

Projectnr.: 71.512.12

Ontwikkeling en implementatie van geïntegreerde onderzoeksanpak voor agrarische hulpstoffen, verontreinigingen en contaminanten in agrarische producten en het milieu.

Projectleider: J.A. van Rhijn

Rapport 2000. 008

september 2000

Ontwikkeling van een vloeistofchromatografische methode voor de bepaling van residuen van ivermectine in vlees, lever, nier, vet en melk.

W.M.J. Beek en H.J. Keukens

Afdeling NRC

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717

Copyright 2000, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

projectleider

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Centraal Laboratorium – Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

ABSTRACT

Ontwikkeling van een HPLC methode voor de bepaling van residuen van ivermectine in vlees, lever, nier, vet en melk.

Development of a HPLC method for the determination of residues of ivermectin in meat, liver, kidney, fat and milk.

Report 2000.008 september 2000

W.M.J. Beek en H.J. Keukens

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT) P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

10 figures, 5 annexes, 20 references

A procedure is described for the analysis of ivermectin in meat, liver, kidney, fat and milk using liquid chromatography with fluorescence detection. Ivermectin is isolated from biological matrices with an organic solvent. The extract is cleaned by solid phase extraction. After derivatization of ivermectin with 1-methylimidazole and trifluoroacetic anhydride, the content of ivermectin is estimated with HPLC and fluorescence detection. With the procedure, residues of ivermectin - could be determined in meat, liver, kidney, fat of cattle, pig or sheep and milk. The limit of quantitation is established to 0.5 µg/kg for all matrices. This limit of determination is far below the EC tolerance level. The EC tolerance level (EG - 2901/93) for liver and fat of sheep, pigs and horses is resp. 15 µg/kg and 20 µg/kg. The EC tolerance level for liver and fat of cattle is resp. 100 µg/kg and 40 µg/kg. The mean recovery of the method is 94% with a coefficient of variation between 1.1% and 13.4%.

Keywords: HPLC, Meat, Liver, Kidney, Fat, Milk, Determination, Analysis, Residues, Ivermectin, Anthelmintic, Avermectin.

INHOUD	blz.
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MATERIALEN EN METHODE	7
2.1 Reagentia en oplossingen	7
2.2 Instrumenten en materialen	8
2.3 Monsteropwerking	8
2.3.1 Extractie	8
2.3.2 Opzuivering en concentrering	8
2.3.3 Derivatisering	8
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	9
3.1 Chromatografie	9
3.2 Detectie	9
3.3 Monstervoorbereiding	10
3.3.1 Extractie	10
3.3.2 Zuivering en concentratie	10
3.3.3 Derivatisering	11
3.4 Karakterisering van de methode	11
3.4.1 Lineariteit standaarden	12
3.4.2 Selectiviteit	12
3.4.3 Toepasbaarheid	12
3.4.4 Herhaalbaarheid	12
4 CONCLUSIES	13
LITERATUUR	
BIJLAGEN	
Bijlage 1: Storingsanalyse	
Bijlage 2: Gehaltebepaling	
Bijlage 3: Terugvindingspercentage	
Bijlage 4: Herhaalbaarheidstest	
Bijlage 5: Chromatogrammen	

SAMENVATTING

In dit rapport wordt de ontwikkeling van een opwerkings- en meetprocedure beschreven voor de bepaling van residuen van ivermectine in vlees, lever, nier, vet en melk. Ivermectine wordt met behulp van een organisch oplosmiddel uit het monster geïsoleerd. Aansluitend wordt het extract gezuiverd met "solid-phase" extractie. Hierna wordt ivermectine gederivatieerd met 1-methylimidazole en trifluorazijnzuur anhydride, waarna het gehalte wordt bepaald met behulp van HPLC met fluorescentie-detectie. Met de procedure kan ivermectine worden bepaald in vlees, lever, nier en vet van runderen, kalveren, varkens en schapen en in melk. De bepaalbaarheidsgrens voor ivermectine in biologische matrix werd vastgesteld op 0,5 µg/kg. Deze waarde ligt ver beneden de EG tolerantiegrens (Verordening 2901/93). De EG tolerantiegrens voor lever en vet van schapen, varkens en paardenachtigen is resp. 15 µg/kg en 20 µg/kg. De EG tolerantiegrens voor lever en vet van runderen is resp. 100 µg/kg en 40 µg/kg. Het terugvindingspercentage van de methode ligt gemiddeld op 94% met een variatiecoëfficiënt tussen 1,1% en 13,4%.

1 INLEIDING

Ivermectine is een anthelminticum (antiwormmiddel) dat wordt ingezet bij de behandeling van rundvee, schapen, varkens of paarden. Het middel bestaat uit een mengsel van ongeveer 80% 22,23-dihydroavermectine B1a (H_2B_{1a}) en 20% 22,23-dihydroavermectine B1b (H_2B_{1b}). Het wordt aan de dieren verstrekt via een pasta, drench, bolus of subcutane injectie (Chiu e.a., 1987). Ivermectine heeft als voordeel boven andere anthelmintica dat het een lang aanhoudende werking heeft. Het middel wordt in het lichaam van de dieren niet volledig afgebroken of omgezet in metabole producten maar grotendeels via de gal weer in het maagdarmkanaal opgenomen waarna het uitgescheiden wordt via de feces. Ivermectine wordt slechts gedeeltelijk gemetaboliseerd (<50%) (Bogan e.a., 1988; Toutain e.a., 1988; Chiu e.a., 1986, 1988, 1990).

Gelet op de lange werkingsduur is controle op de aanwezigheid van residuen van het middel in consumeerbare producten van landbouwhuisdieren gewenst. Door de EG is in de verordening EG, 2901/93 voor ivermectine een maximum toelaatbaar gehalte in lever en vet van schapen, varkens en paardachtigen van resp. 15 $\mu\text{g/kg}$ en 20 $\mu\text{g/kg}$ opgegeven. Voor lever en vetweefsel van runderen geldt een tolerantiegrens van resp. 100 $\mu\text{g/kg}$ en 40 $\mu\text{g/kg}$.

