

NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH AND
ENVIRONMENTAL PROTECTION
BILTHOVEN

Rapport No. 573005 001

**ONDERZOEK NAAR HET GEBRUIK VAN
IVERMECTINE IN SLACHTDIEREN.
METHODEVALIDATIE EN BEWAKINGS-
ONDERZOEK.**

P.W. Zoontjes, S.S. Sterk, L.A. van Ginkel

Januari 1995

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondeheid, in het kader van project 573005.

Verzendlijst behorende bij Rapport nr. 573005 001

1 - 8	Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondheid
9	VI-Rotterdam
10	VI-s'Hertogenbosch
11	VI-Groningen
12	VI-Arnhem
13	Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
14	Plv. Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
15	Directie VVP
16	Directie HIGB
17	Directie RVV
18	Directie RIKILT-DLO
19	Hoofd CLRVV
20	IGB-Zutphen
21	IGB-Goes
22	IGB-Leeuwarden
23	IGB-Rotterdam
24	Algemene Inspectiedienst
25	CLRVV
26	Overleggroep Residu Analyse (ORA)
27	Werkgroep Residuen in Voedingsmiddelen (WRV)
28	Depot van Nederlandse publikaties en bibliografie
29	De Ware(n)-Chemicus
30	Directie RIVM
31	Hoofd voorlichting en Public Relations
32	Dr. H.A van't Klooster
33 - 35	Auteurs
36	Dr. R.W. Stephany, Ir. H.P. van Egmond, Dr. H.A.M.G. Vaessen, Drs. A.A.M. Stolker, Dr. R.C. Schothorst.
37	Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
38-39	Bibliotheek RIVM
40 - 54	Reserve

INHOUDSOPGAVE

	Verzendlijst	2
	Inhoudsopgave	3
	Summary	4
	Samenvatting	5
1.	Inleiding	6
2.	Materialen en Methode	8
2.1	Materialen	8
2.2	Methode	8
3.	Resultaten	8
3.1	Validatie van de analysemethode	8
3.2	Bewakingsonderzoek 1993	11
4.	Discussie	11
5.	Referenties	16
	Bijlage 1. SOP 380	17

NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH
AND ENVIRONMENTAL PROTECTION

The use of ivermectine in slaughter animals. Method validation and surveillance

P.W. Zoontjes, S.S. Sterk, L.A. van Ginkel.

Report no. 573005 001

Januari 1995

Summary

In order to conduct a surveillance study into the occurrence of residues of the veterinary drug ivermectine an analytical procedure based on liquid chromatography was made operational within the laboratory. At the level of the currently lowest Maximum Residue Limit (MRL) of 15 µg/kg for liver the repeatability of the method, expressed as relative standard deviation, was 10% (degrees of freedom (df)) whereas the within laboratory reproducibility, also expressed as relative standard deviation, was 6% (vhg 2).

With the procedure 107 samples of liver, obtained from calves, cattle, horses, pigs, sheep and goats, were investigated. In four samples ivermectine was detected. In three cases the concentration was less than 15 µg/kg (cow (1), sheep (1) and pig (1)). In one sample, obtained from a sheep, the concentration was 54 µg/kg.

The MRL for samples of liver obtained from sheep, pigs and horses is 15 µg/kg, for cattle 40 µg/kg. Even though the number of positive samples, exceeding the MRL, was only 1%, continuation of this study in the near future (3 years) is indicated. The nature of the method means that only a limited laboratory capacity is needed.

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID
EN MILIEUHYGIËNE

Onderzoek naar het gebruik van ivermectine in slachtdieren. Methodevalidatie en bewakingsonderzoek.

P.W. Zoontjes, S.S. Sterk, L.A. van Ginkel.

Rapport nr. 573005 001

januari 1995

Samenvatting

Ten behoeve van bewakingsonderzoek naar het voorkomen van residuen van het diergeneesmiddel ivermectine werd een analysemethode op basis van vloeistofchromatografie operationeel gemaakt. Op het niveau van de laagste thans geldende Maximale Residu Limiet (MRL) van 15 µg/kg voor lever bleek de herhaalbaarheid van de methode, uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie, 10% (9 vrijheidsgraden (vhg)) terwijl de binnen laboratorium reproduceerbaarheid, eveneens uitgedrukt als relatieve standaarddeviatie, 6% (vhg 2) bedroeg.

