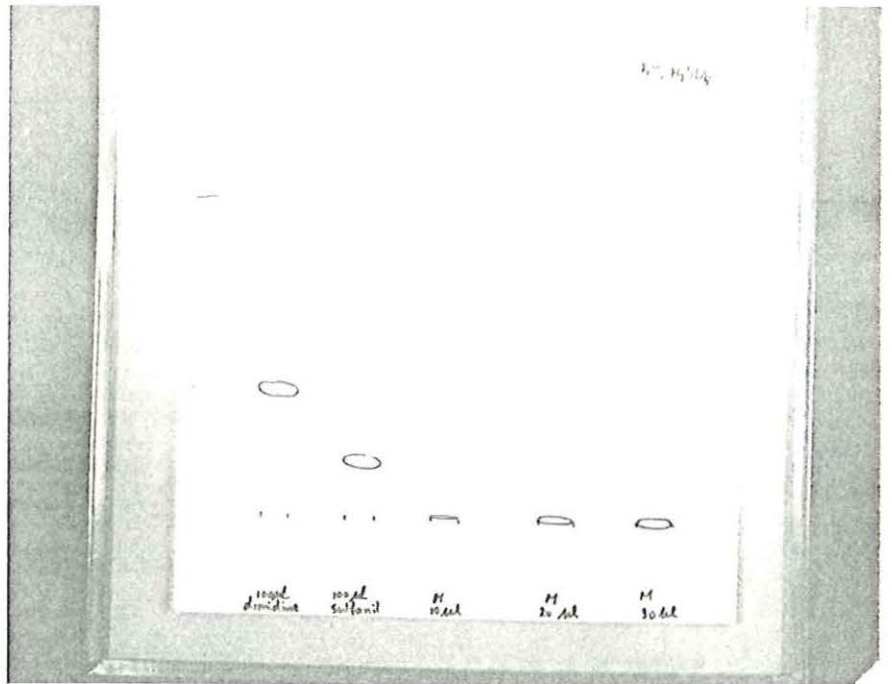


fig. 3

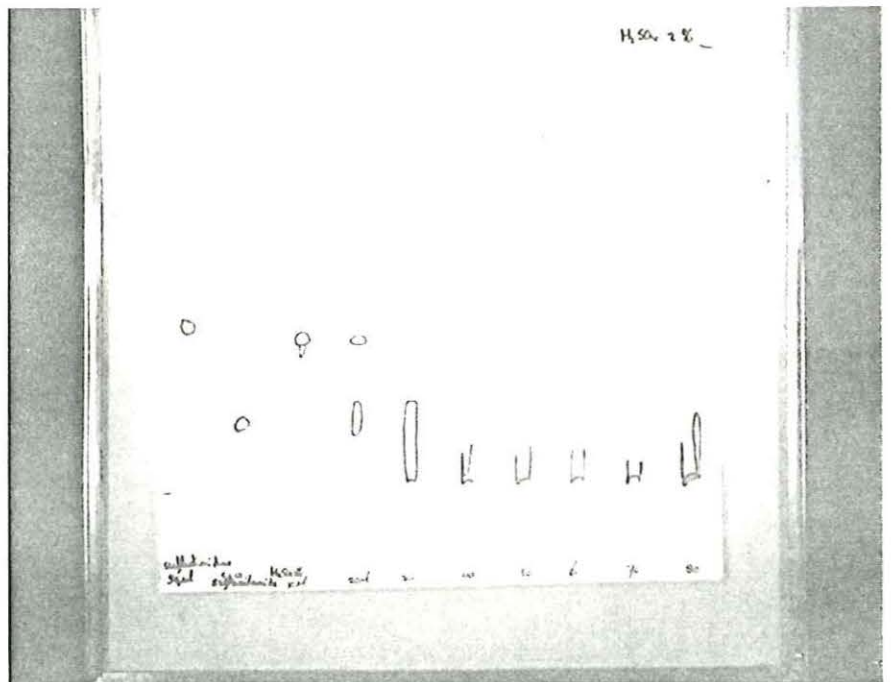


fig. 4

fig. 5

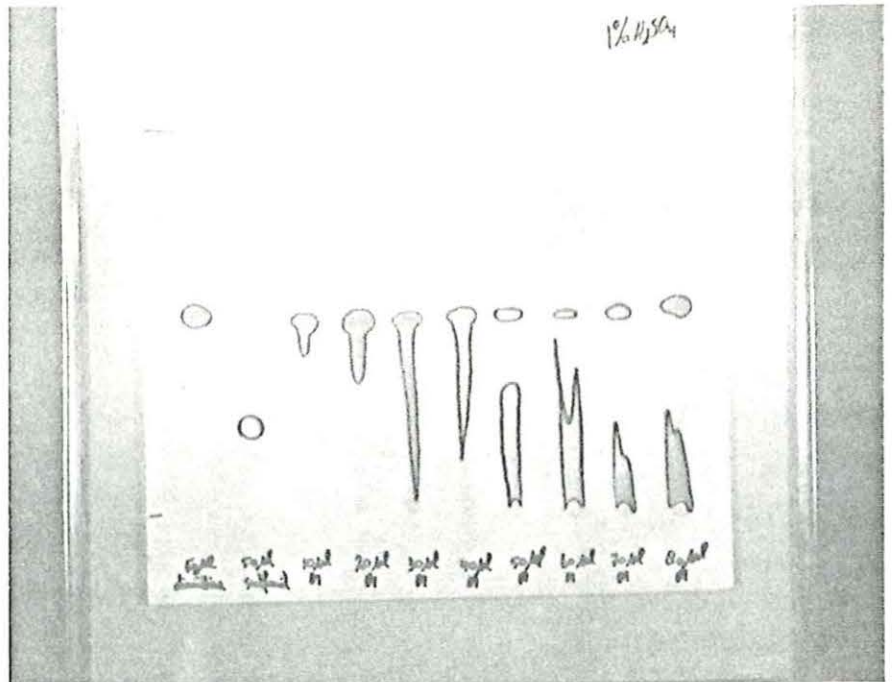


fig. 6