Voor de bepaling van ivermectine wordt meestal gebruik gemaakt van hoge druk vloeistof-chromatografie. Hierbij wordt ivermectine direct of na derivatisering, bepaald. Bij de directe bepaling wordt gedetecteerd met UV. Hiervoor zijn enkele bepalingen beschreven in voeders en plasma (Schnitzerling e.a., 1985; Doherty, e.a. 1990).

Voor de bepaling van residuen wordt ten behoeve van een selectieve detectie eerst gederiviseerd waarna een HPLC analyse met een gevoelige en specifieke fluorescentie detectie mogelijk is (Schenck, 1992; Reising, 1992; Kijak, 1992; Markus, 1992; Norlander e.a., 1990; Oehler e.a., 1989; Tway e.a., 1981; Prabhu e.a., 1991). Bij deze residumethoden zijn detectielimieten beschreven tussen 0,5 en 2 $\mu\text{g/kg}$.

Kenmerk en de nadelen van deze residumethoden zijn de vrij bewerkelijke monsteropwerking, langdurige derivatiseringstijd en de benodigde clean-up met behulp van een SPE silica cartridge om het bereide derivaat te isoleren.

Er is echter (De Montigny e.a., 1990) een gewijzigde derivatisering beschreven. Deze derivatisering is snel en er is geen clean-up van het derivaat noodzakelijk.

Doel van het onderzoek was een eenvoudige uniforme opwerkings- en detectieprocedure te ontwikkelen voor de bepaling van residuen van ivermectine in zowel vlees, lever, nier, vet als melk.

In dit rapport wordt het onderzoek beschreven dat is verricht naar de mogelijkheid om via een korte monsteropwerking met behulp van een SPE cartridge en aansluitend pre-column derivatisering volgens de procedure van de Montigny e.a. ivermectine te bepalen.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Reagentia en oplossingen

Alle toegepaste chemicaliën zijn van p.a. kwaliteit, tenzij anders aangegeven. Met water wordt bedoeld gedemineraliseerd water gezuiverd met behulp van een Milli-Q zuiveringssysteem, minimale weerstand: 10 Megaohm. cm^{-1} .

Acetonitril; Methanol; Ivermectine; 1-Methylimidazole, 50% in acetonitril; Triethylamine; Trifluorazijnzuuranhydride, 33% in acetonitril; Conditioneringsoplossing: water-acetonitril-triethylamine (700-300-1 v/v/v); HPLC eluens: acetonitril-methanol-water (475-475-50 v/v/v).

2.2 Instrumenten en materialen

Bij de monsteropwerking:

Analytische balans met nauwkeurigheid van 0.1 mg (b.v. Mettler HL 52), bovenweger met nauwkeurigheid van 0,1 gr (b.v. Mettler PM 460), coolspin centrifuge (MSE), evaporator (Pierce), vortex (model VF 1 IKA), Baker SPE systeem (Baker), Octyl (C-8) cartridges (Baker art. 7087-06), Octadecyl (C-18) cartridges (Baker art. 7020-06), Silica cartridges (Baker art. 7087-06), Stomacher lab-blender model 400 (Lameris) met Seward stomacherzakken (art. BA 6041).

Het HPLC systeem:

HPLC-pomp (b.v. Model 6000A, Waters), injectieautomaat (b.v. Gilson model 231), UV/Vis detector (b.v. Model 9050, Varian), Fluorescentiedetector met dubbelzijdige monochromator (b.v. Merck model F 1050), recorder dubbelpens (b.v. Model BD 41, Kipp), analytische kolom Chromspher C-18 (5 µm) 200 x 3 mm of Lichrospher 60 RP - select B (5 µm) 125 x 4 mm met een 10 x 2,1 mm I.D. voorkolom gevuld met Perisorb RP 8 (30-40 µm)(Merck).

Het eluensdebiet is 0,6 ml/min (of 0,8 ml/min bij Lichrospher kolom). Detectie met fluorescentie bij een excitatiegolflengte van 365 nm en een emissiegolflengte van 470 nm.

2.3 Monsteropwerking

2.3.1 Extractie

5,0 gram monster wordt in een stomacherzak met 20,0 ml acetonitril gemengd en gedurende 3 minuten geblend. Hierna wordt het extract in een polypropyleen centrifugebuis van 50 ml gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 4500 g (MSE-Coolspin). Van de bovenstaande oplossing wordt 15,0 ml gemengd met 50 µl triethylamine in een maatkolf van 50 ml. Deze wordt aangevuld met water, afgesloten en gemengd.

2.3.2 Opzuivering en concentrering

De oplossing van 50 ml wordt op een voorbereide C-8 cartridge (voorbereid met acetonitril en conditioneringoplossing gebracht. Met behulp van een Baker SPE afzuigstelsysteem wordt het geheel geleidelijk door de cartridge gezogen. Vervolgens enkele malen gespoeld met telkens 5 ml conditioneringoplossing. De cartridge wordt hierna doorgeblazen met 5 ml lucht. De componenten worden met 5 ml acetonitril van de droge cartridge geelueerd. Het eluaat wordt opgevangen in een polypropyleenbuis. Deze wordt verwarmd tot 60 °C en drooggedampt via overleiden van een stikstofstroom.

2.3.3 Derivatisering

Het residu wordt opgelost in 100 µl imidazoleoplossing. Hierna wordt 150 µl TFAA-oplossing toegevoegd. De buis wordt direct afgesloten en met behulp van een vortex gemengd. Na 30 seconden wordt 750 µl acetonitril toegevoegd en gemengd met behulp van een vortex. De oplossing wordt overgebracht in een voor daglicht afgeschermd monstervaatje. Van deze oplossing wordt 50 µl in de HPLC gebracht.

Voor bepaling van de concentratie worden standaardoplossingen in methanol met concentraties van 0,01 tot 0,1 µg/ml aan ivermectine in een polypropyleenbuis gebracht, afgedampt en aansluitend op een zelfde wijze gederiviseerd en geanalyseerd als de monsters.

