

Afd. Diergeneesmiddelen 1983-05-27

RAPPORT 83.43 Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Bepaling van ipronidazol in  
gehakt (h.o.h.)

Bijlage: 1.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (2x), afdeling  
Diergeneesmiddelen (6x), afdeling Normalisatie, Projekt-  
beheer, Projektleider (Buizer).



Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van  
diverse diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze

Onderwerp: Bepaling van ipronidazol in gehakt (h.o.h.)

Bijlage: 1

---

Doel:

Het bepalen van ipronidazol in vlees op residu niveau met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie.


Samenvatting:

Gehakt werd onderzocht, na toevoeging van ipronidazol, volgens voorlopig intern analysevoorschrift nr. DGM 33. Bepaling van ipronidazol in gehakt (h.o.h.). Er werd binnen een range van 10-500 µg/kg (ppb) gemeten.


Conclusie:

De methode voor de bepaling van ipronidazol in gehakt is geschikt binnen een range van 10-500 µg/kg (ppb niveau). De onderste grens van aantoonbaarheid is 5 µg/kg. De recovery is > 70%.

---

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

Medewerker/Samensteller: G.D. van Bruchem 

Projektleider: drs F.G. Buizer 

## 1. Inleiding

Ipronidazol is een diergeneesmiddel wat gebruikt wordt tegen protozoaire en bacteriële ziekten. Het wordt toegediend preventief als tabletten of vermengd met het voer, curatief via het drinkwater. Om residuen van ipronidazol (en zijn metaboliëten) in levensmiddelen van dierlijke oorsprong te kunnen bepalen zijn specifieke en gevoelige analysetechnieken noodzakelijk. In de literatuur is tot nu toe een gaschromatografische methode beschreven. Op de afdeling Diergeneesmiddelen van het RIKILT is een analysemethode opgezet voor de bepaling van ipronidazol in gehakt op een niveau van 10-500 ppb. Voor de bepaling van ipronidazol en het testen van de methode moeten in de toekomst organen, vlees en monsters van dieren, die met ipronidazol behandeld zijn, onderzocht worden.

## 2. Monsters

Het gehakt is door particulieren geleverd. Er is gehakt onderzocht omdat de matrix van gehakt ingewikkelder (meer vet) is dan bijvoorbeeld een orgaan.

## 3. Methode

De navolgende methode werd toegepast.

### 3.1 Voorlopig intern analysevoorschrift nr. DGM 33 (bijlage 1)

1e oplage (1983-04-15)

Bepaling van ipronidazol in gehakt (h.o.h.) (HPLC methode).

#### 3.1.1 Principe

Ipronidazol wordt, in aanwezigheid van natriumsulfaat, geëxtraheerd uit het gehakt met ethylacetaat. Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistofextractie. De waterige fase wordt hierna op pH=8,0 gebracht, waarna een vloeistof-vloeistofextractie met ethylacetaat volgt, waarbij ipronidazol in de ethylacetaatfase overgaat. Het ethylacetaat wordt verdampt en ipronidazol wordt in het residu bepaald door het, na goed op te lossen in eluens, te bepalen met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie.

### 3.1.2 Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar voor gehakt binnen een range van 5-500 µg/kg (ppb).

### 4. Uitvoering

Het gehakt werd onderzocht met behulp van de hierboven beschreven methode.

Ipronidazol is lichtgevoelig, dus er werd mogelijk onder uitsluiting van UV-licht gewerkt.

Ipronidazol is onstabiel in basisch milieu, dus er werd snel gewerkt nadat het waterig milieu op pH=8,0 gebracht is. Het oplossen van het residu in eluens kan recoveryverliezen geven.

### 5. Resultaten

Ipronidazol toegevoegd aan gehakt en geanalyseerd volgens analysevoorschrift DGM 33 leverde de volgende resultaten op.

niveau (µg/kg)	recovery (%)
11,2	94
11,2	72
11,2	72
112	74
112	86
112	51*
560	84
560	74
560	45*

\* lage recoveries hoogstwaarschijnlijk te wijten aan het slechte oplossen van het residu.

### 6. Discussie

Het aantal monsters is te weinig om een duidelijk beeld te krijgen van de recoveries. Om een beter inzicht te krijgen in recoveries en niveau's voor de bepaling van ipronidazol in gehakt, vlees en organen zullen meer analyses uitgevoerd moeten worden.

