

Oznaczanie pozostałości ivermektyny w tkankach i osoczu

HENRYKA WIŚNIEWSKA-DMYTROW, ANNA KOZAK

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wiśniewska-Dmytrow H., Kozak A.

Determination of ivermectin residues in animal tissues and plasma

Summary

The liquid chromatographic (LC) method for the determination of residues of ivermectin in muscles, kidney, liver and plasma was described. The analyte was extracted from the muscles, kidney or liver with iso-octane and from plasma with acetonitrile.

After the extracts of muscles, kidney and liver were evaporated to dryness, they were diluted with acetonitrile and cleaned up by solvent partitioning between acetonitrile and hexane.

The extracts of muscle and kidney were evaporated to dryness, and the residues were resolubilized for LC – mobile phase. The content of ivermectin in the final extracts was quantitated by reversed phase liquid chromatography (RP-LC) with UV detection ($\lambda = 246 \text{ nm}$).

Determination of ivermectin in the extracts of liver was based on the detection of a fluorescent derivative of ivermectin, produced by heating with a mixture of 1-methylimidazole and N,N-dimethylformamide and acetic anhydride. After cleaning up the solid-phase extraction (SPE) column SiOH, the final determination was carried out by RP-LC with a C18 column coupled to a fluorescence detector ($\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$).

From acetonitrile-plasma extracts, ivermectin was reextracted by SPE C18 column and was cleaned up on the silica packed column SiOH. Ivermectin was detected by RP-LC at 246 nm.

The limit of detection for ivermectin was $2 \mu\text{g/kg}$ in tissues (muscle, kidney and liver) and $0.5 \mu\text{g/l}$ in plasma. The statistical evaluation of the method indicated satisfactory recovery (75-92% for tissues and 67-85% for serum) and low coefficient of variation ($< 10\%$).

Keywords: ivermectin, tissues, plasma, methods, liquid chromatography

Wśród leków przeciw pasożytniczych stosowanych w medycynie weterynaryjnej ważną pozycję zajmuje ivermektyna. Lek ten jest mieszaniną biologicznie czynnych awermektyn, związków należących do grupy makrocyclicznych laktonów, wyizolowanych z produktów fermentacji promieniowca *Streptomyces avermitilis*. Wyodrębniono osiem awermektyn, z których cztery zaliczono do grupy B_{1a}, pozostałe do B_{1b}. W skład ivermektyny wchodzi uwodornione awermektyny, różniące się jedynie konfiguracją jednej grupy metylowej; ponad 80% składu stanowi 22,23-dihydroawermektyna B_{1a}, zaś pozostała część to 22,23-dihydroawermektyna B_{1b} (3).

Ivermektyna działa na zakończenia włókien nerwowych GABA-ergicznym powodując uwalnianie kwasu gamma-aminomasłowego, który pośredniczy w hamowaniu impulsów między interneuronami i neuronami ruchowymi pobudzającymi we włóknach pnia brzuszego u nicieni i pasożytów zewnętrznych. Dochodzi do utraty zdolności centralnej regulacji ruchu, a w konsekwencji do porażenia wiotkiego lub spastycznego i śmierci pasożyta (3).

Ivermektyna wykazuje szerokie spektrum działania. Jest skutecznym lekiem w zwalczaniu endo- i ektopasożytów, m.in. larw i postaci dojrzałych większości nicieni (żołądkowych, jelitowych, płucnych i nerkowych) oraz stawonogów, pasożytujących u zwierząt hodowlanych (3). Może być podawana doustnie, pozajelitowo lub jako preparat naskórny. Ivermektyna coraz częściej stosowana jest w postaci premiksu do pasz dla trzody chlewnej. W porównaniu z innymi lekami przeciw pasożytniczymi zalecane dawki są stosunkowo niskie, najczęściej w zakresie od 0,2 do 0,3 mg/kg m.c.