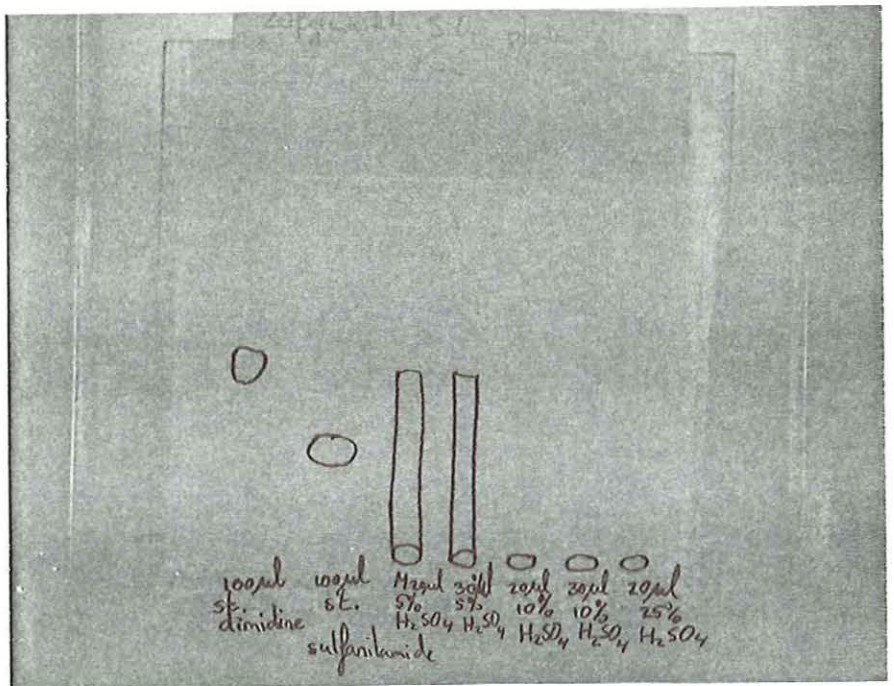


fig. 7

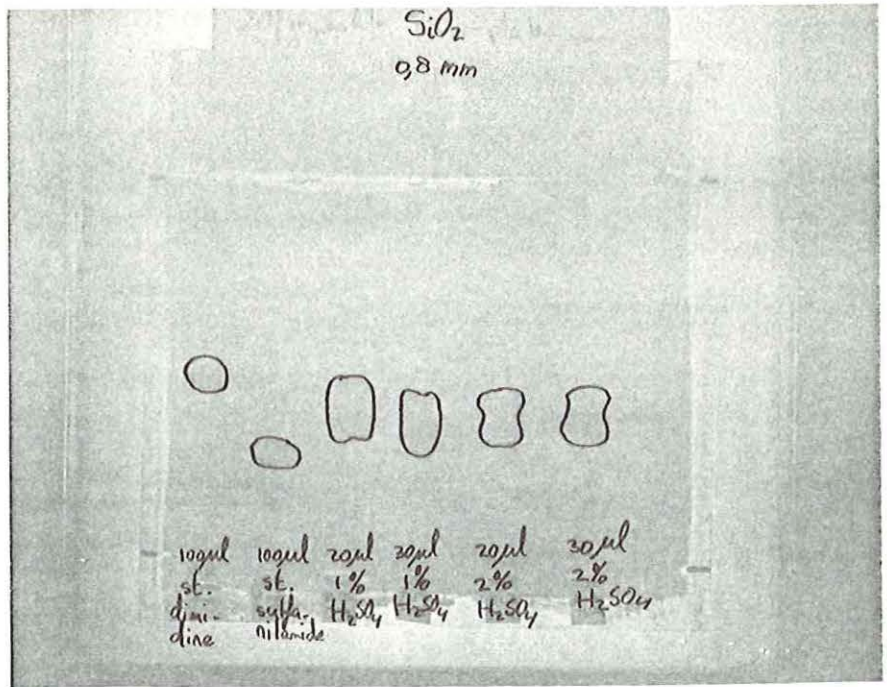


fig. 8

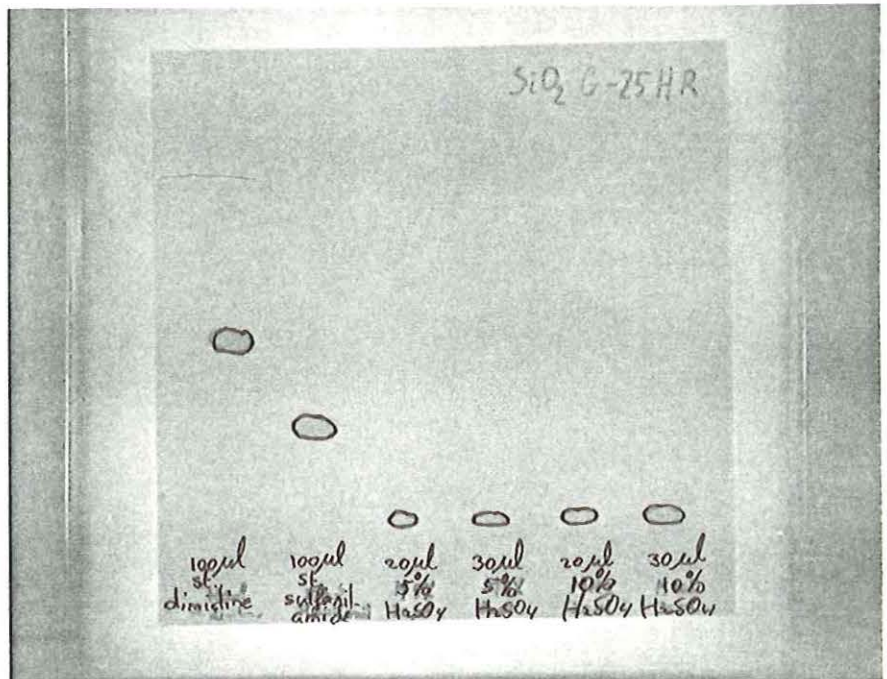


fig. 9