7. Konklusie

De methode voor de bepaling van ipronidazol in gehakt is geschikt binnen een range van 10-500 µg/kg (ppb niveau). De onderste grens van aantoonbaarheid is 5 µg/kg. De recovery is > 70%.

VOORLOPIG INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM 33

1e oplage (1983-04-15)

BEPALING VAN IPRONIDAZOL IN GEHAKT (H.O.H.) (HPLC METHODE)

Verzendlijst: afdeling Normalisatie/harmonisatie, sektorhoofd, afdeling  
Diergeneesmiddelen (6x), Bibliotheek (5x).



Bepaling van ipronidazol in gehakt (h.o.h.) (HPLC-methode)

---

1. Doel en toepassingsgebied

De methode is geschikt voor de bepaling van ipronidazol residuen in gehakt (h.o.h.). De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5 µg/kg (ppb). De recovery is > 70%.

2. Principe

Ipronidazol wordt met ethylacetaat uit het monster geëxtraheerd in aanwezigheid van natriumsulfaat. Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistofextractie. De waterige fase wordt hierna op pH = 8,0 gebracht, waarna een vloeistof-vloeistofextractie met ethylacetaat volgt waarbij ipronidazol in de ethylacetaatfase overgaat. Het ethylacetaat wordt verdampt en ipronidazol wordt in het residu bepaald door het, na goed oplossen in eluens, te bepalen met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie.

3. Reagentia

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

3.1 Millipore-water.

3.2 Methanol Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck art. 6007).

3.3 IJsazijn (BHD art. 10001).

3.4 Ammonia gec. (b.v. BHD 10011).

3.5 Ethylacetaat, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 863).

3.6 Natriumsulfaat, droog (b.v. Merck art. 6649).



3.7 Zoutzuur 37% (b.v. Merck art. 317).

3.8 Aceton (b.v. Merck art. 14).

3.9 Chloroform (b.v. Merck art. 2445).

3.10 Ipronidazol standaard.

3.11 Zoutzuur-oplossing 1 N.

Meng 83 ml zoutzuur (3.7) met millipore water (3.1) tot 1 l.

3.12 Eluens vloeistofchromatografie, water/methanol/ijsazijn 70:30:1.

Meng 700 ml water (3.1) met 300 ml methanol (3.2) en 10 ml ijsazijn (3.3) en filtreer dit door een millipore filter (0,45 µm).

3.13 Ipronidazol standaardoplossing.

Weeg ca. 25 mg ipronidazol (3.8) nauwkeurig op 0,1 mg af in een maatkolf van 100 ml. Los op in eluens (3.11) met behulp van ultrasoonbad, vul aan en meng.

3.13.1 Breng 10,0 ml van de standaardoplossing (3.12) in een 100 ml maatkolf, vul aan met eluens (3.11) en meng (oplossing B - 25 µg/ml).

3.13.2 Breng 20,0 ml van oplossing B (3.12.1) in een 100 ml maatkolf, vul aan met eluens (3.11) en meng (oplossing C - 5 µg/ml).

3.13.3 Breng 10,0 ml van oplossing (3.12.2) in een 100 ml maatkolf, vul aan met eluens (3.11) en meng (oplossing D - 500 ng/ml) (chromatogram 1).

#### 4. Apparatuur

4.1 Omni-mixer, model 17105 (Dupont Instruments, Sorvall).

4.2 Rotatieverdamper (waterbad temp. 40°C).

4.3 Vleesmolen (b.v. Moulinette).

4.4 Centrifuge (MSE coolspin temp. 10°C 1600 rpm).

4.5 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur met UV-detektie.

4.6 pH-meter.

4.7 Normaal laboratorium glaswerk.

## 5. Werkwijze

Ipronidazol is lichtgevoelig, dus zoveel mogelijk werken onder uitsluiting van UV-licht.

Ipronidazol is onstabiel in basisch milieu, dus snel werken nadat het waterig milieu op pH = 8,0 gebracht is.