Farmakokinetyka ivermektyny jest różna w zależności od gatunku i wieku zwierzęcia, postaci leku oraz drogi podania (3, 7). Badania biodostępności i farmakokinetyki leku u zwierząt wykazały, że jest on bardzo wolno eliminowany z organizmu. Wiąże się to z jego wysoką lipidofilnością, a w następstwie z gromadzeniem pozostałości w tłuszczu, mięśniach i narządach (wątroba, nerki) oraz w mleku. W wątrobie pozostałości ivermektyny są wykrywane przez 28 dni po podaniu, w mleku lek utrzymuje się znacznie dłu-

żej (zakaz stosowania u krów mlecznych) (4). W związku z powyższym należy liczyć się z możliwością zagrożenia zdrowia konsumenta pozostałościami iwermektyny w produktach zwierzęcego pochodzenia.

Dla zapewnienia jakości zdrowotnej żywności pochodzenia zwierzęcego w wielu krajach, w tym również w Polsce, prowadzona jest regularna kontrola pozostałości leków weterynaryjnych uwzględniająca również badania w kierunku obecności iwermektyny. W chwili obecnej w Polsce brak jest unormowań prawnych, które regulują maksymalne pozostałości iwermektyny w tkankach zwierząt. W świetle istniejących zaleceń Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO oraz obowiązujących regulacji w krajach Unii Europejskiej najwyższa dopuszczalna pozostałość (MRL) iwermektyny w wątrobie i tłuszczu bydła nie może przekraczać 100 µg/kg i 40 µg/kg, a w wątrobie i tłuszczu pozostałych gatunków zwierząt 15 µg/kg oraz 20 µg/kg odpowiednio (2, 4). Przyjęta wartość dziennego akceptowanego pobrania (ADI) dla iwermektyny wynosi 0-0,2 µg/kg m.c.

Oprócz unormowań prawnych regulujących najwyższe dopuszczalne pozostałości leków, drugim równie istotnym elementem każdego programu kontroli pozostałości jest posiadanie odpowiedniej zwalidowanej metody analitycznej.

Współczesna analityka iwermektyny opiera się w głównej mierze na metodach chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz (LC-RP). Do oznaczeń jakościowych i ilościowych wykorzystywany jest detektor UV/VIS lub fluorescencyjny. W piśmiennictwie z ostatnich lat ukazało się szereg prac analitycznych dotyczących oznaczania iwermektyny w tkankach zwierząt oraz osoczu (1, 2, 5-13). Po zapoznaniu się z dostępnym piśmiennictwem i korzystając z doświadczeń własnych dokonano wyboru efektywnych sposobów ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów oraz optymalnych warunków identyfikacji i oznaczania ilościowego tego leku w mięśniach, nerkach, wątrobie i osoczu.

Materiał i metody

Zasada oznaczania

Analiza mięśni, nerek i wątroby. Materiał ten homogenizuje się z 50% roztworem wodnym acetonu. Iwermektynę z homogenatu ekstrahuje się izooktanem. Ekstrakt po odparowaniu do sucha odtłuszcza się przez podział między dwie fazy: acetonitryl/heksan. Warstwę heksanową odrzuca się, zaś acetonitrylową odparowuje do sucha w strumieniu gazu obojętnego.

W przypadku badania próbek mięśni i nerek pozostałość rozpuszcza się w alkoholu metylowym. Oznaczenia jakościowe i ilościowe przeprowadza się w chromatografii cieczowej z detektorem UV/VIS ($\lambda = 246$ nm). Rozdziału dokonuje się w kolumnie chromatograficznej z odwróconą fazą C18 stosując jako fazę ruchomą 90% alkohol metylowy.

Analizę próbek wątroby wykonuje się po utworzeniu w ekstrakcie pochodnej leku z mieszaniną 1-metyloimidazo-

lu i dimetyloformamidu (DMF) w obecności bezwodnika kwasu octowego. Utworzoną pochodną oczyszcza się techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na kolumnie krzemowej SiOH. Oznaczenia przeprowadza się w chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym ($\lambda_{\text{ex}} = 364$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm). Rozdziału dokonuje się w kolumnie chromatograficznej z odwróconą fazą C18 stosując jako fazę ruchomą 96% alkohol metylowy.