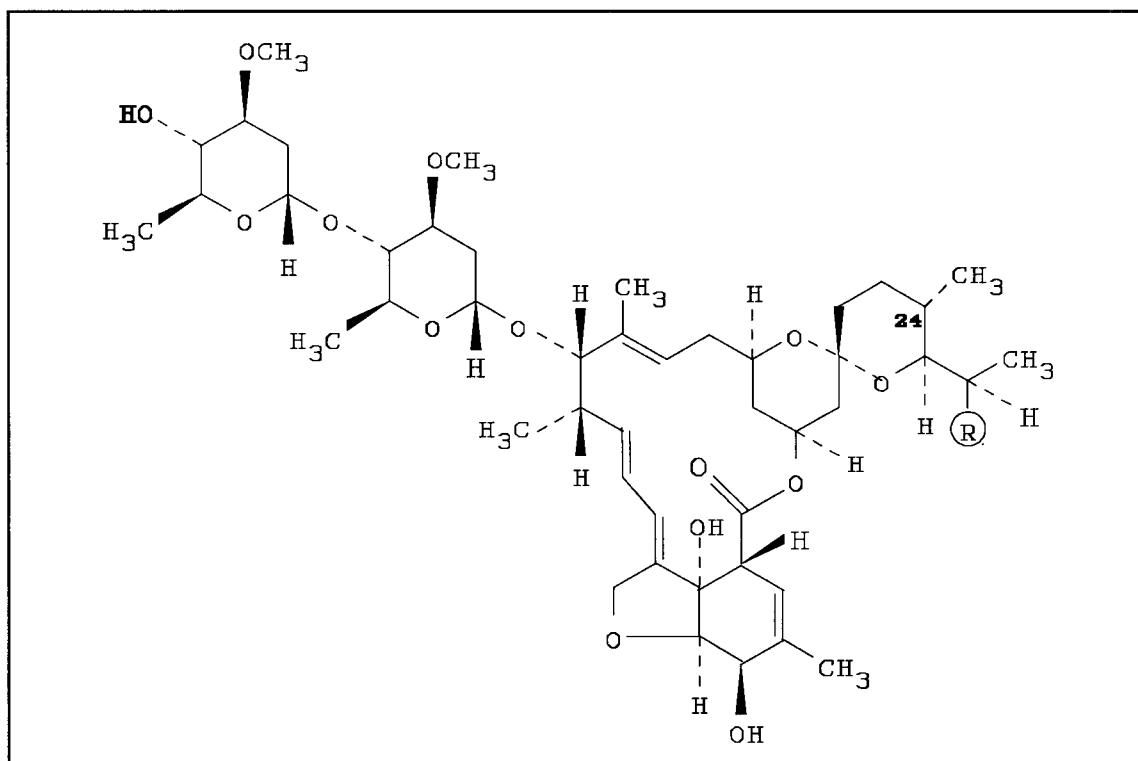
Met de methode werden 107 monsters lever, afkomstig van kalveren, volwassen runderen, paarden, schapen, varkens (o.a. zeugen), geiten en een bok onderzocht. In vier monsters werd ivermectine aangetoond. In drie gevallen was het gehalte echter minder dan 15 µg/kg (rund (1), schaap (1) en zeug (1)). In één monster, afkomstig van een schaap, werd 54 µg/kg aangetroffen.

De MRL voor monsters lever afkomstig van schapen, varkens en paarden bedraagt 15 µg/kg, voor runderen 40 µg/kg. Het aantal positieve, dat wil zeggen de MRL overschrijdende, monsters bedroeg derhalve slechts 1 (ca. 1%). Hoewel dit percentage niet verontwaardigend is, is herhaling van dit onderzoek over 3 jaar gewenst. De aard van de analysemethode maakt dat de hiervoor benodigde analytische capaciteit slechts beperkt is.

1. Inleiding

Ivermectine (Figuur 1) is sinds 1981 in gebruik als diergeneesmiddel. Het is een semi-synthetisch derivaat van abamectine en is een mengsel van ten minste 80 % 22,23-dihydroavermectine B_{1a} en niet meer dan 20 % 22,23-dihydroavermectine B_{1b}.

Avermectine behoort tot de groep van de macrocyclische lactonen die geproduceerd worden door actinomycete *Streptomyces avermilitis*.



Figuur 1. Structuurformule ivermectine (R=C₂H₅, avermectine B_{1a}, R=CH₃, avermectine B_{1b})

Ivermectine bezit een breedspectrum activiteit tegen nematode wormen (=rondwormen) en ectoparasieten in dieren. Humaan wordt ivermectine gebruikt tegen onchocerciasis (=rivierblindheid). Deze ziekte wordt veroorzaakt door de nematode *onchocerca volvulus* die voorkomt in tropische gebieden.

Het werkingsmechanisme van ivermectine is nog niet geheel opgehelderd. Er wordt gesuggereerd dat ivermectine wellicht een direct toxisch effect op de filariae heeft waardoor de filariae immobiel worden en opgeruimd kunnen worden door de lichaams eigen cellen. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat ivermectine de presynaptische-GABA (gamma-amino boterzuur) excretie en de postsynaptische GABA-binding aan een chloride kanaal gebonden receptor bevordert. Dit leidt tot een spierverlamming en uiteindelijk tot afsterving van de microfilariae door immuun of andere mechanismen.

In gezonde vrijwilligers wordt een piekplasma concentratie van 50 µg/l gevonden, 4 uur na

toediening van 12 mg ivermectine in tablet of capsule vorm.

De plasma eiwitbinding bedraagt 93 % en het verdelingsvolume is 46,6 liter, wat wijst op een grote weefselverdeling. De eliminatie halfwaardetijd is \pm 28 uur en de klaring 1,2 liter/uur.

Onafhankelijk van de toedieningswijze wordt na eenmalige dosering in schaap, varken en rat maar 0.5 tot 2 % van de toegediende dosis (uitgedrukt in radio-activiteit na toediening van getritieerd ivermectine) in de urine terug gevonden. De rest van de radio-activiteit wordt in de feces teruggevonden.

De hoofdmoleculen in rundvee, schapen en ratten zijn 24-hydroxymethyl- H_2B_{1a} , 24-hydroxymethyl- H_2B_{1a} -monosaccharide en 24-hydroxymethyl- H_2B_{1b} .

Vijftig procent van de residuen in lever, spier en nier van rundvee en schapen bestaat uit avermectine B_{1a} . Voor varkens is dit 40 %.

In vetweefsel worden niet polaire moleculen gevonden. Na verzeping van deze moleculen of behandeling met esterase of lipase ontstaan de polaire moleculen die ook in de lever gevonden worden. In de meeste diersoorten worden in lever en vet de hoogste residu concentraties gevonden. In spier- en nierweefsel worden zeer lage residu concentraties gevonden. Bijna alle residuen zijn extraheerbaar met organische oplosmiddelen. De moederstof, ivermectine, is het grootste deel van de residuen. In melk is de residuconcentratie 3-4 maal zo hoog als in plasma.

Voor ivermectine zijn Europese MRL's (maximale residu limieten) vastgesteld.

Deze zijn vastgesteld voor het doel residu avermectine B_{1a} en zijn 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ voor lever, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ voor vet en 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ voor nier- en spierweefsel. Ivermectine is niet toegelaten voor melkproducerende dieren.

In Nederland zijn diverse producten met ivermectine geregistreerd, o.a. voor oraal gebruik, pasta, oplossing, bolus en premix en een injectie. De toegekende wachttijden voor de slacht na gebruik van ivermectine variëren van 7 dagen tot 6 maanden.