### 5.1 Extraktie

Maal het gehakt (h.o.h.) in een vleesmolen (4.3) fijn. Weeg 50,0 g monster af in een 600 ml bekeerglas en voeg met een maatcilinder 200 ml ethylacetaat (3.5) toe. Voeg hierna 50 g natirumsulfaat (3.6) toe en macereer gedurende 2 minuten met de omni-mixer (4.1). Spoel de omnimixer af met ca. 5 ml ethylacetaat (3.5). Filtreer voorzichtig de bovenstaande vlloeistof over een glasvezelfilter (GF/A  $\phi$  15 cm Whatman) in een indampkolf van 500 ml zodanig dat het vlees achterblijft in het bekeerglas. Voeg hierna met een maatcilinder 100 ml ethylacetaat (3.5) in het bekeerglas en extraheer en filtreer als bovenstaand. Herhaal dit nog eenmaal. Breng vervolgens het vlees vanuit het bekeerglas in centrifugebuizen van 100 ml. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 1600 rpm. Het supernatant wordt ook gefiltreerd over het glasvezelfilter. Damp de verzamelde ethylacetaatfasen af met behulp van een rotatieverdamp(er) (4.2) tot er een olieachtige gele substantie overblijft.

### 5.2 Zuivering

Breng de olieachtige vlloeistof kwantitatief over met 4 x 5 ml ethylacetaat en 50 ml 1 N zoutzuur (3.11) in een 250 ml scheidrechter.

Schud de afgesloten scheidrechter gedurende 1 minuut en laat de fasen scheiden. Laat de onderstaande waterige fase af in een 250 ml bekeerglas en spoel na met 2 ml 1 N zoutzuur.

Extraheer de ethylacetaatfase nog 2 maal met 50 ml 1 N zoutzuur en spoel elke keer na met 2 ml 1 N zoutzuur. Breng met behulp van de pH-meter de verzamelde zoutzure fasen op pH 8,0 met ammonia gec. (3.4). Breng de waterige fase zo snel mogelijk kwantitatief over in een 500 ml scheitrechter door het bekersglas na te spoelen met 5 ml water, 5 ml aceton en 150 ml ethylacetaat (3.5). Schud de afgesloten scheitrechter gedurende 1 minuut en laat de fasen scheiden. Laat na scheiding de onderstaande waterige fase weer in het bekersglas en laat de ethylacetaatfase in een 250 ml indampkolf waarop zich een trechter met glaswol en droog natriumsulfaat (3.6) (ca. 10-12 g) bevindt. Spoel de scheitrechter na met 5 ml ethylacetaat (3.5). Breng de waterige fase opnieuw in de scheitrechter en herhaal het bovenstaande nog 2 maal. Damp na elke keer afdampen van ethylacetaatfase deze in tot ca. 10 ml. Spoel deze fase kwantitatief over in een 50 ml erlenmeyer met behulp van 4 x 5 ml chloroform (3.9). Damp de chloroform in tot droog met behulp van stikstof in een waterbad van 40°C. Voeg hierna 2,0 ml eluens (3.12) toe, sluit de erlenmeyer af en verwarm deze nog 10 minuten in een waterbad van 40°C. Plaats hierna de erlenmeyer gedurende 10 minuten in het ultrasoonbad. Filtreer dan de oplossing door een millipore filter (0,2 µm) en injecteer 50 µl van deze oplossing in het HPLC-systeem (chromatogram 2 en 3).

## 6. HPLC-instelling

### 6.1 HPLC

#### 6.1.1 Kolommen

Analytische kolom: µ Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 30 cm lengte)  
10 micron. Waters art. 27324.

Voorkolom : Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 2 cm lengte)  
37-50 micron. Waters art. 27248.

#### 6.1.2 Eluens

Water-methanol-ijsazijn 70:30:1 (3.12).

### 6.1.3 Detektie

Detektor : ultra-violet absorptie.

Gevoeligheid: 0,08-0,005 A.

Golflengte : 318 nm.

### 6.1.4 Injectie

Injectievolume: 50 µl.

## 7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC-systeem en vergelijk de ipronidazolpiek met die, die met een van de standaardoplossingen (3.13.1 oplossing B, C en D) wordt verkregen. Bereken het gehalte in µg/g aan ipronidazol in het monster.

## 8. Opmerkingen

8.1 Bij toevoegingen van ipronidazol aan blanco gehakt werden recoveries tussen 70-90% gevonden. Deze recovery-proeven zijn alleen uitgevoerd op gehakt (h.o.h.).

8.2 Bij analyse van een vleessoort dient een "blanco" vlees geanalyseerd te worden ter vergelijking voor eventuele storingen en recoveries.

8.3 Voor analyse van de recovery dient men aan blanco vlees zoveel toe te voegen dat er gehalten ontstaan van 10-100-500 ppb.

8.4 Bij de laatste stap in de zuivering (5.2), het oplossen van het residu in eluens, dient men er aan te denken dat het oplossen recovery verliezen kan geven.