Analiza osocza. Iwermektynę ekstrahuje się z osocza acetonitrylem. Ekstrakt po dokładnym wymieszananiu, odwirowaniu i rozcieńczeniu wodą oczyszcza się techniką SPE kolejno na kolumnkach: oktadecylowej C18 i krzemowej SiOH. Eluat zagęszcza się do sucha, a pozostałość rozpuszcza w alkoholu metylowym. Oznaczenia przeprowadza się w chromatografii cieczowej z detektorem UV/VIS ($\lambda = 246$ nm). Rozdziału dokonuje się w kolumnie chromatograficznej z odwróconą fazą C18 stosując jako fazę ruchomą 90% alkohol metylowy.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Do przeprowadzania analiz niezbędne są:

- butla ze sprężonym azotem lub powietrzem,
- chromatograf cieczowy; w przygotowaniu metody korzystano z chromatografu cieczowego firmy Hewlett Packard model 1050, wyposażonego w detektor fluorescencyjny HP 1046 A, detektor UV/VIS HP 1050, integrator HP 3395, kolumnę odwróconej fazy C18 oraz pętlę dozującą 20 µl,
- homogenizator laboratoryjny np. firmy Polytron,
- kolumnki z sorbentami C18 i SiOH, 500 mg o poj. 6 ml, np. firmy Baker (nr kat. 7020-06, 7086-06 odpowiednio),
- łaźnia olejowa z termoregulacją,
- mieszadło laboratoryjne np. typu Vortex,
- próżniowy odparowywacz obrotowy,
- wirówka laboratoryjna,
- zestaw do ekstrakcji do fazy stałej (SPE),
- oraz typowe szkło laboratoryjne i typowy sprzęt laboratoryjny.

Odczynniki

Wszystkie stosowane do analizy odczynniki powinny być czystości cz.d.a., a rozpuszczalniki i woda do fazy ruchomej czystości HPLC:

- aceton,
- acetonitryl,
- alkohol metylowy,
- bezwodnik kwasu octowego,
- chloroform,
- dichlorometan,
- dimetylo-dichlorosilan (Sylon – CT), z firmy BDH, 5% roztwór w toluenie,
- dimetyloformamid (DMF),
- faza ruchoma: roztwory wodne alkoholu metylowego 90% i 96%,
- heksan,
- iwermektyna, wzorzec zawierający 91,4% izomeru B_{1a} i 8,4% izomeru B_{1b}, z firmy MSD AGVET AG, – roztwór podstawowy, 1000 µg/ml: odważyć w łódeczce z folii aluminiowej kilkanaście miligramów iwermektyny, przenieść do kolbki ze szlifem i rozpuścić w równoważnej ilości ml alkoholu metylowego,

– roztwory robocze:

roztwór roboczy A – 10 µg/ml: rozcieńczyć 1 ml roztworu podstawowego do 100 ml alkoholem metylowym,
roztwór roboczy B – 1 µg/ml: rozcieńczyć 5 ml roztworu roboczego A do 50 ml alkoholem metylowym.

Roztwory wszystkich wzorców przechowywać w szczelnie zamkniętych kolbkach w temp. 0°C lub niższej. Roztwór podstawowy iwermektyny zachowuje trwałość 5 miesięcy, roztwory robocze dwa tygodnie.

- l) izooktan,
- m) 1-metyloimidazol,
- n) toluen.

Silanizowanie szkła

Iwermektyna posiada właściwości adhezyjne, co może być przyczyną jej strat podczas wykonywania analiz, dlatego należy używać szkła silanizowanego. Szkło wypełnić całkowicie 5% roztworem Sylon – CT w toluenie. Pozostawić na 20 min. Po tym czasie Sylon – CT wylać do innego naczynia, zamknąć i pozostawić do następnego użycia. Szkło przepłukać alkoholem metylowym, następnie zalać alkoholem metylowym całkowicie i pozostawić na dalsze 20 min. Przepłukać acetonem i suszyć.

Postępowanie analityczne

Analiza mięśni, nerek i wątroby

Ekstrakcja. Do próbki wirówkowej pojemności 100 ml odważyć 5 g badanego materiału (mięśnie, nerki, wątroba), uprzednio rozmrożonego i wstępnie rozdrobnionego. Dodać 15 ml 50% roztworu wodnego acetonu i homogenizować ok. 60 sek. Następnie dodać 15 ml izooktanu i ponownie homogenizować ok. 60 sek. Homogenat odwirować. Górną warstwę izooktanową przenieść do nowej próbki wirówkowej o pojemności 50 ml. Tkankę homogenizować z izooktanem jeszcze dwukrotnie, każdorazowo po 10 ml izooktanu. Zebrać warstwy izooktanowe do próbki wirówkowej, odwirować. Supernatant przenieść do kolbki okrągłodennej ze szlifem i zagęścić do sucha w temp. 45-60°C.