Ivermectine valt onder de diergeneesmiddelen wet en is opgenomen in het Nationaal Plan Hormonen en Overige Stoffen (1993) in groep B I. Dit houdt in dat er een controle programma voor ivermectine bestaat. Naast dit keuringsprogramma, waarbinnen het RIVM als Nationaal Referentie Laboratorium (NRL) de taak van herkeurend laboratorium (eventueel ook contra-expertise) heeft is in 1993 door de VHI een bewakingsonderzoek bij 107 slachtdieren gehouden.

Om dit onderzoek, alsmede eventueel herkeurings (contra-expertise) onderzoek te kunnen uitvoeren dient ARO over een gevalideerde analysemethode te beschikken.

Dit rapport beschrijft de resultaten verkregen bij de validatie van een op basis van literatuur onderzoek geselecteerde methode alsmede de resultaten verkregen bij het onderzoek van 107 monsters lever.

2. Materialen en Methoden

2.1 Materialen

De onderzochte monsters lever (N = 107) werden door inspecteurs op slachtbedrijven verzameld en van een VHI nummer voorzien.

De grootte van de laboratoriummonsters lag tussen de 100 en 600 gram. De monsters werden geregistreerd in het AROMIS bestand MONSTER en tot het moment van analyse diepgevroren bij -20°C bewaard.

Het percentage 23,23-dihydroavermectine B_{1b} van de gebruikte standaard [ARO batch code H153339] werd vastgesteld door middel van vloeistofchromatografie met UV-detectie en bedroeg 91.2%.

2.2 Methoden

Details van de gebruikte methode zijn beschreven in SOP 380 (Bijlage 1). Voordat de analyse plaats vindt wordt het monster gemalen en gehomogeniseerd, vervolgens wordt er een analyseportie van 5 gram afgewogen. Bij iedere serie monsters wordt een blanco monster en een verrijkt blanco monster meegenomen ter bepaling van het terugwinningspercentage. Het verrijkte monster bevat 75 ng ivermectine. Aan het monster worden acetonitril en water toegevoegd, waarna homogenisatie plaats vindt met behulp van een ultra-turrax en het homogenaat gecentrifugeerd wordt. De supernatant wordt overgegoten in een bekersglas. De pellet die overblijft in de buis wordt opnieuw opgenomen in acetonitril door deze om te roeren met een spatel en vervolgens te mengen met de ultra-turrax. Het homogenaat wordt opnieuw gecentrifugeerd en de supernatant wordt bij de vorige supernatant gevoegd. Bij de verzamelde supernatanten wordt een diethylamine oplossing gevoegd. De vaste fase extractie (SPE) kolommetjes worden geconditioneerd met acetonitril en een diethylamineoplossing. Na het conditioneren wordt de supernatant opgebracht. Als deze volledig doorgelopen is, wordt het SPE kolommetje geëluëerd. Het eluaat wordt drooggedampt. Voordat de derivatisering ingezet wordt, worden de standaarden gepipetteerd. Deze oplossingen worden gelijktijdig met het monster gederivatiseerd. Na het derivatiseren wordt het reatiemengsel gefiltreerd over een sep-pak silica kolommetje, waarna het filtraat wordt drooggedampt en opgelost in 200 µl HPLC eluens. Hiervan wordt 20 µl geïnjecteerd. Detectie vindt plaats door fluorescentie meting.

3. Resultaten

3.1 Validatie van de analysemethode

De bij dit onderzoek gebruikte analysemethode is een combinatie van twee in de literatuur beschreven, onderling sterk overeenkomende, procedures (7,9). Nadat de methode oriënterend was ontwikkeld en in een "Standard Operating Protocol (SOP)" was beschreven (Bijlage 1) is deze aan een binnen laboratorium validatie studie onderworpen. Doel van deze validatie was het vaststellen van de herhaalbaarheid, binnen laboratorium reproduceerbaarheid alsmede een eventuele systematische afwijking. Voor dit doel werd een monster lever waarin ivermectine niet aantoonbaar was, verrijkt met 15 µg/kg ivermectine. Aan een analyseportie van 5 gram werd derhalve 75 ng toegevoegd. Op drie

verschillende dagen werden steeds 4 onderling identieke monsterporties onderzocht. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 1.

Tabel 1: Resultaten onderzoek monsters lever (5 gram), verrijkt met 75 ng ivermectine

Aantal dagen (v)		3	
Hoeveel monsters per dag (n)		4	
N		12	
Nummer	Dag 1 ng ivermectine	Dag 2 ng ivermectine	Dag 3 ng ivermectine
1	52.80	47.70	57.82
2	55.40	59.12	54.76
3	47.16	45.03	59.25
4	53.23	60.50	49.79
gemiddelde	52.15	53.09	55.41

Een statistische evaluatie van deze analyse resultaten is samengevat in Tabel 2.

Tabel 2: Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid (uitgedrukt als relatieve standaardafwijkingen) analyse lever op ivermectine

Rapportage	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	vhg
Gemiddelde (N = 12)	53.55		
Herhaalbaarheid (aantal vrijheidsgraden (N-v))	5.53	10	9
Binnen Lab. reproduceerbaarheid (aantal vrijheidsgraden (v-1))	3.35	6	2