## 9. Literatuur

9.1 Methode van onderzoek voor het bepalen van residuen van dimetridazol in varkenslever, -nier en -vlees.

G.F. Ernst en C.C. Nieuwenhuis

Keuringsdienst voor Waren voor het gebied Utrecht

IR/71/07/80/R 59 juli 1980.



9.2 Residue analysis of ipronidazole and its metabolite at the 2 ppb level in turkey tissue.

A. MacDonald, G. Chen, M. Kaykaty, and J. Fellig  
J. Agr. Food Chem., vol. 19, no. 6, 1971, 1222-1227.

9.3 Metabolism of ronidazol (1-methyl-5-nitroimidazol-2-ylmethyl carbamate).

C. Rosenblum, N.R. Trenner, R.P. Buhs, C.B. Hiremath, F.R. Koniuszy and D.E. Wolf  
J. Agr. Food Chem., vol. 20, no. 2, 1972, 360-371.

9.4 Determination of ipronidazole in animal feeds.

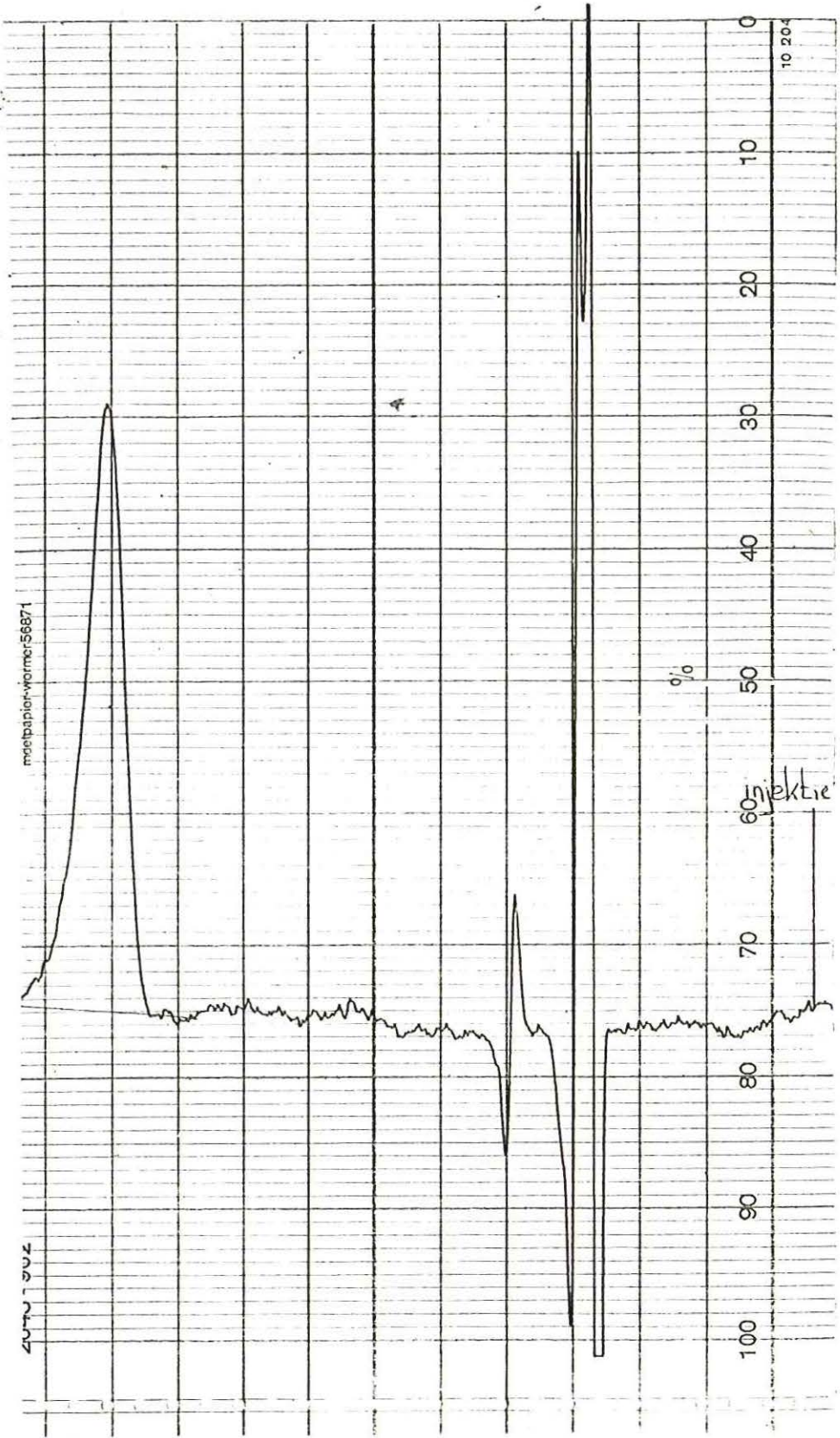
Analytical Methods Committee

Analyst, January, 1983, vol. 108, pp 106-108.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