Opm: De derivatisering kan geautomatiseerd uitgevoerd worden via de injectieautomaat met een geschikt programma. Het ingedampte extract wordt opgelost in acetonitril. Deze oplossing wordt in het monsterrek van de injectieautomaat geplaatst en vervolgens worden de derivatiseringsoplossingen imidazole en TFAA achtereenvolgens in het monstervaatje gebracht en gemengd. Van deze oplossing wordt 50 µl in de HPLC geïnjecteerd.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Chromatografie

Ivermectine wordt meestal bepaald m.b.v. HPLC. Door Schnitzerling e.a., 1985 wordt een scheiding van ivermectine op een "normal phase" adsorbent beschreven. Het merendeel van de gepubliceerde werken beschrijven een "reversed phase" systeem. Hierbij wordt ivermectine eerst gederiviseerd (met trifluorazijnzuuranhydride of azijnzuuranhydride en 1-methylimidazole) en aansluitend gechromatografeerd (Prabhu e.a., 1991; Doherty e.a., 1990; Tway e.a., 1981; Oehler e.a., 1989; De Montigny e.a., 1990; Nordlander e.a., 1990; Markus e.a., 1992; Reising e.a.; Kijak, 1992; Schenck e.a., 1992). In deze studies werden kolommen gebruikt gevuld met C-8 of C-18 materiaal. Hierbij werden voornamelijk elutiemiddelen toegepast die bestonden uit een mengsel van methanol/water (97/3 v/v), acetonitril/methanol/water (45/45/10 v/v/v) of tetrahydrofuraan/acetonitril/water (40/40/20 v/v/v).

Op basis van deze gegevens werd de toepassing van C-18 kolommen onderzocht. Met een elutiemiddel dat bestond uit een mengsel van acetonitril/methanol/water (475/475/50 v/v/v), kon met een debiet van 0,6 ml/min op een Chromspher C-18 (200 * 3 mm) kolom een adequaat chromatografisch gedrag van gederiviseerd ivermectine worden verkregen. De twee componenten 22,23-dihydroovermectine B1a en 22,23-dihydroovermectine B1b bleken een basislijn scheiding te vertonen (bijlage 5).

Deze combinatie van eluens en kolom voldeed bij standaarden alsook bij het monsteronderzoek.

3.2 Detectie

Ongederiviseerd ivermectine kan alleen met UV worden gemeten. Het bezit een absorptiemaximum bij ca. 245 nm. Ivermectine kan worden gederiviseerd met azijnzuuranhydride in aanwezigheid van 1-methylimidazole tot een product dat zowel gedetecteerd kan worden met UV-absorptie alsook fluorescentie. Detectie van het gechromatografeerde derivaat vindt plaats met behulp van fluorescentie meting. Een maximum excitatiegolflengte van ca. 365 nm en een maximum emissiegolflengte van 470 nm werden vastgesteld. Het absorptiemaximum van het derivaat bij UV meting bedraagt ca. 360 nm.

Bij dezelfde chromatografische condities (concentratie 10 µg/ml) bleek detectie met fluorescentie meting ongeveer 1000 maal gevoeliger dan UV meting.

Bij monsteronderzoek werd gekozen voor derivatiseren van ivermectine en aansluitende analyse met behulp van HPLC met fluorescentie meting.

3.3 Monstervoorbereiding

Voor de monsteropwerking werd voor een korte en eenvoudige procedure gekozen. De monsteropwerking zoals die door Nordlander e.a. (1990) is beschreven voor de bepaling van ivermectine residuen in varkensweefsels werd getest. De opwerkingsprocedure van Nordlander e.a. berust op extractie met acetonitril, verdunnen met water en zuivering en concentratie over een "solid phase" (C-8 SPE) kolommetje, elutie met acetonitril, droogdampen en derivatisering met 1-methylimidazole-azijnzuuranhydride-dimethylformamide. Hierna volgt zuivering van het derivaat over een "solid phase" (silica SPE) kolommetje. Het gezuiverde derivaat is geschikt voor reversed phase HPLC analyse.

Deze methodiek werd aangepast en gewijzigd door dezelfde monster opwerkingsprocedure te volgen. Aansluitend werd gederiviseerd volgens de methode van De Montigny e.a. (1990) met trifluorazijnzuuranhydride en 1-methylimidazole. Zonder verdere opzuivering werd de oplossing met het derivaat onderworpen aan HPLC analyse.

3.3.1 Extractie

Ivermectine is een relatief apolaire stof die redelijk oplost in organische oplosmiddelen (Chiui e.a., 1987). Residuen van ivermectine worden met organische oplosmiddelen zoals methanol (Doherty e.a., 1990), ethanol (Schnitzerling e.a., 1985) of acetonitril (Oehler e.a., 1989; De Montigny e.a., 1990; Nordlander e.a., 1990) uit biologisch materiaal geïsoleerd.

Op basis hiervan werd voor acetonitril gekozen. Dit extractiemiddel bleek goed toepasbaar voor alle biologische matrices.

3.3.2 Zuivering en concentratie

Residuen van ivermectine kunnen uit een ruw extract geïsoleerd worden via SPE ("solid phase extraction") cartridges. Door Schenck e.a. (1992) werden voor leverextracten C-18 SPE-kolommetjes toegepast. Nordlander e.a. (1990) pasten bij de opzuivering van extracten van varkensvlees C-8 SPE-kolommetjes toe. Hieruit blijkt dat residuen van ivermectine zowel op C-18 alsook op C-8 materiaal kwantitatief werden vastgehouden. Er werd voor de procedure gekozen zoals die door Nordlander e.a. is beschreven.

Ivermectine werd uit de matrix geëxtraheerd met acetonitril. Hierna werd het extract ca. 3 maal verdund met water en aansluitend over een C-8 SPE-kolommetje geleid.

Om irreversibele adsorptie van ivermectine op de aanwezige silanolgroepen van het apolaire SPE adsorbent te reduceren wordt een kleine hoeveelheid triethylamine toegevoegd aan de verdunde extractievloeistof. De polaire groepen van het adsorbent worden hiermee gedesactiveerd. In dit onderzoek werd het eveneens met succes toegepast.