N totaal aantal metingen

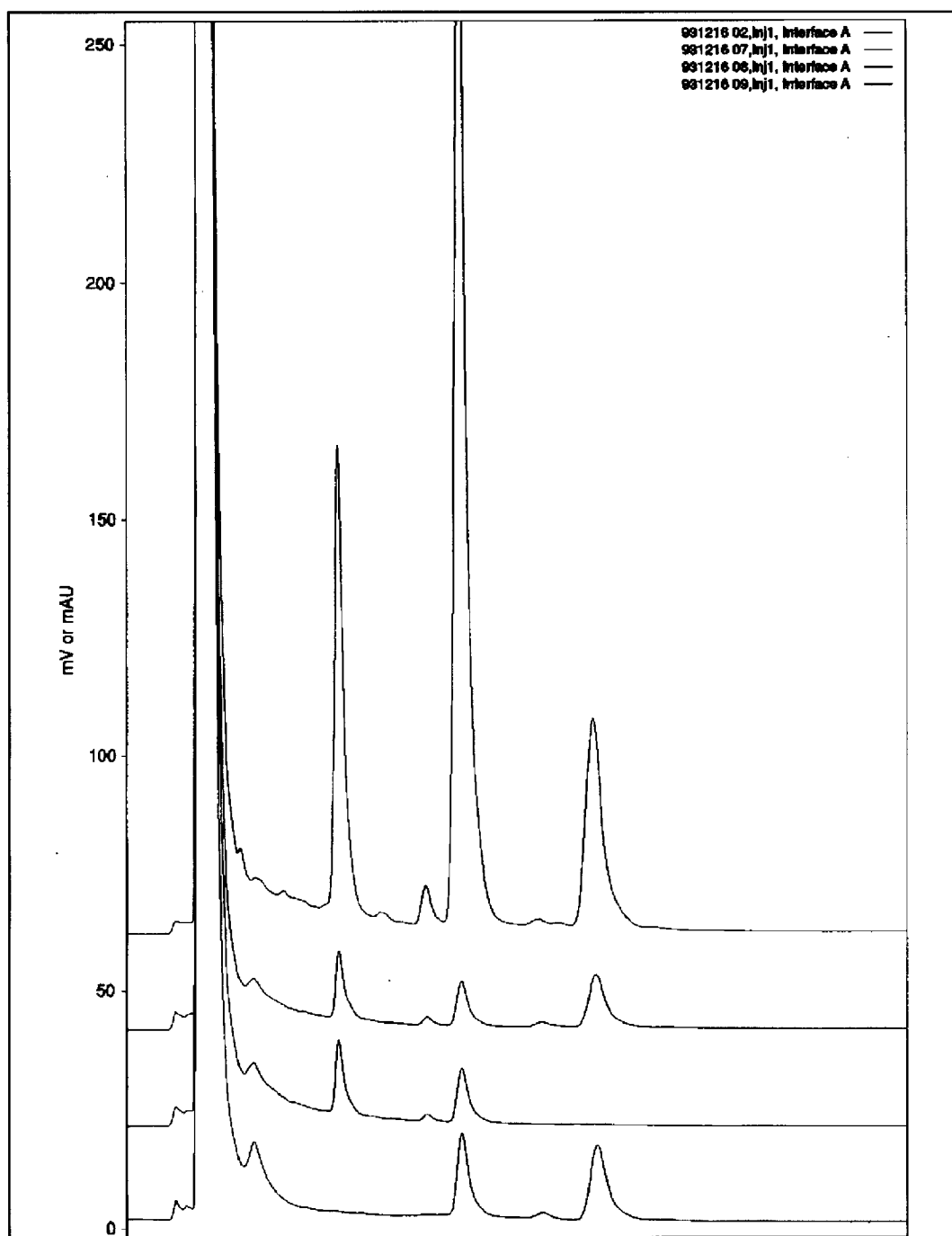
v aantal meetdagen

vhg aantal vrijheidsgraden

De waarden voor de herhaalbaarheid en binnen laboratorium reproduceerbaarheid, uitgedrukt als percentage relatieve standaardafwijking, van respectievelijk 5.5% en 3.4% kunnen als acceptabel worden beschouwd (10). De gemiddelde waarde van 53.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondeert met een percentage terugwinning van 71.4%.

In Figuur 2 is een set representatieve chromatogrammen afgebeeld. Uit deze chromatogrammen kan geconcludeerd worden dat op het niveau van de MRL de methode een goed

interpreteerbaar resultaat geeft. Het blanco monster vertoont in het chromatogram geen interferenties.



Figuur 2 : Chromatogrammen (van onder naar boven) van een standaard (overeenkomend met 15 µg/kg), een blanco monster, een verrijkt blanco monster (15 µg/kg) en een positief monster.

3.2. Bewakingsonderzoek 1993

Ten behoeve van een bewakingsonderzoek werden 107 monsters ontvangen. Deze werden conform de ontwikkelde procedure onderzocht. Per meetserie werd ten behoeve van de kwaliteitscontrole een blanco monster verrijkt met 15 µg ivermectine/kg onderzocht. Een analyse serie werd goedgekeurd indien het percentage terugwinning minimaal 50 en maximaal 90 bedroeg. Gemiddeld werd een percentage terugwinning van 66 verkregen (%RSD 15), in goede overeenstemming met de gemiddelde waarde verkregen tijdens de validatie.

De individuele analyse resultaten zijn vermeld in Tabel 3.

Bij het eerste onderzoek werden 4 monsters positief bevonden, een resultaat dat in alle gevallen bij herhaalde analyse werd bevestigd. Van deze 4 monsters was echter in slechts 1 geval het gehalte hoger dan de MRL. De andere 3 monsters hadden een gehalte lager dan de MRL. De positieve monsters hadden betrekking op schapenlevers (2), runderlever (1) en lever van een varken (zeug) (1).

4. Discussie

De in het kader van dit onderzoek operationeel gemaakte analysemethode voor de bepaling van residuen van ivermectine in monsters lever heeft in de praktijk bewezen goed te voldoen. De resultaten van het validatieonderzoek waren goed. Ook tijdens het uitvoeren van het bewakingsonderzoek werden goede resultaten verkregen voor de borgingsmonsters. Het aantal monsters dat per meetserie kan worden onderzocht maakt dat de methode geschikt is voor routinematige toepassing. Detectie vindt plaats op basis van fluorescentie meting na derivatisering. De specificiteit van de methode is hierdoor principieel beperkt en voldoet niet aan de criteria zoals die gehanteerd worden bij het onderzoek op verboden stoffen. Hoewel thans de technieken noodzakelijk voor dergelijke analyses wel voorhanden zijn staat de ontwikkeling van analysemethoden op residu niveau nog in de kinderschoenen. Bovendien is het de vraag of bevestigingsonderzoek op basis van bijvoorbeeld massaspectrometrie voor dit type, in principe kwantitatieve vraagstellingen, een hoge prioriteit dient te hebben. Gezien het aantal vergelijkbare diergeneesmiddelen, waaronder andere anthelmintica, waarvoor op dit moment nog geen analysemethoden operationeel zijn, lijkt dit niet het geval.