Oczyszczanie ekstraktu. Pozostałość po zagęszczeniu przenieść ilościowo trzema 2 ml porcjami acetonitrylu do zakręcanej próbki pojemności 15 ml. Dodać 3 ml heksanu i mieszać na Vortexie przez 15-20 sek. Po rozdzielaniu się warstw, górną warstwę heksanową odrzucić. Oczyszczanie heksanem (3 ml) powtórzyć jeszcze raz. Warstwę acetonitrylową zagęścić do sucha w strumieniu gazu obojętnego w temp. nie przekraczającej 40°C.

W przypadku analizy mięśni i nerek pozostałość rozpuścić w 0,5 ml 90% roztworu wodnego alkoholu metylowego i nanosić na kolumnę analityczną chromatografu cieczowego, zaś w przypadku analizy wątroby w zagęszczonym do sucha ekstrakcie utworzyć pochodną iwermektyny.

Tworzenie pochodnej iwermektyny (ekstrakt z wątroby). Do pozostałości po zagęszczeniu ekstraktu dodać 0,15 ml mieszaniny do tworzenia pochodnej: 1-metyloimidazol + DMF + bezwodnik kwasu octowego (2 + 9 + 3, V/V/V) i ogrzewać na łaźni olejowej w temp. 95°C przez 1 godzinę. Zawartość próbki schłodzić do temperatury pokojowej, dodać 1 ml chloroformu i oczyszczać na kolumnie krzemowej SiOH. Przygotować zestaw SPE do pracy. Kolumnę krzemową przemyć dwukrotnie chloroformem, każ-

dorazowo po 2 ml chloroformu. Zawartość próbki przenieść ilościowo dwoma 1 ml porcjami chloroformu na uprzednio przygotowaną kolumnkę i przepuścić przez sorbent. Pochodną eluować z kolumnki 9 ml chloroformu do 10 ml próbki wirówkowej. Eluat ostrożnie zagęścić do sucha w strumieniu azotu, rozpuścić w 1 ml 96% roztworu wodnego alkoholu metylowego, schłodzić do temp. 0°C i wirować przez 10 min. z szybkością 2000–2500 obr./min. Supernatant nanosić na kolumnę chromatografu cieczowego.

Analiza osocza

Ekstrakcja. Do próbki wirówkowej pojemności 20 ml odmierzyć 5 ml osocza. Dodać 5 ml acetonitrylu, wymieszać na Vortexie, a następnie przez 5 min. w łaźni ultradźwiękowej. Mieszaninę wirować przez 10 minut z szybkością 4000 obr./min. Supernatant zlać do zlewki pojemności 15 ml. Probówkę wirówkową popłukać 1 ml mieszaniny acetonitryl-woda (1 + 1, V/V), dołączyć do supernatantu. Do zlewki dolać 5 ml wody. Całość wymieszać na Vortexie, a następnie przez 5 min. w łaźni ultradźwiękowej. Ekstrakt oczyszczać techniką SPE kolejno na kolumnkach oktadecydowej C18 i krzemowej SiOH.

Oczyszczanie. Przygotować zestaw SPE do pracy. Wykondycjonować kolumnkę C18 przez przepuszczenie przez sorbent kolejno 1 ml acetonitrylu i 5 ml mieszaniny acetonitryl-woda (1 + 1, V/V). Do kolumnki dołączyć poprzez złączkę zbiornik o pojemności 15 ml. Wlać do niego ekstrakt i przepuścić przez sorbent. Sorbent przemyć 4 ml 50% roztworu wodnego acetonitrylu. Przez kolumnkę przepuścić powietrze. Wykondycjonować kolumnkę krzemową SiOH 5 ml acetonitrylu i 5 ml dichlorometanu. Połączyć kolumnkę SiOH z kolumnką C18 (kolumnka SiOH na dole). Na kolumnkę C18 nanieść 4 ml mieszaniny acetonitryl-dichlorometan (1 + 9, V/V). Po przejściu mieszaniny przez sorbenty w obu kolumnkach, odłączyć kolumnkę C18. Iwermektynę eluować z kolumnki SiOH 4 ml acetonitrylu. Eluat zebrać do próbki pojemności 5 ml i zagęścić do sucha w temp. 45-60°C w strumieniu gazu obojętnego. Pozostałość rozpuścić w 0,5 ml 90% roztworu wodnego metanolu.