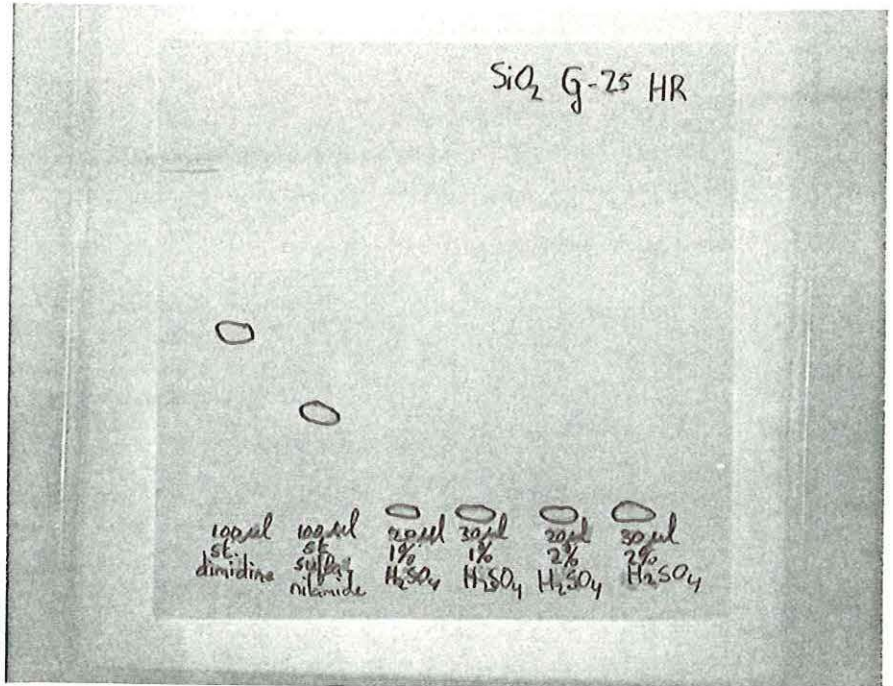


fig. 10

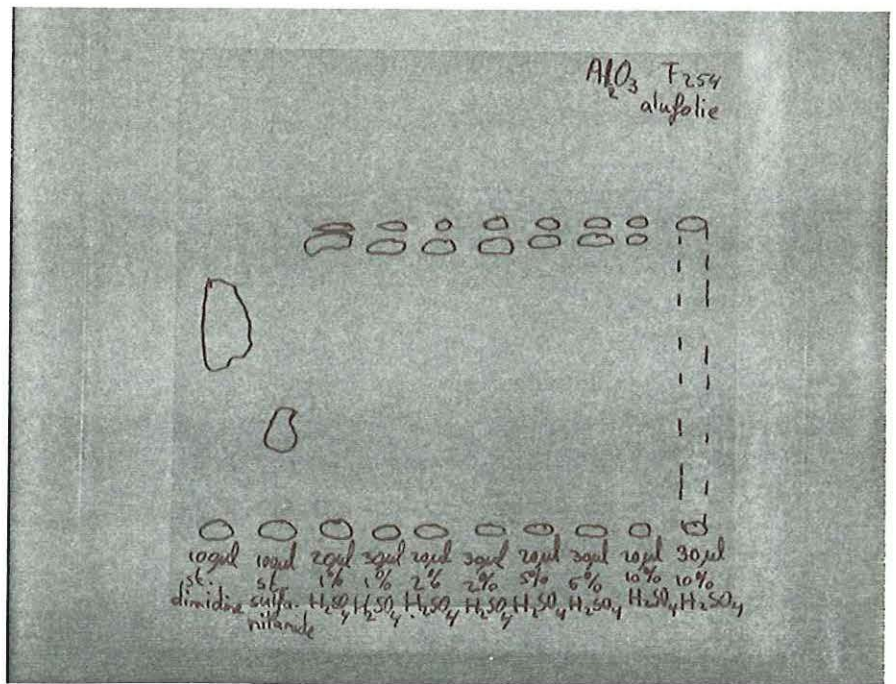


fig. 11

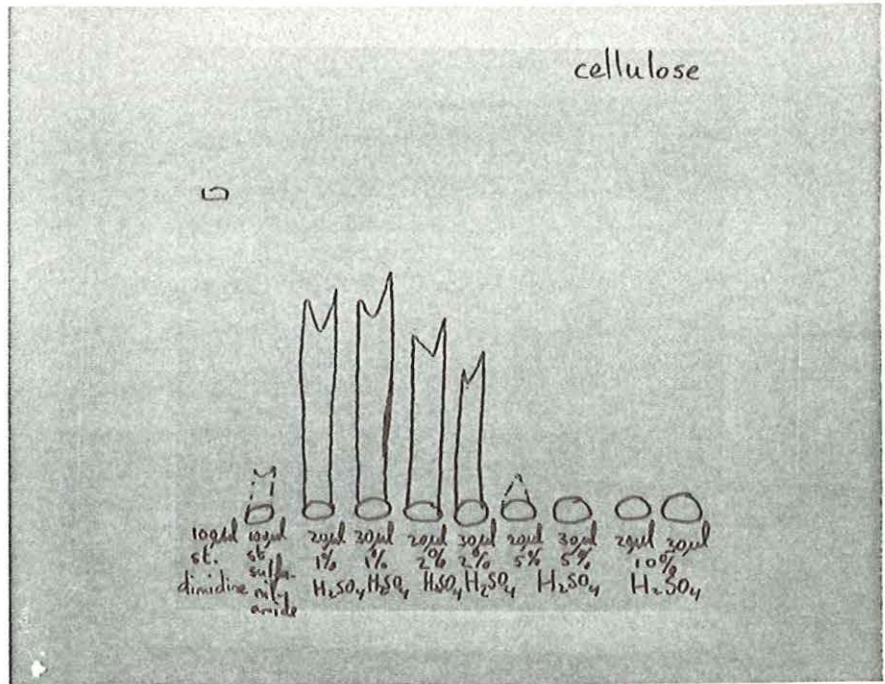


fig. 12

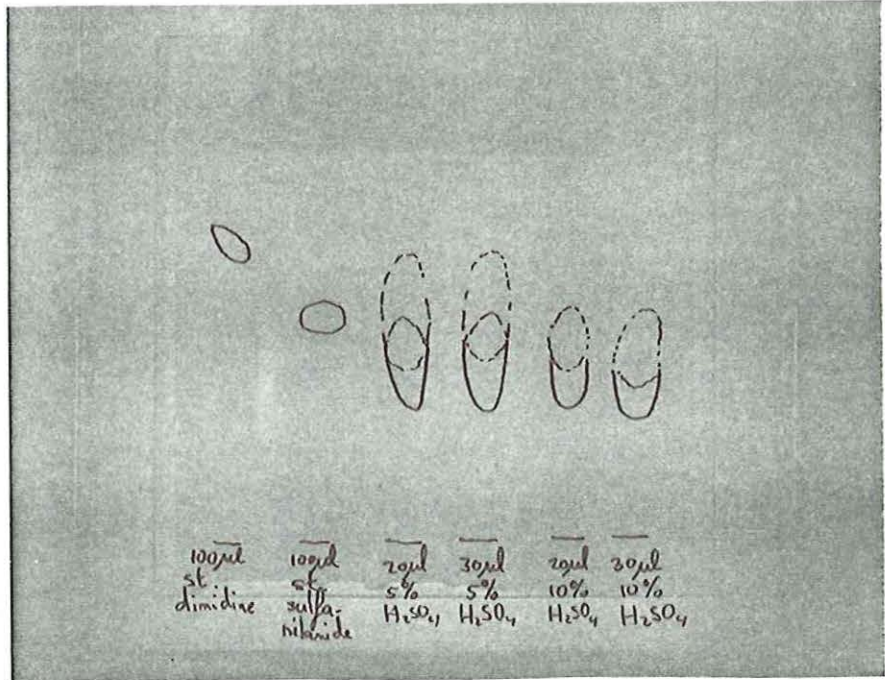