Reden voor het uitvoeren van dit bewakingsonderzoek was het feit dat het onderzoek op ivermectine thans onderdeel is van het Nationaal Keuringsprogramma alsmede het gegeven dat ivermectine een van de meest gebruikte diergeneesmiddelen is.

Gezien dit laatste feit moet geconcludeerd worden dat het aantal monsters waarin daadwerkelijk ivermectine werd aangetoond (4%) relatief laag is. Bovendien was in slechts één geval de concentratie hoger dan de MRL.

Vergelijking van de verkregen resultaten met de bevindingen van het CLRVV tijdens de uitvoering van het Nationale Keuringsprogramma (Annual National Plan) zullen moeten leiden tot het antwoord op de vraag of dit onderzoek op korte termijn dient te worden herhaald. Vooralsnog lijkt de conclusie dat herhaling op korte termijn niet noodzakelijk is gerechtvaardigd. Op midden lange termijn, waarbij aan een periode van 3 jaar gedacht kan worden lijkt herhaling ter vaststelling van een eventueel veranderd toepassingspatroon, echter wel gerechtvaardigd.

Tabel 3: Resultaten bewakingsonderzoek 1993 op Ivermectine (N = 107),m gecorrigeerd voor opwerkverliezen.

ARO nummer	VHI nummer	Diersoort	Ivermectine $\mu\text{g}/\text{kg}$
93M4583	93jas0146	varken	negatief
93M4584	93jas0145	varken	negatief
93M4585	93djm0289	rund	negatief
93M4586	93aml0098	varken	negatief
93M4587	93jas0142	schaap	negatief
93M4588	93djm0290	rund	negatief
93M4589	93aml0096	rund	pos < 15
93M4590	93rem006	onbekend	negatief
93M4591	93jdk0172	rund	negatief
93M4592	93jdk0173	rund	negatief
93M4593	93wgr0160	rund	negatief
93M4594	93wgr0159	schaap	pos < 15
93M4595	93jdk0175	schaap	negatief
93M4596	93wgr0156	paard	negatief
93M4597	93rem0061	rund	negatief
93M4598	93wgr0158	schaap	positief 54
93M4599	93jdk0174	schaap	negatief
93M4600	93wgr0157	paard	negatief
93M5030	93ker0144	schaap	negatief
93M5031	93lee0188	schaap	negatief
93M5032	93lee0202	varken	negatief
93M5033	93lee0194	varken	negatief
93M5034	93lee0203	varken	negatief
93M5035	93ker0146	onbekend	negatief
93M5036	93ker0145	rund	negatief
93M5037	93lee0190	geit	negatief

ARO nummer	VHI nummer	Diersoort	Ivermectine $\mu\text{g}/\text{kg}$
93M5038	93lee0191	geit	negatief
93M5039	93ker0143	geit	negatief
93M5040	93lee0214	schaap	negatief
93M5041	93lee0212	varken	negatief
93M5042	93lee0213	varken	negatief
93M5043	93lee0207	schaap	negatief
93M5044	93lee0206	schaap	negatief
93M5045	93lee0210	varken	negatief
93M5046	93lee0211	varken	pos < 15
93M5047	93ker0193	paard	negatief
93M5048	93lee0209	schaap	negatief
93M5049	93lee0197	schaap	negatief
93M5050	93len0165	schaap	negatief
93M5051	93lee0208	schaap	negatief
93M5052	93len0081	rund	negatief
93M5053	93lee0187	schaap	negatief
93M5054	93lee0189	schaap	negatief
93M5067	93rem0149	paard	negatief
93M5068	93rem0151	schaap	negatief
93M5069	93rem0067	schaap	negatief
93M5070	93rem0069	onbekend	negatief
93M5071	93rem0071	rund	negatief
93M5072	93rem0064	rund	negatief
93M5073	93rem0150	schaap	negatief
93M5074	93rem0152	rund	negatief
93M5075	93rem0065	schaap	negatief
93M5076	93rem0063	rund	negatief
93M5077	93rem0070	onbekend	negatief

ARO nummer	VHI nummer	Diersoort	Ivermectine $\mu\text{g}/\text{kg}$
93M5078	93rem0072	rund	negatief
93M5079	93rem0068	onbekend	negatief
93M5080	93rem0066	schaap	negatief
93M5081	93rem0148	rund	negatief
93M5106	93bja0200	rund	negatief
93M5107	93bja0199	rund	negatief
93M5108	93bja0198	schaap	negatief
93M5109	93bja0197	rund	negatief
93M5110	93bja0196	rund	negatief
93M5111	93bja0195	rund	negatief
93M5112	93bja0194	rund	negatief
93M5113	93bja0193	varken	negatief
93M5114	93bja0192	rund	negatief
93M5115	93bja0191	varken	negatief
93M5116	93bja0201	schaap	negatief
93M5117	93hmp0017	varken	negatief
93M5118	93hmp0016	varken	negatief
93M5119	93hmp0015	varken	negatief
93M5120	93hmp0014	varken	negatief
93M5121	93hmp0013	varken	negatief
93M5122	93hmp0011	varken	negatief
93M5123	93hmp0010	varken	negatief
93M5180	93jas0169	schaap	negatief
93M5181	93jas0149	varken	negatief
93M5182	93jas0174	rund	negatief
93M5183	93jas0170	varken	negatief
93M5184	93jas0176	schaap	negatief
93M5185	93jas0173	varken	negatief