Warunki analizy chromatograficznej

Analizę jakościową i ilościową iwermektyny w ekstraktach z próbek mięśni, nerek i osocza przeprowadzić w podanych poniżej warunkach:

Detektor UV/VIS; $\lambda = 246 \text{ nm}$

Kolumna: np. Hypersil ODS 5 µm (250 × 4,6 mm) firmy Hichrom Ltd

Faza ruchoma: alkohol metylowy + woda (90 + 10, V/V)

Przepływ: 1,0 ml/min

Dozowana objętość: 20 µl

Prędkość przesuwu papieru: 0,5 cm/min.

Analizę jakościową i ilościową pochodnej iwermektyny w próbkach wątroby wykonać zgodnie z podanymi niżej parametrami.

Detektor fluorescencyjny: $\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$

Kolumna: np. Hypersil ODS 5 µm (250 × 4,6 mm) firmy Hichrom Ltd

Faza ruchoma: alkohol metylowy + woda (96 + 4, V/V)

Przepływ: 1,8 ml/min

Dozowana objętość: 20 µl

Prędkość przesuwu papieru: 0,5 cm/min.

Przy powyższych parametrach oznaczania czas retencji iwermektyny wyizolowanej z próbek mięśni, nerek i osocza wynosi około 10 min, zaś z wątroby około 6 min.

Identyfikacja i obliczenia

Identyfikację iwermektyny przeprowadzić przez porównanie czasów retencji pików występującego w badanych ekstraktach z odpowiednim pikiem roztworów wzorcowych i próbek wzmocnionych.

Stężenie iwermektyny w analizowanej próbce (x) w $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mięśnie, nerki, wątroba) lub w przypadku analizy osocza w $\mu\text{g}/\text{l}$ obliczać z równania krzywej regresji liniowej $y = mx + b$ dla krzywej wzorcowej, podstawiając do przekształconego wzoru $x = \frac{y - b}{m}$ wartości powierzchni lub wysokości pików oznaczanych związków (y) oraz obliczonych współczynników równania regresji m i b . Współczynniki te obliczać wg wzorów:

$$m = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} \quad b = \frac{\sum y - m\sum x}{n}$$

w których:

m – nachylenie krzywej wzorcowej względem osi X

b – punkt przecięcia krzywej z osią Y

n – liczba próbek wzmocnionych.

Wyniki i omówienie

W badaniach pozostałości leków weterynaryjnych, w tym również iwermektyny, niezbędne są czułe i precyzyjne metody analityczne spełniające międzynarodowe standardy i wymagania. Do najbardziej krytycznych etapów w całej procedurze należy proces przygotowania próbek uwzględniający ekstrakcję iwermektyny, jej zagęszczanie, a także oczyszczanie od interferujących związków. Opierając się na założeniach kilku metod przeprowadzono badania porównawcze zmierzające do wyboru najbardziej efektywnych i wydajnych sposobów ekstrakcji iwermektyny z tkanek i oczyszczania otrzymanych ekstraktów (1, 2, 5-13). Tkanki ekstrahowano przez homogenizację z mieszaninami ekstrakcyjnymi o różnej polarności i sile elucji: 50% acetonem z izooktanem, 50% acetonem z dichlorometanem, a także acetonitrylem. Najwyższe odzyski i najlepszą powtarzalność uzyskano stosując do ekstrakcji mieszaninę 50% acetonu z izooktanem.

Ekstrakty z mięśni, nerek i wątroby oczyszczano techniką chromatografii podziałowej w układzie dwóch nie mieszających się cieczy. Spraw-

dzano odzyski i efektywność oczyszczania przez wstrząsanie ekstraktów z heksanem lub eterem naftowym. Oczyszczanie ekstraktów z mięśni i nerek heksanem dawało zadawalające rezultaty. Chromatogramy z użyciem detektora UV/VIS były czytelne, piki symetryczne o krótkim czasie retencji wynoszącym około 10 min. Natomiast oczyszczanie ekstraktów z wątroby przez podział między dwie nie mieszające się cieczy okazało się niewystarczające. Chromatogramy z zastosowaniem detektora UV/VIS były nieczytelne, występowało ogonowanie pików iwermektyny.