fig. 13

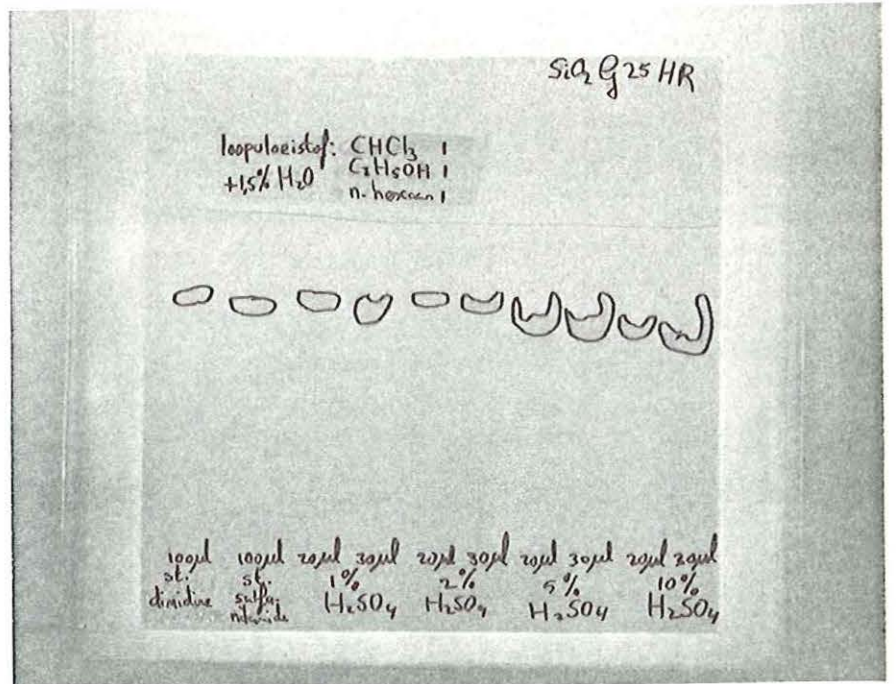


fig. 14

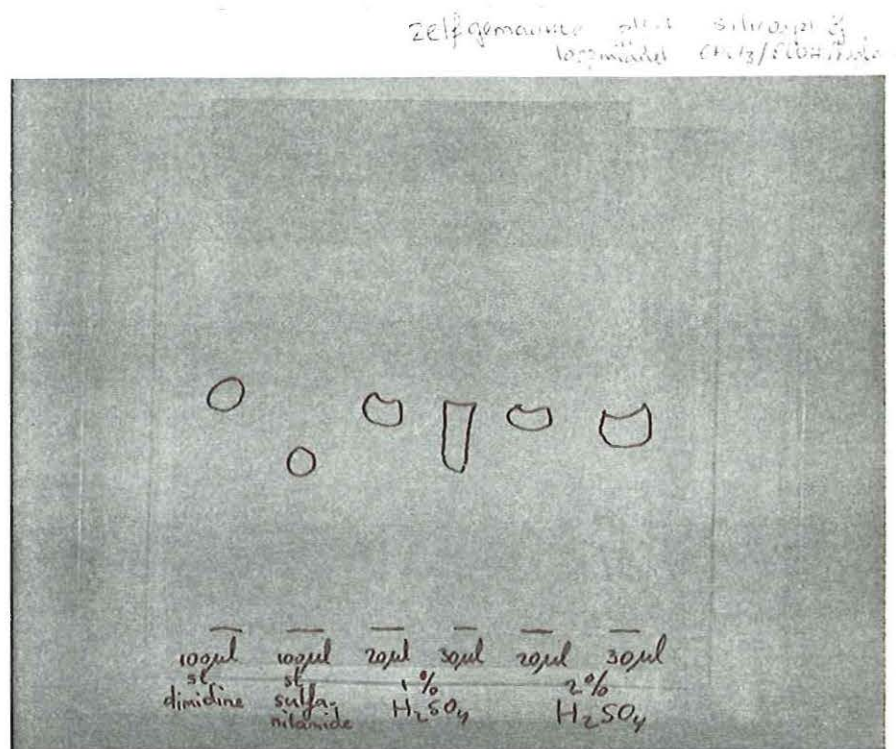


fig. 15

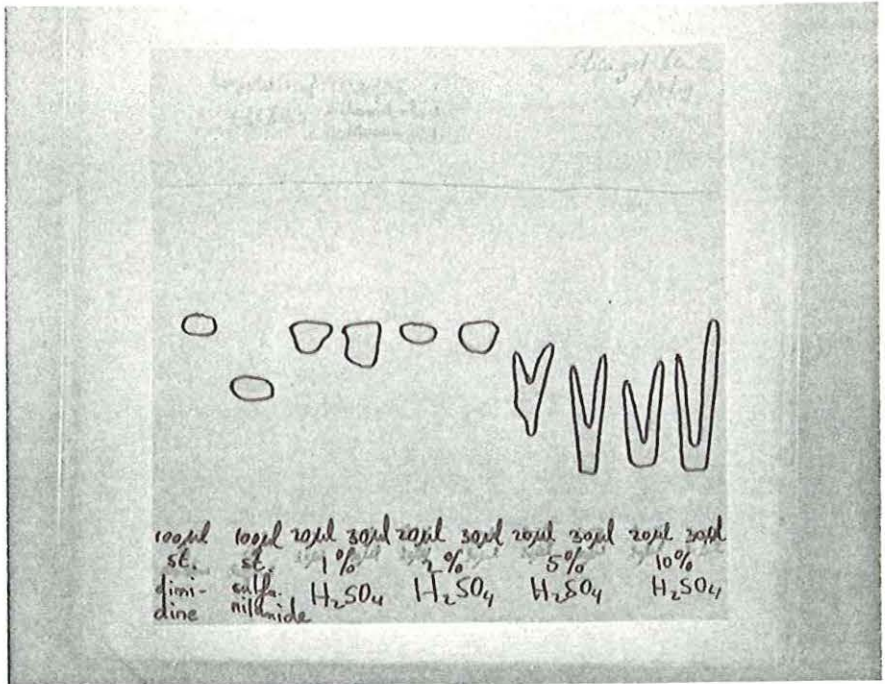