ARO nummer	VHI nummer	Diersoort	Ivermectine $\mu\text{g}/\text{kg}$
93M5186	93jas0171	varken	negatief
93M5187	93jas0156	varken	negatief
93M5188	93jas0158	rund	negatief
93M5189	93jas0167	rund	negatief
93M5190	93jas0172	schaap	negatief
93M5191	93djm0293	varken	negatief
93M5192	93djm0292	rund	negatief
93M5193	93jas0157	varken	negatief
93M5194	93djm0294	schaap	negatief
93M5195	93djm0295	rund	negatief
93M5196	93djm0297	schaap	negatief
93M5197	93djm0291	onbekend	negatief
93M5198	93jan0167	paard	negatief
93M5199	93jan0155	varken	negatief
93M5200	93jan0158	varken	negatief
93M5201	93jan0165	schaap	negatief
93M5202	93eag0077	schaap	negatief
93M5203	93jan0166	schaap	negatief
93M5204	93jan0164	rund	negatief
93M5205	93jan0154	paard	negatief
93M5206	93jan0156	rund	negatief
93M5207	93eag0076	rund	negatief
93M5208	93jan0157	rund	negatief
93M5209	93jan0163	kalf	negatief
93M5210	93jan0162	kalf	negatief

5. Referenties

1. Martindale, The extra pharmacopoeia ed. 29, London, The pharmaceutical press (1989).
2. Nationaal Plan Hormonen en overige stoffen 1993, Ministerie LNV en WVC.
3. W.C. Campbell, M.H. Fisher, E.O. Stapley, G. Albers-Schönberg, T.A. Jacobs, Ivermectin a potent new antiparasitic agent; Science 221 (1983) 823-827.
4. Shuet-Hing Lee Chiu, J.R. Carlin, R.Taub, E. Sestokas, J. Zweig, W.J.A. van den Heuvel, T.A. Jacobd. Comparative metabolic disposition of ivermectin in fat tissue of cattle, sheep and rats; Drug metabolism and disposition 16 (1988) 728-737.
5. K.L. Goa, D. McTavish, S.P. Clissold, Ivermectin a review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy; Drugs 442 (1991) 640-658.
6. WHO Technical Report Series no. 799, p.23 Ivermectin.
7. Th. Reuvers, R. Diaz, J. Gomez and M. Ramos, Determination of ivermectine residues in liver by HPLC-UV and fluorescence detection. Screening and confirmatory method; In: Proceedings of the Euroresidue II Conference, Veldhoven (NL), ISBN90-6159-016-7, 3-5 May (1993) 567-571.
8. J. Fisher, M.T. Kelly, M.R. Smyth and P. Jandera., Determination of ivermectin in bovine plasma by column-switching LC using on-line solid-phase extraction and trace enrichment; Journal Phar. & Biom. Anal. 11, (1993), 217-223.
9. D.G. Kennedy, A. Cannavan, S.A. Hewitt, D.A. Rice and W.J. Blanchflower., Determination of ivermectin residues in the tissues of Atlantic salmon (*salmo salar*) using HPLC with fluorescence detection; Food add Contam. 10, (1993), 579-584
10. Commission Decision (93/256/EEC) of 14 April 1993 laying down the methods to be used for detecting residues of substances having a hormonal or a thyrostatic action. Off. J. Eur. Comm. L118 (1993) 64-74.

Bijlage 1. Standard Operating Protocol (SOP) 380.

INHOUDSOPGAVE :

- 0. Introductie
- 1. Doel
- 2. Toepasbaarheid
- 3. Principe
- 4. Materiaal
- 5. Standaarden
- 6. Reagentia
- 7. Apparatuur
- 8. Procedure
- 9.0 Opmerkingen

1. Doel

Doel is het verkrijgen van kwalitatieve en kwantitatieve gegevens over de aanwezigheid van ivermectine in monsters lever en vlees van slachtdieren.

2. Toepasbaarheid

De methode is geschikt voor de bepaling van het antiparasitaire middel ivermectine bij een concentratie overeenkomend met de Maximale Residu Limiet van 15 µg/kg voor lever. De bepaalbaarheidsgrens bedraagt 10 µg/kg lever.

3. Principe

Ivermectine wordt na extractie en extractzuivering gederivatiseerd om daarna met vloeistofchromatografie (HPLC) met fluorescentiedetectie te worden bepaald.

4. Onderzoeksmateriaal

Het monstermateriaal dat wordt aangeboden wordt geregistreerd in ARO/MIS monster (SOP ARO 112) en wordt tot analyse opgeslagen bij -20°C.

5. Standaarden

De stockoplossing van 1.0 g/l is 5 jaar houdbaar mits bewaard bij -20°C. De standaard oplossingen van 0.01 g/l en de 0.001 g/l zijn gedurende maximaal 1 maand houdbaar bij +4°C. De identiteit van de standaard dient met behulp van een molecuul spectroscopische methode gecontroleerd te zijn.

6. Reagentia

De chemicaliën zijn minimaal van pro analyse kwaliteit of beter en water is dubbel gedestilleerd.