Koniecznym okazało się doczyszczanie ekstraktów z wątroby, a także użycie do oznaczeń detektora fluorescencyjnego w celu obniżenia wykrywalności leku i poprawy selektywności. Ponieważ iwermektyna nie posiada naturalnej zdolności fluoryzowania, przeprowadzano ją w pochodną. Do tworzenia pochodnej, zgodnie z danymi z piśmiennictwa, używano mieszaniny 1-metyloimidazolu z DMF w obecności różnych objętości bezwodnika kwasu octowego (2, 8, 9, 12, 13). Najwyższą fluorescencję pochodnej iwermektyny, tym samym najniższą granicę wykrywalności i oznaczalności uzyskano stosując do tworzenia pochodnej mieszaninę: 1-metyloimidazol + DMF + bezwodnik kwasu octowego w stosunku objętościowym 2 + 9

Tab. 1. Ocena statystyczna metody LC-RP oznaczania iwermektyny w osoczu

Wskaźniki precyzji i dokładności	Wzmocnienie, $\mu\text{g}/\text{l}$		
	1,5	5,0	15,0
Liczba oznaczeń, n	6	8	8
Średnia arytm., \bar{x} , ng/ml	1,28	4,18	10,06
Zakres, $\mu\text{g}/\text{l}$	1,20-1,48	3,32-4,64	9,26-10,91
Odchylenie standardowe, s , $\mu\text{g}/\text{l}$	0,10198	0,39928	0,56105
Odzysk, %	85,3	83,6	67,1
Wsp. zmienności, V , %	7,97	9,55	5,58

Tab. 2. Ocena statystyczna metody LC-RP oznaczania iwermektyny w mięśniach, nerkach i wątrobie

Wskaźniki precyzji i dokładności	Wzmocnienie, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
	mięśnie	nerki	wątroba
Liczba oznaczeń, n	6	6	6
Średnia arytm., \bar{x} , $\mu\text{g}/\text{kg}$	9,23	7,50	8,22
Zakres, $\mu\text{g}/\text{kg}$	8,46-10,41	6,23-8,41	6,64-9,28
Odchylenie standardowe, s , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,783	0,731	0,787
Odzysk, %	92,3	75,0	82,2
Wsp. zmienności, V , %	8,43	9,77	9,49

+ 3. Do oczyszczenia pochodnej ivermektyny zastosowano technikę ekstrakcji ciecz – ciało stałe (SPE) wykorzystując kolumnienki oktadecylowe (C18) i krzemionkowe (SiOH). Optymalizację warunków SPE przeprowadzono porównując efektywność adsorbowania ivermektyny na kolumnienkach i elucję leku z kolumnienek różnymi rozpuszczalnikami. Oczyszczanie ekstraktów na kolumnienkach C18 okazało się nieefektywne. Niezależnie od używanych roztworów aplikacyjnych i mieszanin eluujących odzyski ivermektyny były różne; wahały się od 70 do 95%. Zastosowanie do oczyszczania kolumnienek SiOH z elucją chloroformem dawało zadawalające, powtarzalne wyniki.

Limit wykrywalności ivermektyny określony dla opracowanej procedury wynosi dla tkanek (mięśnie, nerki, wątroba) 2 µg/kg, a dla osocza 0,5 µg/l.

Wartość opracowanej metody oznaczania pozostałości ivermektyny w tkankach i osoczu zwierząt sprawdzano w warunkach wewnątrzlaboratoryjnych na podstawie analiz próbek wzmocnionych znanymi, zróżnicowanymi stężeniami tego leku.