fig. 16

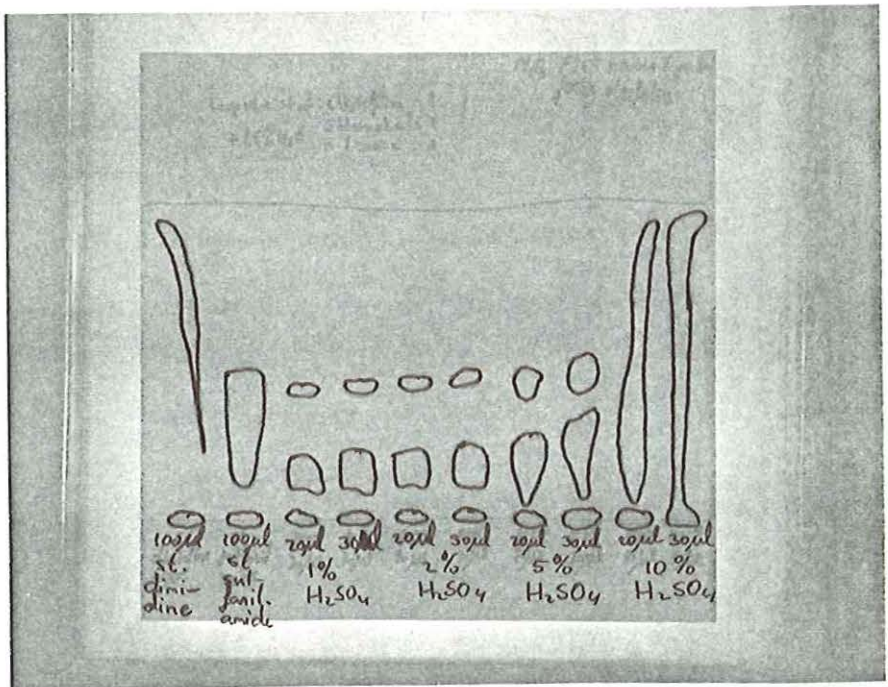


fig. 17

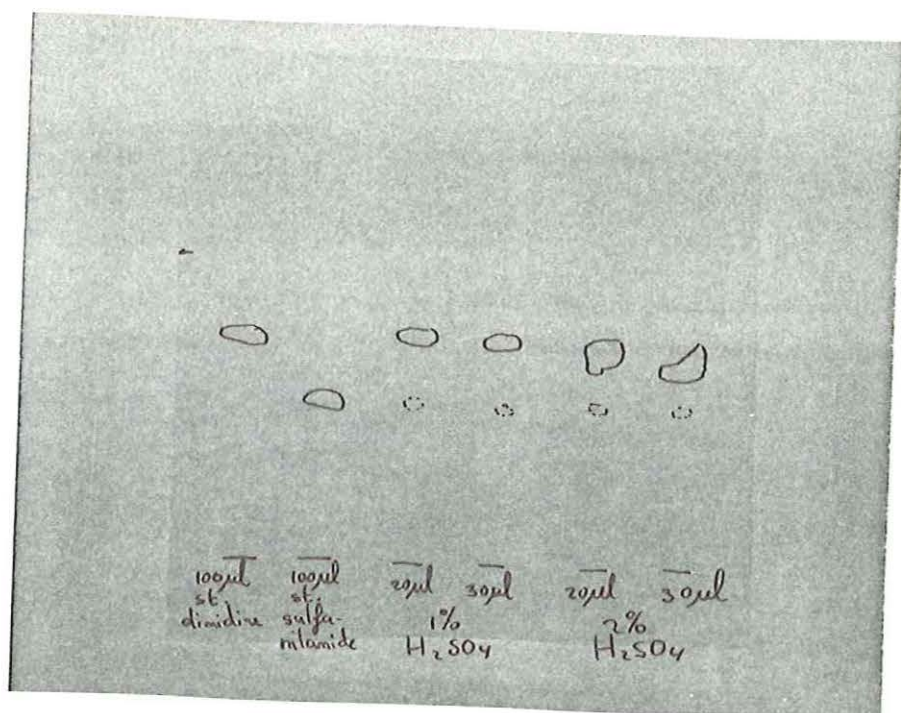


fig. 18

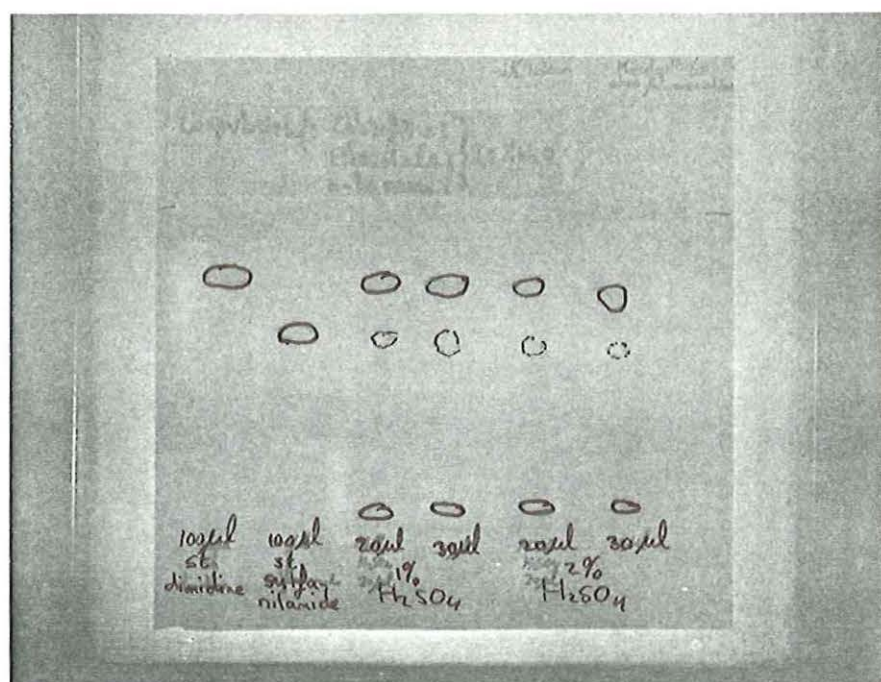




fig. 19