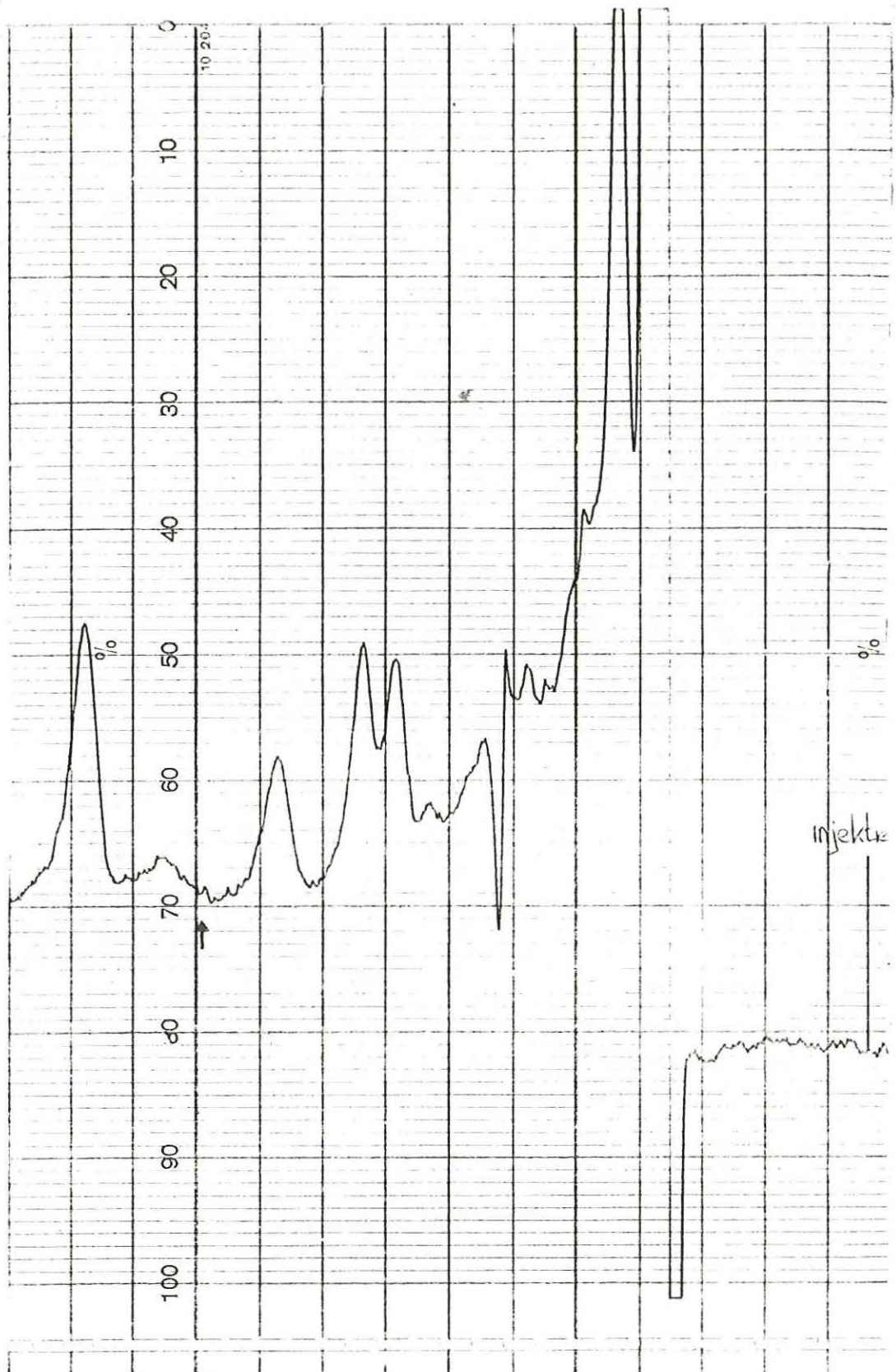
Samensteller : G.D. van Bruchem





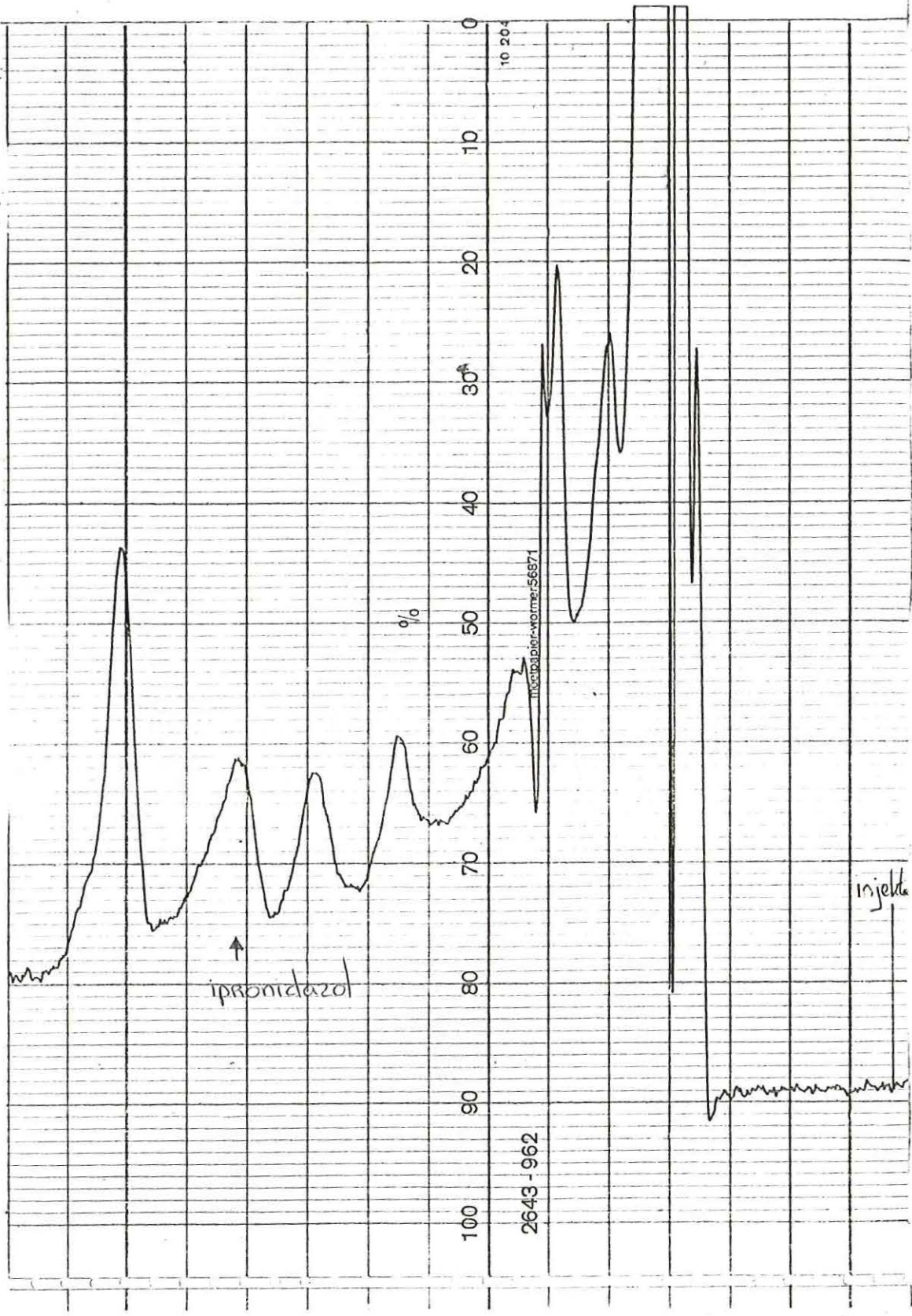
chromatogram. 1

standaard ipronidazol : 560 ng/ml H<sub>2</sub>O/MeOH 7:3



Chromatogram 2  
 "blanco" ulees : 50 g gehakt (h.o.h)





chromatogram 3  
vlees + toevoeging 11,2ppb ipronidazol