- 6.1.1. Acetonitrile (Merck, art. no. 3)
- 6.1.2. Diethylamine (Merck, art. no. 803010)
- 6.1.3. Methanol (Merck, art. no. 6009)
- 6.1.4. 1-Methylimidazol (Merck, art. no. 805852)
- 6.1.5. Acetic anhydride (Analar, art. no. 382710)
- 6.1.6. N,N-dimethylformamide (Burdich+Jackson high purity, cas 68-12-2)
- 6.1.7. Buffer: Water /acetonitrile(6.1.1)/diethylamine(6.1.2)(100:300:0.1)
- 6.1.8. Octadecyl C18 kolommen 3 ml (Bakerbond SPE, Baker art.no. 7020-03)
- 6.1.9. Standaard oplossingen :
 - 6.1.9.1. Stockoplossingen van 1 g/l bewaren bij - 20°C : weeg 10.0 mg Ivermectine af in een bruin 15 ml flesje (7.1.16.) en voeg toe 10.0 ml ethanol (6.1.10.) en los op.
 - 6.1.9.2. Standaardoplossing van 0.01 g/l bewaren bij +4°C : pipetteer 30 µl uit de 1 g/l (6.1.9.1.) en pipetteer hierbij 2970 µl ethanol (6.1.10.) en vortex gedurende 30 seconden.
 - 6.1.9.3. Spike- en derivatiserings standaard 0.001 g/l bewaren bij +4°C : pipetteer 30 µl uit de 0.01 g/l (6.1.9.2.) oplossing en voeg 2970 µl ethanol (6.1.10.) toe en vortex.
- 6.1.10. Ethanol (Merck, art. no 983)

- 6.1.11. Oplossing diethylamine 0.1 % : meng 1.0 ml diethylamine met water en vul hiermee aan tot 1000 ml. Meng vervolgens minimaal 30 minuten.
- 6.1.12. Octadecyl C18 kolommen 6 ml (Bakerbond spe, Baker art. no. 7020-6)
- 6.1.13. Diethylamine oplossing : meng 100 ml water met 300 ml acetontril, voeg toe 100 µl diethylamine (6.1.2.). Meng gedurende 30 minuten.
- 6.1.14. Derivatisering reagens voor 25 derivatiseringen : Pipetteer 300 µl 1-methylimidazole (6.1.4.) in een centrifugebuis (7.1.3.), pipetteer hierbij 875 µl azijnzuur-anhydride (6.1.5.), pipetteer hierbij 1325 µl dimethylformamide (6.1.6.) en vortex gedurende 15 seconden.
- 6.1.15. Chloroform (Merck, art. no 2445)
- 6.1.16. Sep-pak Silica cartridges (Waters-millipore art. no 51900)
- 6.1.17. HPLC eluens : Meng methanol (6.1.3.) met water in de verhouding 95:5.

7. Apparatuur

- 7.1.1. Automatische pipetten (Gilson P20, P200, P1000, P5000)
- 7.1.2. Bench-top centrifuge (GLC-4, Sorvall)
- 7.1.3. Centrifuge buizen (100 mm x 11,5 mm)(Renes, RB100)
- 7.1.4. Waterbad met thermostaat regelbaar $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (GFL, Salm & Kip) met stikstof droogblaasinstallatie.
- 7.1.5. Vortex (Vibrofix vf1) (Jankel & Kunkel)
- 7.1.6. Ultrasoonbad (Branson 32)
- 7.1.7. HPLC-pomp 2150 (Pharmacia)
- 7.1.8. Fluorescentie detector excitatie golflengte 360 nm emissie golflengte 450 nm (Varian Fluorichrom)
- 7.1.9. Autoinjector + Kolomoven (Thermo Separation Products)
- 7.1.10. Data acquisitie PC 1000 (Thermo Separations Products)
- 7.1.11. Kolomverwarming (Tamson)
- 7.1.12. Moulinette S (Moulinex)
- 7.1.13. Centrifuge buizen Corex 50 ml No. 8422-A
- 7.1.14. Stoof met thermostaat regelbaar $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (Sorval)
- 7.1.15. HPLC-Kolom ODS-Hypersil C18 5 µm 150 mm x 4,6 mm (Shandon)
- 7.1.16. Bruine 15 ml flesjes
- 7.1.17. Plastic fles 250 ml (Emergo b.v)
- 7.1.18. Ultraturax (Jankel & Kunkel)
- 7.1.19. Maatcilinder 1000 ml
- 7.1.20. Bekerglazen 250 ml
- 7.1.21. Roermotor (Heidolph)
- 7.1.22. HPLC vials (Chromacol)
- 7.1.23. Maatcilinder 50 ml
- 7.1.24. Baker SPE 21 met adapter en 50 ml reservoir (J.T. Baker)
- 7.1.25. Maatcilinder 500 ml
- 7.1.26. Maatcilinder 100 ml
- 7.1.27. Bekerglas 500 ml
- 7.1.28. Waterstraalluchtpomp (Tamson)
- 7.1.29. Sep-pak Cartridge Rack (Waters Associates/Millipore)
- 7.1.30. Guard kolom ODS-Hypersil C18 10µm 10 mm x 3 mm (Shandon)

8. Procedure

8.1 Monster voorbereiding en extractie.

- 8.1.1. Plaats het monster in een moulinette (7.1.12.) en maal het gedurende enkele

- seconden. Breng het monster over in een plastic fles van 250 ml.
- 8.1.2. Weeg een analyse portie van 5 gram af in een corexbuis (7.1.13.). Voor de controle op de terugwinning wordt een blanco monster in duplo afgewogen waarvan één monster met 75 ng ivermectine verrijkt wordt. Pipetteer hiervoor 75 µl uit de standaardoplossing van 0.001 g/l (6.1.9.3.).
 - 8.1.3. Pipetteer 10 ml water bij het monster, voeg toe 40 ml acetonitril (6.1.1.) en homogeniseer gedurende 30 seconden met een ultra turrax (7.1.18.).
 - 8.1.4. Centrifugeer (7.1.2) de buizen 10 minuten bij 3000 rpm.
 - 8.1.5. Breng de supernatant over in een bekersglas van 250 ml.
 - 8.1.6. Resuspendeer de pellet in 20 ml acetonitril (6.1.1.) door deze eerst om te roeren met een spatel en vervolgens gedurende 30 seconden met de ultra turrax (7.1.18.) te mixen.
 - 8.1.7. Centrifugeer (7.1.2) de buizen 10 minuten bij 3000 rpm.
 - 8.1.8. Voeg de supernatant over bij het eerste supernatant.
 - 8.1.9. Voeg 40 ml 0.1 % diethylamine oplossing (6.1.11.) toe.
 - 8.1.10. Meng de oplossing door deze om te roeren met een glazen roerstaaf.