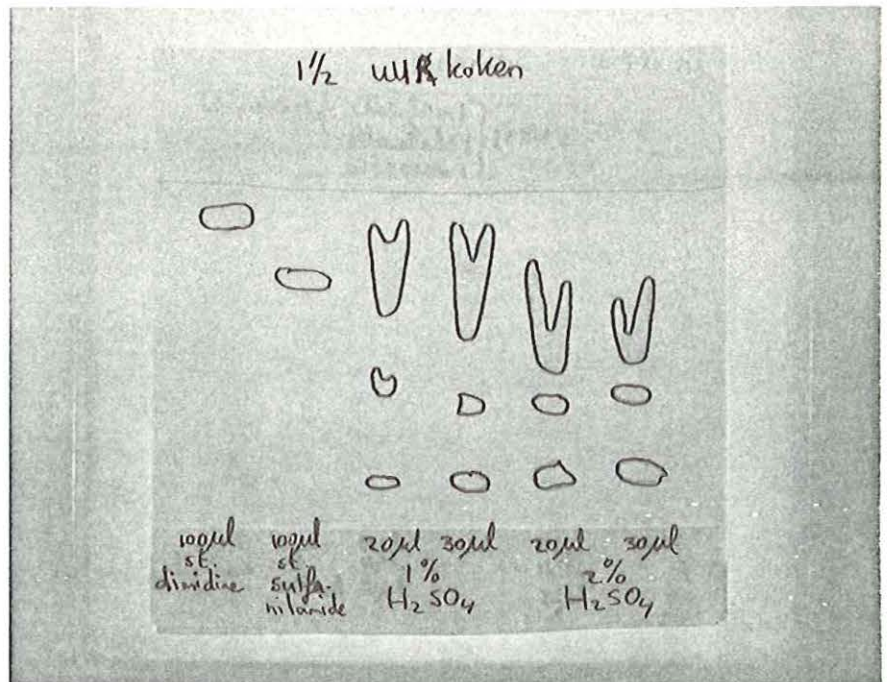


fig. 20

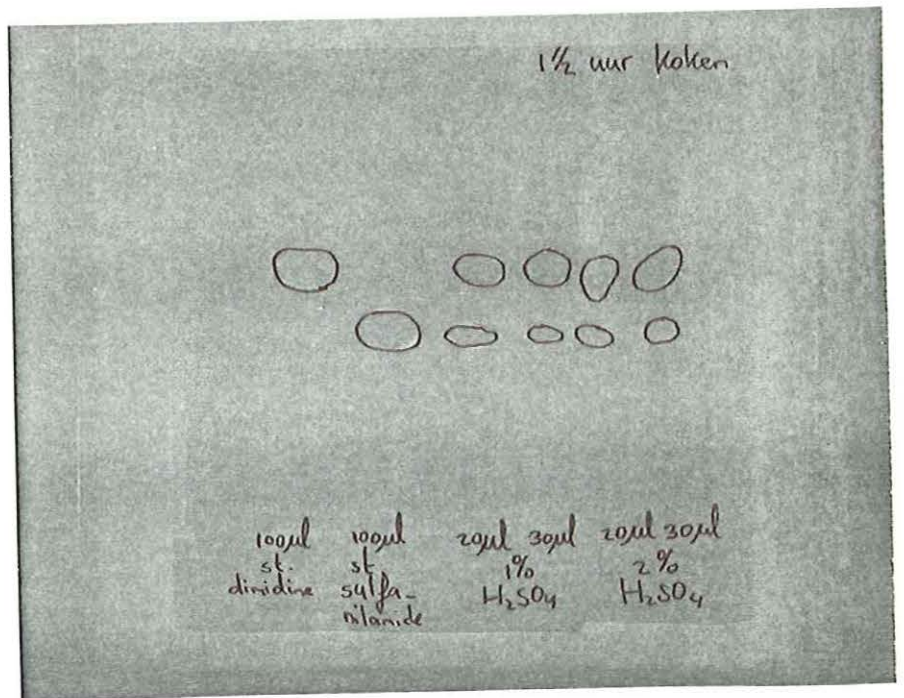


fig. 21

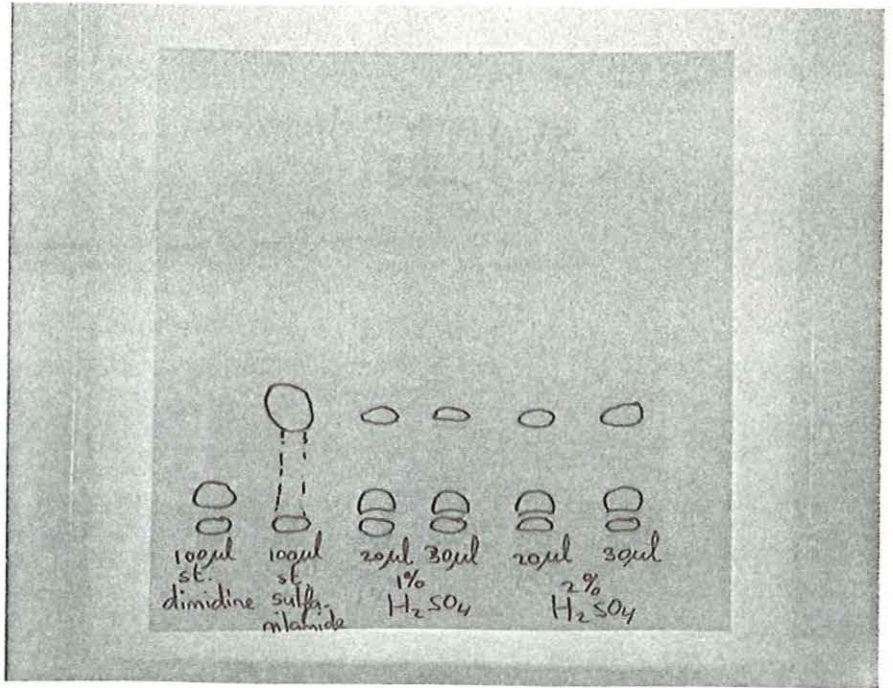


fig. 22