Nadat ivermectine is geconcentreerd op een C-8 SPE-kolom wordt deze gespoeld met een oplossing van water/acetonitril/triethylamine. Bij onderzoek van diverse matrices bleek spoelen met 5 ml van deze oplossing een recovery van ca. 60% op te leveren en bij naspoelen met 10 ml een recovery van 100%. Blijkbaar worden bij een grotere hoeveelheid spoelvloeistof meer storende componenten verwijderd die de verdere analyse, met name de derivatisering, kunnen beïnvloeden. Aansluitend werd ivermectine van de SPE kolom geelueerd met een organisch oplosmiddel. Door Nordlander e.a. werd hiervoor acetonitril toegepast. Ivermectine kan met een kleine hoeveelheid (5 ml) acetonitril kwantitatief van een C-8 kolommetje (Baker) worden geelueerd.

Bij de het testen van een C-18 pakking (Baker) volgens dezelfde procedure bleek bij monsteronderzoek ivermectine niet kwantitatief van de SPE kolom te elueren. Er trad bij toepassing van een zelfde hoeveelheid elutiemiddel acetonitril een verlies van ca. 40% in recovery op. Bij gebruik van een groter volume acetonitril (10 ml) kon wel een adequaat terugvindingspercentage worden gerealiseerd. Echter, de achtergrond afkomstig van de matrix bleek groter bij gebruik van een C-18 kolommetje. Op basis van deze bevindingen werd gekozen voor de toepassing van C-8 kolommetjes.

3.3.3 Derivatisering

Het eluaat van de C-8 kolom wordt na elutie drooggedampt. Het residu wordt gederivatiseerd en hierna bepaald via HPLC met fluorescentie detectie

In de literatuur is de derivatisering van ivermectine door diverse auteurs beschreven (Stong, 1987; Nordlander e.a., 1990; Tway e.a., 1981; Tolan e.a., 1980; Prabhu e.a., 1991; Schenck e.a., 1992). Hierbij wordt een reactie uitgevoerd met 1-methylimidazole-azijnzuuranhydride in dimethylformamide bij 95 °C gedurende 60 minuten. Bij deze reactie worden alle drie de hydroxyl-groepen van ivermectine geacetylerd met azijnzuuranhydride in aanwezigheid van de basische katalysator 1-methylimidazole. Aansluitend ondergaat het product dehydratatie waarbij een fluorescerend derivaat wordt gevormd. Het reactiemengsel bevat echter bijproducten die een extra clean-up noodzakelijk maken om het ivermectine-derivaat te isoleren.

Door De Montigny e.a. (1990) wordt bij de bepaling van ivermectine in dierlijk plasma een reactie beschreven met trifluorazijnzuuranhydride en 1-methylimidazole in acetonitril. Er treedt een zelfde reactie op maar het reactiemengsel is vrij van storende bijproducten zodat geen extra clean-up noodzakelijk is. De reactie is snel (30 sec) en kan worden uitgevoerd bij kamertemperatuur. Het reactiemengsel bleek direct zonder voorafgaande clean-up, te injecteren in de HPLC. Er werden onder de gekozen omstandigheden geen storende bestanddelen waargenomen.

Deze procedure voor derivatisering van ivermectine werd in het onderhavige onderzoek gekoppeld met de beschreven extractieprocedure.

Het bleek dat het gevormde ivermectine-derivaat zeer gevoelig is voor licht. Bij blootstelling aan daglicht/kunstlicht nam de concentratie van het derivaat in oplossing reeds na enkele minuten af onder vorming van een component welke in het HPLC chromatogram eerder elueert dan de componenten van het derivaat. Bij ongederivatiseerd ivermectine werd geen afname in concentratie geconstateerd onder invloed van daglicht. Volledige afscherming van het ivermectine-derivaat voor licht bleek noodzakelijk. Snelle analyse na bereiding van het derivaat bleek het enige alternatief. Automatische additie, met behulp van een geschikte auto-injector, van de reagentia aan het monsterresidu opgelost in acetonitril biedt goede perspectieven.

Door onderzoekers (Schenck e.a. (1992)) werd binding aan het glaswerk geconstateerd.

In het beschreven onderzoek kon dit niet eenduidig worden bevestigd. De derivatiseringsreactie kan uitgevoerd worden in zowel polypropyleen- alsook glasmateriaal. Mogelijk is de snelle afbraak van het derivaat als binding aan glaswerk gekarakteriseerd.

3.4 Karakterisering van de methode

Met de uiteindelijke methode werden verschillende experimenten uitgevoerd om de toepasbaarheid te bepalen.

3.4.1 Lineariteit standaarden

Het lineair gedrag van de ivermectine derivaten in standaardoplossingen, in het concentratiegebied tussen 0,01 en 0,1 µg/ml, werd vastgesteld. De correlatiecoëfficiënt (R^2) voor meetsignaal versus de concentratie was 0,99987. Hierbij werd de grootste component nl. 22,23-dihydroavermectine B1a als marker component gemeten.

3.4.2 Selectiviteit

Om de mogelijke interferentie door andere diergeneesmiddelen vast te stellen werden een aantal middelen (na derivatisering) (zie bijlage 1) in het systeem geïnjecteerd. De concentratie van deze standaardoplossingen kwamen overeen met de aanwezigheid van 300 µg/kg van de desbetreffende component in biologische matrix. Geen van de verbindingen stoort de bepaling van ivermectine.

3.4.3 Toepasbaarheid

De toepasbaarheid van de methode werd getest door aan de diverse blanco matrices een bekende hoeveelheid ivermectine toe te voegen. De test werd uitgevoerd op een niveau van 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10 µg/kg. De monsters werden opgewerkt en geanalyseerd volgens boven beschreven procedure (2.4). Het gehalte werd bepaald aan de hand van externe standaarden die eveneens werden gederiviseerd. De resultaten staan in detail vermeld in bijlage 2.