8.2 Vaste fase extractie.

Belangrijk is dat tijdens de Vaste fase extractie de SPE-kolommen **niet** droog komen te staan.

- 8.2.1. Plaats de kolommen (6.1.12.) op het Baker-21 systeem (7.1.24.).
- 8.2.2. Conditioneer de kolommen door eerst 5 ml acetonitril (6.1.1.) over de kolom te laten lopen gevolgd door 5 ml diethylamine oplossing (6.1.13.). Zet na het doorlopen van de conditionerings vloeistoffen de kraantjes van het SPE systeem (7.1.24.) dicht.
- 8.2.3. Giet ± 4 ml van het supernatant op het SPE kolommetje (6.1.12.), plaats hierna de adapter plus het reservoir op de kolom, en giet ± 40 ml supernatant in het reservoir.
- 8.2.4. Zet de kraantjes van het SPE systeem (7.1.24.) open, en stel het vacuüm zo in dat de kolommetjes rustig doorlopen. Giet het overige supernatant in het reservoir zodra er ± 20 ml is doorgelopen.
- 8.2.5. Als de vloeistof is doorgelopen, sluit dan de kraantjes van het SPE systeem (7.1.24.). De reservoirs en de adapters kunnen worden verwijderd.
- 8.2.6. Verwijder de deksel van het SPE systeem (7.1.24.) en droog de onderzijde van deze deksel met een tissue. Plaats het rek van het SPE systeem (7.1.24.) gevuld met opvang buizen (7.1.3.) gelijk aan het aantal kolommetjes terug in het SPE systeem (7.1.24.). Plaats de deksel terug op het SPE systeem (7.1.24.).
- 8.2.7. Pipetteer 4 ml acetonitril (6.1.1.) in het kolommetje, zet de kraantjes open, indien de kolommetjes niet doorlopen kan men het vacuüm iets verhogen. Als er ± 3 ml doorgelopen is, pipetteert men 4 ml acetonitril (6.1.1.) in het SPE kolommetje (6.1.12.). Nu kan de acetonitril (6.1.1.) volledig doorlopen tot dat de SPE kolommetjes (6.1.12.) droog zijn. Verwijder de deksel van het SPE systeem (7.1.24.).
- 8.2.8. Damp de eluaten in een waterbad (7.1.4.) bij 50°C droog onder een stikstofstroom.

8.3 Derivatisering.

- 8.3.1. Pipetteer in buisjes achtereenvolgens uit de standaard oplossing van 0.001 g/l (5.1.3.) 100µl, 75µl, 50µl, 25µl en 10µl. Zet de buisjes in het waterbad bij 50°C en damp de standaarden droog onder een stikstofstroom.
- 8.3.2. Pipetteer 100µl van het derivatiserings reagens (6.1.14.) in ieder buisje en in één buisje extra voor de HPLC als derivatiserings blanco. Plaats het rek met buisjes in een stoof (7.1.14.) bij 90°C gedurende 1 uur.
Na de derivatisering worden de buisjes afgekoeld tot kamertemperatuur.
- 8.3.3. Pipetteer 4 ml chloroform (6.1.15.) in de buisjes en vortex gedurende 10 seconden.

- 8.3.4. Plaats nieuwe buisjes in het Sep-pak rack (7.1.29.). Plaats de seppak cartridge (6.1.16.) op het Sep-pak rack (7.1.29.). Plaats de reservoirs op de Sep-pak cartridge (6.1.16.).
- 8.3.5. Giet het buisje leeg in het reservoir, pipetteer opnieuw 4 ml (6.1.15.) chloroform in de buisjes en vortex gedurende 10 seconden.
- 8.3.6. Als het monster bijna is doorgelopen, giet dan de buisjes in de reservoirs leeg.
- 8.3.7. Als het monster volledig is doorgelopen, stelt men het vacuüm zo in, dat alles uit de Sep-pak (6.1.16.) wordt gezogen.
- 8.3.8. Verwijder de deksel met carousel van het Sep-pak rack (7.1.29.). Plaats de buisjes in het waterbad bij 40°C en damp de eluaten droog onder een stikstofstroom.

8.4. HPLC

- 8.4.1. Los het drooggedampte eluaat op in 200 µl eluens (6.1.17.), vortex gedurende 15 seconden, zet de buisjes 2 minuten in het ultrasoonwaterbad (7.1.6.), vortex gedurende 15 seconden en breng de opgeloste eluaten over in HPLC vials (7.1.22.), en plaats deze vervolgens in de autoinjector (7.1.9.).
- 8.4.2. HPLC condities:

Injectie volume	: 20µl.
HPLC kolom	: ODS-hypersil C18 (7.1.15.)+ Guardkolom ODS-Hypersil (7.1.30).
Eluens	: methanol/water (6.1.17.), debiet 1.2 ml/min.
Fluorescentie detectie	: Excitatiegolflengte 360 nm ; Emissiegolflengte 450 nm.

8.5. IJklijn

- 8.5.1. Voor de berekening van de ijkljn worden de 5 oppervlakken voor 100, 75, 50, 25 en 10 ng per monster gebruikt.
De mathematische vergelijking van de calibratielijn wordt vastgesteld met behulp van lineaire regressie. Hierbij dient de correlatiecoëfficiënt groter of gelijk aan 0.99 te zijn.
- 8.5.2. Corrigeer de resultaten voor de opwerkverliezen op basis van de voor het verrijkte duplo monster (zie echter 9.1).

9.0. Opmerkingen.

- 9.1 Het percentage terugwinning zoals vastgesteld op basis van het verrijkte duplo monster (15 µg/ivermectine/kg) dient tussen de 50 en 90% te liggen.
- 9.2 In het geval van keuringsonderzoek dient bevestiging plaats te vinden door toepassing van co-chromatografie. Hierbij wordt onderzoek van het monster herhaald na verrijking met een hoeveelheid overeenkomend met de hoeveelheid aangetoond bij de eerste analyse.