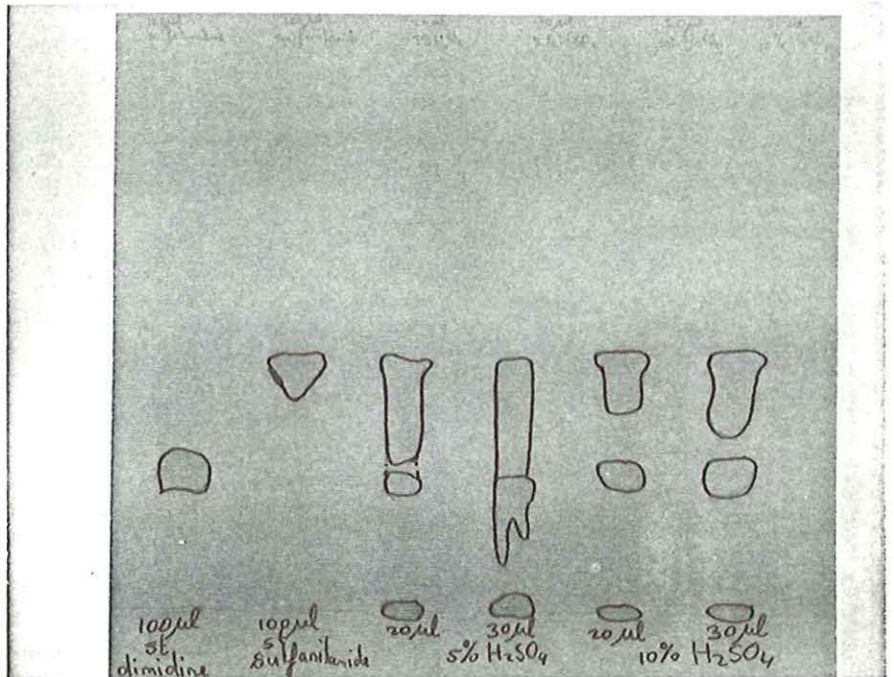


fig. 23

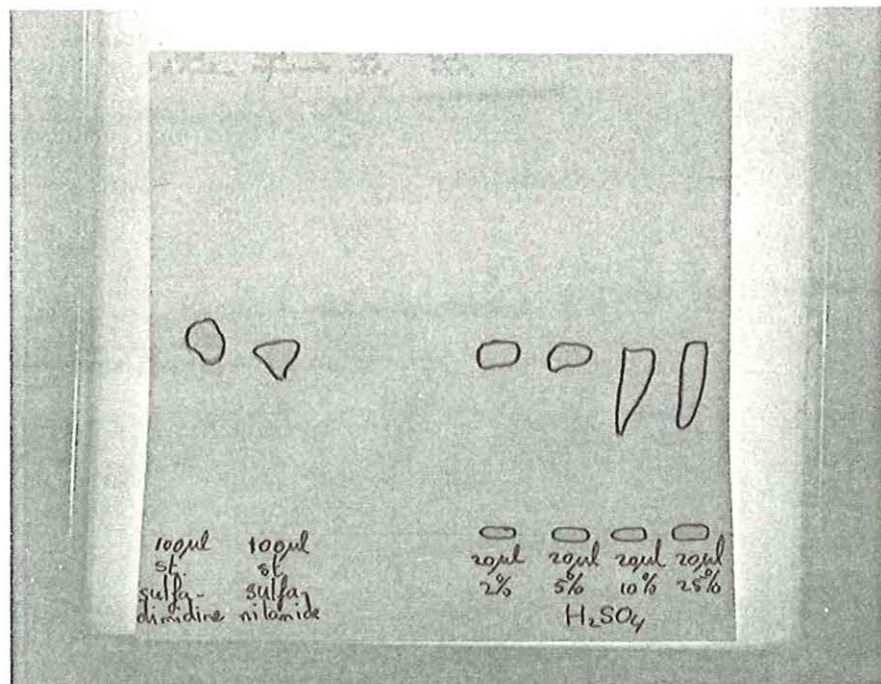
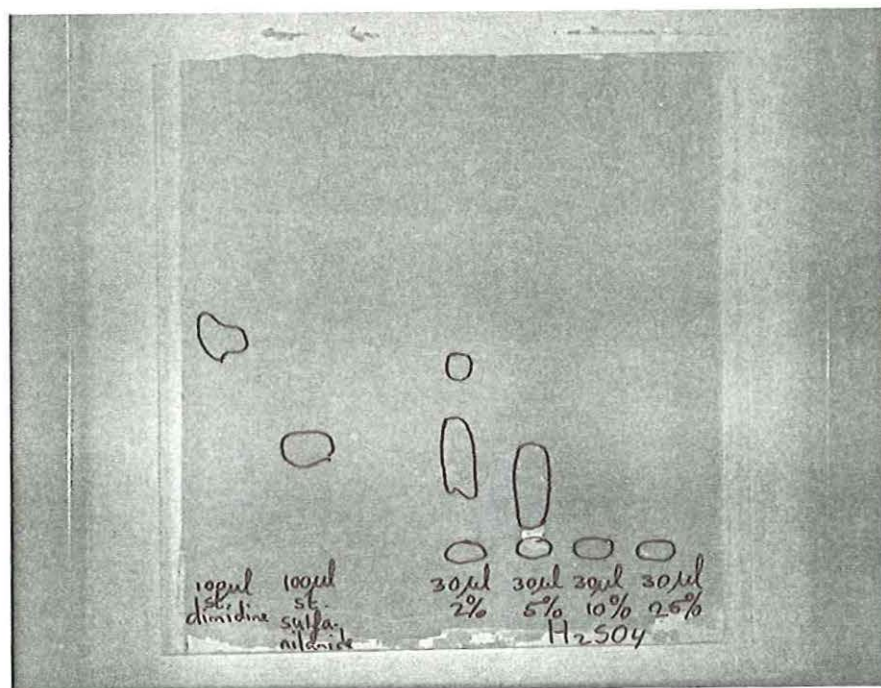
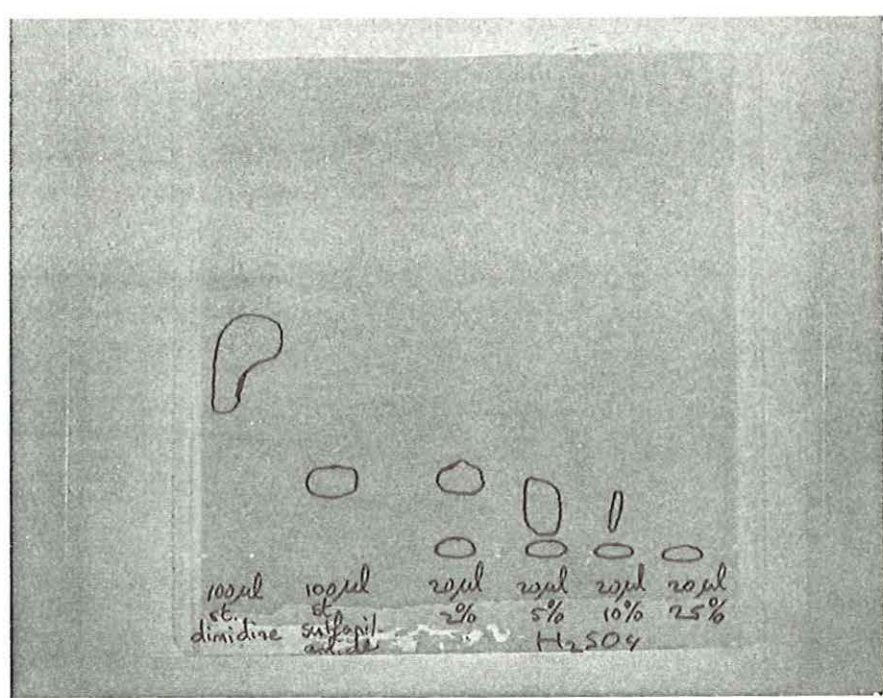


fig. 24



25



100ul et. dimidine  
100ul et. sulfapil. act. de  
20ul 2%  
20ul 5%  
20ul 10%  
20ul 25%  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>