Uit de verkregen gegevens blijkt dat er een lineair verband bestaat tussen de gevonden hoeveelheid ivermectine en de toegevoegde hoeveelheid ivermectine (correlatiecoëfficiënt tussen gevonden vs. toegevoegd >0,995) voor alle matrices.

De gevonden waarden zijn omgerekend naar terugvindingspercentage (recovery). Uit de verkregen waarden blijkt dat het terugvindingspercentage onafhankelijk is van de concentratie (bijlage 3). De laagst en hoogst gevonden waarde bedraagt resp. 82% en 114%. Het totaal gemiddelde bedraagt 94% met een variatiecoëfficiënt tussen 1,1% en 13,4%.

De methode voldoet aan de richtlijnen zoals gesteld in de EG waarbij een terugvindingspercentage wordt gehanteerd dat ligt tussen 70% en 115% (EC document 96/23).

De laagst gemeten concentratie van 0,5 µg/kg is vastgesteld als bepaalbaarheidsgrens. Voor blanco monsters ligt het signaal beneden een waarde van 0,1 µg/kg.

In de praktijk bleek bij onderzoek van varkenslevers soms een behoorlijke achtergrondstoring op te treden. Door gebruik van een LiChrospher 60 RP-select B (125 x 4mm) 5 µm (Merck) analytische kolom i.p.v. een Chromspher C-18 kolom kon deze storing worden vermeden (Cerkvenik, 1994).

Er kan worden geconcludeerd dat de bepaalbaarheidsgrens voor ivermectine lager ligt dan de voorgestelde tolerantiegrenzen.

De methode bleek toepasbaar in de praktijk. Voorbeelden van HPLC chromatogrammen verkregen voor de verschillende matrices staan weergegeven in bijlage 5.

3.4.4 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid voor de bepaling van ivermectine is getest op enkele matrices. Hiertoe werd ivermectine op een laag niveau toegevoegd aan tien blanco monsters. De monsters werden geanalyseerd volgens de procedure in hoofdstuk 2. De verkregen resultaten staan in detail vermeld in bijlage 4.

Het gemiddeld gevonden terugvindingspercentage voor rundvet bedraagt 87% (VC=5,2%), voor varkenslever 96% (VC=2,8%), voor varkensnier 101% (VC=5,3%) en voor rundvlees 103% (VC=4,8%).

De methode voldoet aan de eisen voor acceptatie waarbij een variatiecoëfficiënt wordt gehanteerd die een maximum mag hebben van 15% (EC document 96/23).

4 CONCLUSIES

Met de beschreven procedure is het mogelijk residuen van ivermectine in vlees, lever, nier, vet en melk te bepalen met behulp van hogedruk vloeistofchromatografie met fluorescentiemeting. Hierbij wordt de component 22,23-dihydroaivermectine B1a (H₂B₁a) van ivermectine als target component gebruikt.

De methode voldoet voor matrices van varkens, runderen en schapen. Het gemiddelde terugvindingspercentage ligt op 94% met een variatiecoëfficiënt tussen 1.1% en 13.4%. De laagst gemeten concentratie van 0,5 µg/kg werd vastgesteld als de bepaalbaarheidsgrens. Deze bepaalbaarheidsgrens ligt beduidend lager dan de voorgestelde tolerantiegrenzen.

LITERATUUR

Bogan, J.A. and McKellar, Q.A.

The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle.

J. vet. Pharmacol. Therap., 11 (1988) 260-268.

Cerkvenik, V.

Report of training and updating at the State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT), Wageningen, The Netherlands

April - June 1994

Chiu, S.H.L., Sestokas, E. and Taub, R.

Application of two-dimensional high performance liquid chromatography in metabolism studies of ivermectin.

J. Chromatogr., 433 (1988) 217-224.

Chiu, S.H.L., Sestokas, E., Taub, R., Green, M.L., Baylis, F.P., Jacob, T.A. and Lu, A.Y.H.

Metabolic Disposition of Ivermectin in Swine.

J. Agric. Food Chem., 38 (1990) 2079-2085.

Chiu, S.H.L., Sestokas, E., Taub, R., Buhs, R.P., Green, M., Sestokas, R., Vandenheuvel, W.J.A., Arison, B.H. and Jacob, T.A.

Metabolism Disposition of Ivermetin in Tissues of Cattle, Sheep, and Rats.

Drug Metabolism and Disposition, 14 (1986) 590-606.

Chiu, S.H.L., Taub, R., Sestokas, E., Lu, A.Y.H. and Jacob, T.A.

Comparative in vivo and in vitro metabolism of ivermectin in steers, sheep, swine, and rat.

Drug Metabolism Reviews, 18 (1987) 289-302.

De Montigny, P., Shim, J.S.V. and Pivnichny, J.V.

Liquid Chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent.

J. Pharm. Biomed. Anal., 8 (1990) 507-511.

Doherty, S.J., Fox, A. and Fink, D.W.

Determination of Ivermectin in Medicated Swine Feeds at the 2 ppm Concentration Level.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73 (1990) 931-934.

Kijak, P.J.

Liquid Chromatographic Determination of Ivermectin in Bovine Milk: Interlaboratory Study.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (1992) 747-750.

Markus, J. and Sherma, J.

Method I. Liquid Chromatographic/Fluorescence Determination of Ivermectin in Animal Tissue and Plasma.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (1992) 757-767.

Markus, J. and Sherma, J.

Method II. Liquid Chromatographic/Fluorescence Confirmatory Assay of Ivermectin in Cattle, Sheep, and Swine Liver Tissues.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (1992) 767-771.

Nordlander, I. and Johnsson, H.

Determination of Ivermectin Residues in Swine Tissues - An Improved Clean-up Procedure using Solid Phase Extraction.

Food Additives and Contaminants, 7 (1990) 79-82.

Oehler, D.D. and Miller, J.A.

Liquid Chromatographic Determination of Ivermectin in Bovine Serum.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72 (1989) 59.

Prabhu, S.V., Wehner, T.A. and Tway, P.C.

Determination of Ivermectin Levels in Swine Tissues at the Parts per Billion Level by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.