W tab. 1 i 2 przedstawiono ocenę statystyczną metody chromatograficznej oznaczania ivermektyny dodanej do próbek osocza, mięśni, nerek i wątroby wolnych od tego związku. Drogą analizy statystycznej określono precyzję i dokładność opracowanej metody. Średnie wartości odzysków ivermektyny dla osocza wahały się od 67,1% do 85,3% przy zakresie stężeń od 1,5 do 15,0 µg/l. Natomiast dla mięśni, nerek i wątroby dla wzmocnienia 10 µg/kg średnie odzyski wynosiły 92,3%; 75,0% i 82,2% odpowiednio.

Wyliczone dla przeprowadzonych oznaczeń współczynniki zmienności określające precyzję metody nie przekraczały 10% i mieszczą się w granicach uznawanych za właściwe dla oznaczeń metodami chromatografii cieczowej ($V < 10\%$).

Opracowana metoda oznaczania pozostałości ivermektyny ze względu na swoje parametry analityczne będzie przydatna w laboratoriach kontrolnych Inspekcji Weterynaryjnej jak również w laboratoriach przemysłu farmaceutycznego.

Piśmiennictwo

1. Analytical Chemistry Laboratory Guidebook, Residue Chemistry: Ivermectin, IVR-1-IV-38, 1991.
2. CEC, Veterinary Drug Residues, Residues in food producing animals and their products: Reference materials and methods, R. J. Heitzman, Brussels, Luxemburg, 1994.
3. Campbell W. C.: Ivermectin and abamectin. Springer-Verlag, New York Inc, 1989.
4. Evaluation of certain veterinary drug residues in food: 36th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 799, Geneva 1990.
5. Fischer J., Kelly M. T., Smyth M. R., Jandera P.: Determination of ivermectin in bovine plasma by column-switching LC using on-line solid-phase extraction and trace enrichment, J. Pharm. Biomed. Anal. 1993, 11, 217-223.
6. Kozak A., Wiśniewska-Dmytrow H., Żmudzki J.: Oznaczanie ivermektyny w tkankach zwierząt metodą chromatografii cieczowej, Mat. IX Ogólnopols. Konf. Chromatograf. Nauka-Przemysł „Metody chromatograficzne w analizie żywności i ekotoksykologii”, Lublin, 22-24.06.1998.
7. Lo P-K, A., Fink D. W., Williams J. B., Blodinger J.: Pharmacokinetic studies of ivermectin effects of formulation, Vet. Res. Commun, 1985, 9, 251-268.
8. Markus J., Sherna J.: Method I. Liquid chromatography fluorescence determination of ivermectin in animal tissue and plasma. J. AOAC Int. 1992, 75, 757-767.
9. Nordlander I., Johnsson H.: Determination of ivermectin residues in swine tissues – an improved clean-up procedure using solid-phase extraction, Food Addit. 1990, 7, 79-82.
10. Oehler D. D., Miller J. A.: Liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine serum, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72, 59.
11. Reuvers Th., Diaz R., Pozuelo M., Ramos M.: Rapid screening method for ivermectin residue detection in cattle muscle and liver by liquid chromatography with UV detection, Anal. Chim. Acta 1993, 275, 353-358.
12. Salisbury C. D. C.: Modified method for the determination of ivermectin residues in animal tissues, J. AOAC Int. 1993, 76, 1149-1151.
13. Tuay P. C., Wood J. S. Jr., Downing G. V.: Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Agric. Food Chem. 1981, 29, 1059-1063.

Adres autora: mgr Henryka Wiśniewska-Dmytrow, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

zaprasza na:

Międzynarodową Konferencję Naukową pt.

PREWENCJA WETERYNARYJNA wczoraj–dziś–jutro,

która odbędzie się 26 kwietnia 2001 r. w Olsztynie

Podczas Konferencji przedstawione zostaną zagadnienia dotyczące prewencji weterynaryjnej na przełomie wieków. Referaty wygłoszą czołowi specjaliści z kraju i przedstawiciele Unii Europejskiej. Konferencja odbędzie się równocześnie z obchodami 20-lecia Katedry.

Materiały ukażą się drukiem. Dokładniejsze informacje i program Konferencji przedstawimy po otrzymaniu zgłoszenia chęci uczestnictwa na adres Katedry w terminie do 31 marca 2001 r.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
Prof. dr hab. Maciej Gajęcki

Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-950 Olsztyn
tel. (089) 523-37-73, tel/fax (089) 523-36-18, e-mail: higpasz@uwm.edu.pl