J. Agric. Food Chem., 39 (1991) 1468-1471.

Reising, K.P.

Rapid Analysis for Ivermectin Residue in Liver and Muscle Tissue by Liquid Chromatography.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (1992) 751-753.

Schenck, F.J., Barker, S.A. and Long, A.R.

Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and Liquid Chromatographic Determination of Ivermectin in Bovine Liver Tissue.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 75 (1992) 655-658.

Schnitzerling, H.J. and Nolan, J.
Normal phase Liquid Chromatographic Determination of Nanogram Quantities of Ivermectin in Cattle Blood or Plasma.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 (1985) 36-40.

Stong, J.D.
Determination of Ivermectin by Fluorescence Detection.
Anal. Chem., 59 (1987) 266-270.

Tolan, J.W., Eskola, P., Fink, D.W., Mrozik, H. and Zimmerman, L.A.
Determinations of avermectines in plasma at nanogram levels using high performance liquid chromatography with fluorescence detection.
J. Chromatogr., 190 (1980) 367-376.

Toutain, P.L., Campan, M., Galtier, P. and Alvinerie, M.
Kinetic and insecticidal properties of ivermectin residues in the milk of dairy cows.
J. vet. Pharmacol. Therap., 11 (1988) 288-291.

Tway, P.C., Woods, J.S. and Downing, G.V.
Determination of Ivermectin in Cattle and Sheep Tissues Using High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection.
J. Agric. Food Chem., 29 (1981) 1059-1063.

Commision Decision laying down analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animals and animal products according to Council Directive 96/23/EC
European Commision Derectorate Generalo For Agriculture VI B II 2.

Bijlage 1

Overzicht van diergeneesmiddelen welke de bepaling van ivermectine niet storen.

lasalocid	olaquinox	sulfadoxine
oxfendazol	dimetridazol	sulfamethoxydiazine
albendazol	ronidazol	sulfadimethoxine
pyranteltartraat	carbadox	tiamfenicol
fenbendazol	doxycycline	nicarbazin
flubendazol	tetracycline	xylazine
mebendazol	oxytetracycline	acepromazine
levamisol	chloortetracycline	azaperon
nicarbazin	nitrofurazon	propionylpromazine
diclazuril	nitrofurantoïne	haloperidol
metichlorpindol	furaltadon	chloorpromazine
nifursol	furazolidon	carazolol
amprolium	sulfanilamide	azaperol
robenidine	sulfaquinoxaline	spiramycine
ethopabaaat	sulfamethoxazol	lincomycine
methylbenzoquaar	sulfapyridinum	erythromycine
dinitolmide	sulfathiazolum	oleandomycine
buquinolaar	sulfamethoxypyridazine	salinomycine
decoquinaar	sulfadimethoxine	benzylpenicilline
ipronidazol	sulfadimidine	virginiamycine
monensin	sulfadiazine	Zn-bacitracine
maduramycine	sulfachloorpyrazine	chlooramfenicol
trimethoprim	sulfaquinoxaline	narasin
	sulfadiazine	flumequin

Bijlage 2

Individuele resultaten van de gehaltesbepaling van ivermectine (gemeten als het derivaat van de component 22,23-dihydroaivermectine B1a) in verschillende biologische matrices in het concentratiegebied 0,5 - 10 µg/kg. De resultaten staan uitgedrukt in µg/kg ivermectine. De correlatiecoëfficiënt (R^2) tussen de gevonden vs. toegevoegde concentraties is berekend.

additieniveau in µg/kg	0,50	1,00	2,50	5,00	10,0	R^2
Matrix						
Rundvlees	0,51	0,99	2,62	4,56	9,18	0,9993
Runderlever	0,48	0,88	2,39	4,90	9,31	0,9996
Rundernier	0,48	0,94	2,32	4,73	9,48	0,9999
Varkensvlees	0,49	0,97	2,27	4,06	8,26	0,9995
Varkenslever	0,51	0,88	2,35	4,70	10,10	0,9993
Varkensnier	0,62	1,14	2,08	4,70	8,66	0,9985
Schapenvlees	0,42	0,88	2,18	4,54	9,08	0,9999
Rundvet	0,44	0,82	2,23	4,36	8,44	0,9998
Koeienmelk	0,50	0,98	2,50	5,00	9,77	0,9999

Bijlage 3

Het terugvindingspercentage (recovery) van de individuele resultaten van de bepaling (zie bijlage 2) van ivermectine (gemeten als het derivaat van de component 22,23-dihydroavermectine B1a) in verschillende biologische matrices in het concentratiegebied 0,5 - 10 µg/kg. De gemiddelde recovery (gem) en variatiecoëfficiënt (VC) is berekend.

additieniveau in µg/kg	0,50	1,00	2,50	5,00	10,00	Gem. %	VC %
Matrix							
Rundvlees	102	99	105	91	92	98	6,3
Runderlever	96	88	96	98	93	94	4,1
Rundernier	96	94	93	95	95	95	1,2
Varkensvlees	98	97	91	86	88	92	5,8
Varkenslever	102	88	94	94	101	96	6,0
Varkensnier	106	114	83	94	87	97	13,4
Schapenvlees	84	88	87	91	91	88	3,3
Rundvet	87	82	89	87	84	86	3,2
Koeienmelk	100	98	100	100	98	99	1,1

Bijlage 4

Individuele resultaten van de herhaalbaarheidstest van bepaling van ivermectine (gemeten als het derivaat van de component 22,23-dihydroavermectine B1a) in biologische matrices. De resultaten zijn uitgedrukt in $\mu\text{g/kg}$ ivermectine. De gemiddelde recovery en variatiecoëfficiënt (VC) daarvan zijn berekend.

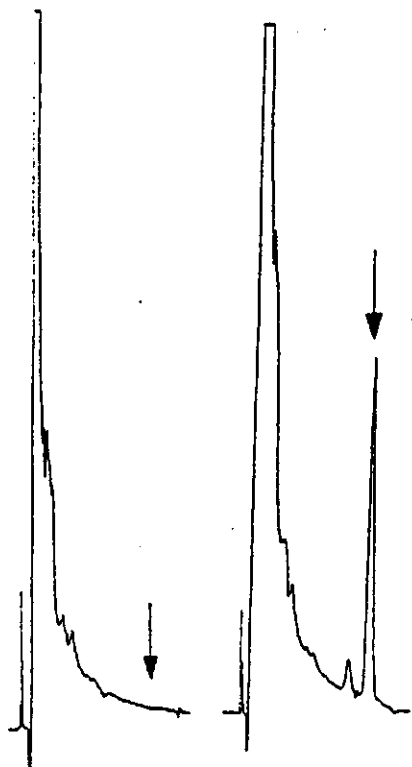
	Vet (rund) 15 $\mu\text{g/kg}$	Lever (varken) 10 $\mu\text{g/kg}$	Nier (varken) 5 $\mu\text{g/kg}$	Vlees (rund) 5 $\mu\text{g/kg}$
1	12,5	10,0	4,5	5,3
2	13,8	9,9	5,0	4,9
3	12,7	9,6	5,0	4,8
4	12,4	9,9	5,1	5,2
5	14,3	9,8	5,5	4,8
6	12,4	9,3	5,2	5,4
7	13,6	9,3	5,1	5,5
8	12,5	9,8	5,3	5,2
9	13,0	9,4	4,8	5,0
10	12,6	9,4	5,0	5,2
Gemiddelde	13,0	9,6	5,1	5,1
Gemiddelde recovery %	87	96	101	103
Variatiecoëfficiënt (VC) in %	5,2	2,8	5,3	4,8

Bijlage 5

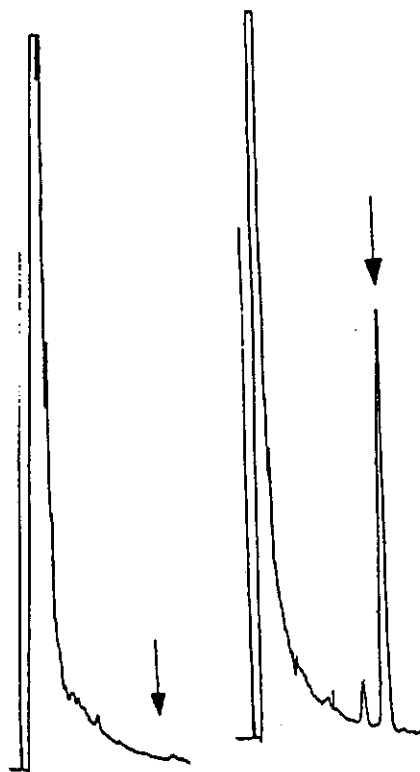
HPLC chromatogrammen van de bepaling van ivermectine met fluorescentiedetectie (gemeten het derivaat van de component 22,23-dihydroavermectine B1a) in biologische matrices. Gemeten bij verschillende analyse-runs.

Analyseomstandigheden : zie hoofdstuk 2
Analysetijd : 30 min

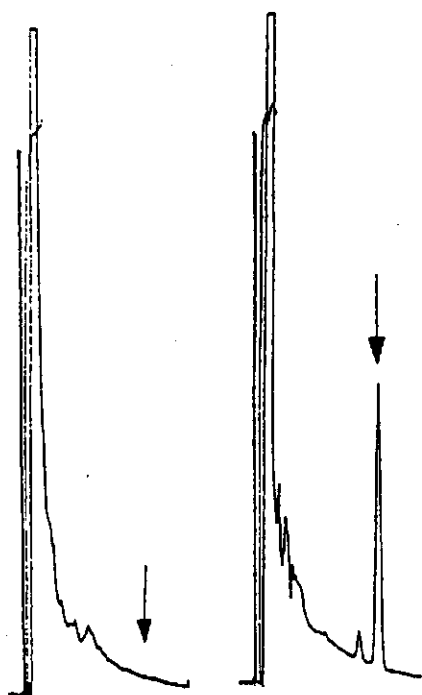
- figuur 1 : blanco rundvlees en rundvlees + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 2 : blanco schapenvlees en schapenvlees + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 3 : blanco kalfsvlees en kalfsvlees + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 4 : blanco varkensvlees en varkensvlees + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 5 : blanco varkenslever en varkenslever + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 6 : blanco varkensnier en varkensnier + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 7 : blanco runderlever en runderlever + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 8 : blanco rundernier en rundernier + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 9 : blanco melk en melk + 5 µg/kg ivermectine
- figuur 10 : blanco rundervet en rundervet + 5 µg/kg ivermectine



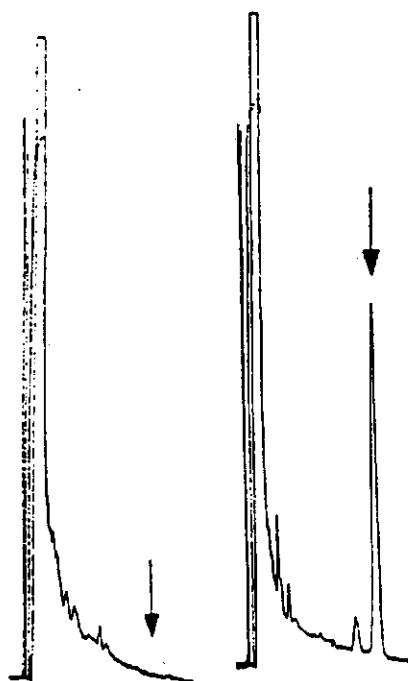
figuur 1



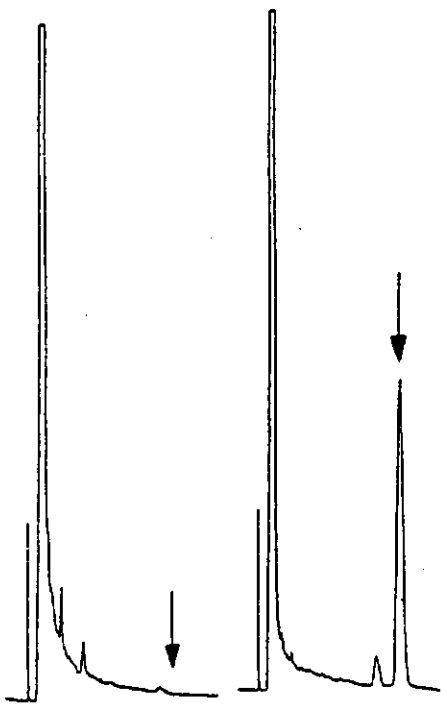
figuur 2



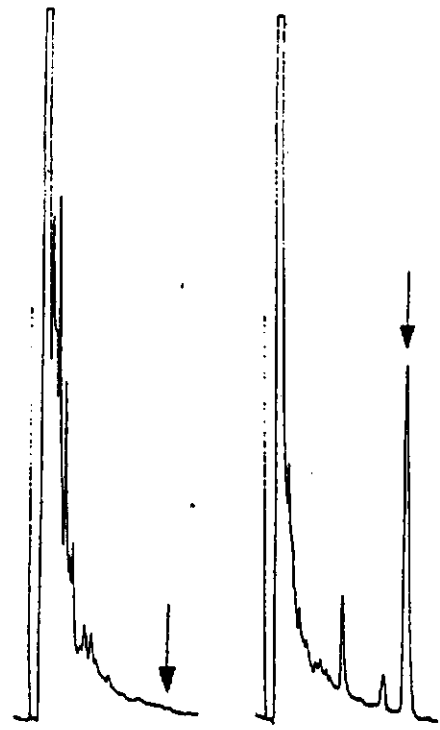
figuur 3



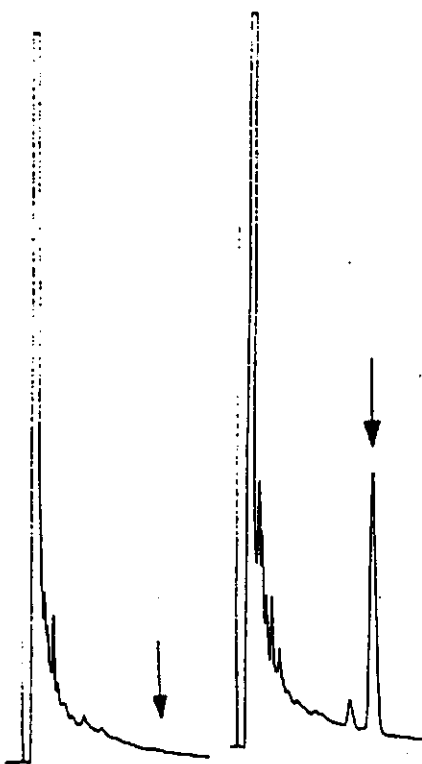
figuur 4



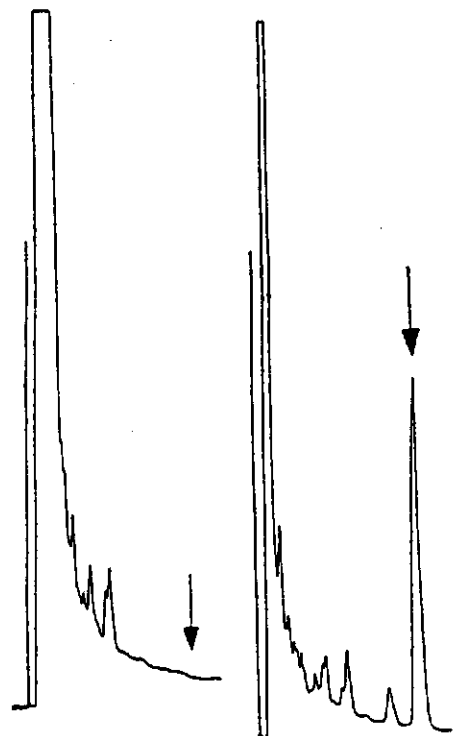
figuur 5



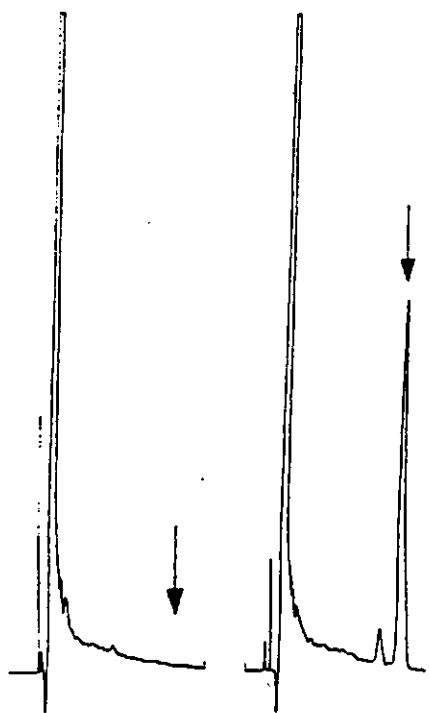
figuur 6



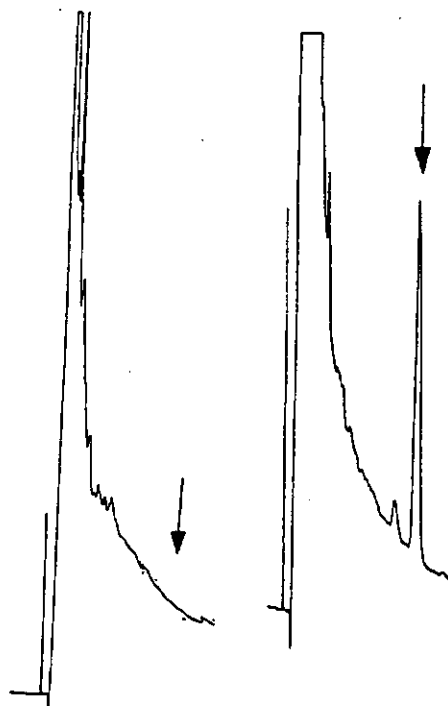
figuur 7



figuur 8



figuur 9.



figuur 10.