Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 85 (1994)

Heft: 3

Artikel: Methode zur quantitativen Bestimmung von Ivermectin in Fleisch und Leber mit HPLC und Vorsäulenderivatisation = Method for the quantitative determination of ivermectin in meat and liver by HPLC and pre-column derivatization

Autor: Guggisberg, Dominik / Sievi, Marco / Koch, Herbert

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982767

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 23.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **85**, 395–405 (1994)
Eingegangen 2. März 1994. Angenommen 14. März 1994

Methode zur quantitativen Bestimmung von Ivermectin in Fleisch und Leber mit HPLC und Vorsäulenderivatisation

Method for the Quantitative Determination of Ivermectin in Meat and Liver by HPLC and Pre-column Derivatization

Key words: Ivermectin, Meat, Liver, Pre-column derivatization, Fluorescence detection

Dominik Guggisberg, Marco Sievi und *Herbert Koch*
Bundesamt für Veterinärwesen, Liebefeld-Bern

Einleitung

Ivermectin gehört in die Familie der Avermectine, die sich als Naturstoffprodukte mit makromolekularer Lactonstruktur mittels Fermentation aus *Streptomyces avermitilis* gewinnen lassen. Ivermectin, ein Gemisch aus mindestens 80% 22,23-Dihydroavermectin H_2B_{1a} und 20% 22,23-Dihydroavermectin H_2B_{1b} (Abb. 1), wird durch selektive Hydrierung der Doppelbindung (C_{22}–C_{23}) aus den Avermectinen B_{1a} und B_{1b} synthetisch hergestellt.

Ivermectin besitzt ein breites Wirkungsspektrum als Antiparasitikum und Anthelmintikum in der Therapie und Prophylaxe von Endo- und Ektoparasiten und ist in der Veterinärmedizin weit verbreitet.

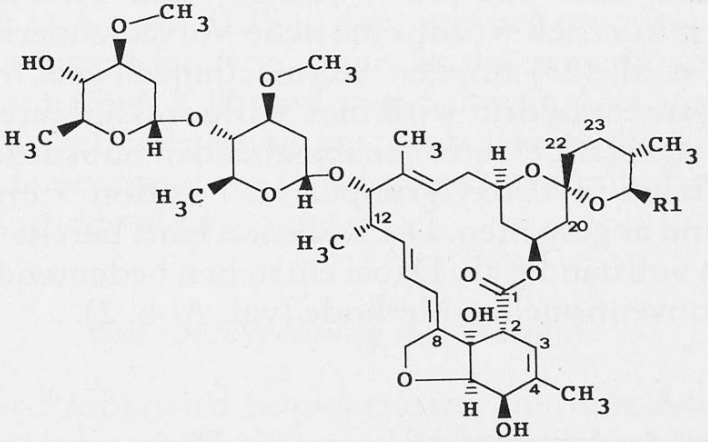


Abb. 1. Ivermectin: 80% H_2B_{1a} (R1 = s-Butyl) und 20% H_2B_{1b} (R1 = iso-Propyl)

Für essbares Gewebe gilt generell eine Wartezeit von 28 Tagen. Rückstände dieses Arzneimittels sowie auftretende Metaboliten können für den Konsumenten eine potentielle gesundheitliche Gefahr darstellen.

In der Schweiz wird in der Verordnung über Fremd- und Inhaltsstoffe vom 27. Februar 1986 (Änderung vom 5. 8. 1991) einen Toleranzwert von 0,02 mg/kg (= 20 ppb) für Ivermectin (H_2B_{1a} und H_2B_{1b}) inkl. aller Metaboliten in Fleisch festgelegt. In der EG gilt gem. Verordnung EWG (2901/93) vom 18. Oktober 1993 für Schafe, Schweine und Pferde ein Höchstwert (Maximum Residue Level = MRL) von 15 ppb für die Leitsubstanz H_2B_{1a} in der Leber bzw. 20 ppb in Fett und für Rinder ein MRL von 100 ppb für die Leitsubstanz H_2B_{1a} in der Leber bzw. 40 ppb in Fett.

Damit eine möglichst grosse Anzahl von tierischen Gewebeproben auf diesen Toleranzwert überprüfbar ist, benötigten wir eine Analysenmethode mit genügender Empfindlichkeit und hohem Durchsatz.

Ivermectin ist eine relativ wenig polare Substanz, die aufgrund der Struktur säure-, basen- und thermolabil ist. Unter Säureeinfluss z. B. werden die Acetalbindungen hydrolysiert, was zum Abbau von Ivermectin führt. Ivermectin selber besitzt nur einen schwachen UV-aktiven Chromophor, deshalb wird es zwecks Nachweis meist zum fluoreszierenden Aromaten* derivatisiert (Abb. 2).

Für die Bestimmung von Ivermectin in Fleisch gibt es bereits eine Fülle von Publikationen und Reviews (2).

Slanina et al. (3) untersuchten Ivermectinrückstände in Schweine- und Rindfleisch, zeigten den teilweisen Abbau beim Kochen auf und folgerten aus bekannten toxikologischen Daten eine Absetzfrist von 28 Tagen. *Chiu* et al. (4, 5) klärten die Wirkstoffverteilung sowie die entstehenden Metaboliten ab. Daraus wird klar ersichtlich, dass Ivermectin im Fett und in der Leber hohe Rückstände von H_2B_{1a} und H_2B_{1b} in unmetabolisierter Form bildet. Ivermectin kann grundsätzlich im UV bei 245 nm detektiert werden, wie *Dickinson* (6) und *Fischer* et al. (7) zeigten. Bedingt durch Matrixeffekte von Fleisch, Serum oder Milch ist jedoch eine Vorsäulenderivatisation zum fluoreszierenden Ivermectinderivat vorzuziehen. Dabei wird der Fleischextrakt in der Regel 1 Stunde bei 95 °C mit einem Gemisch von 1-Methylimidazol-Essigsäureanhydrid-Dimethylformamid gekocht (8–15). Dasselbe Verfahren kann auch für Blut-, Plasma- und Milchextrakte angewendet werden (16–22). Erst kürzlich wurde eine neue Vorsäulenderivatisierungsmethode von *De Montigny* et al. (23) für den Ivermectinnachweis in Plasma vorgestellt. Anstelle von Essigsäureanhydrid wird nun Trifluoressigsäureanhydrid eingesetzt. Durch die Präsenz der stark elektronenabziehenden Substituenten des Anhydrids werden die zwei freien Hydroxylgruppen an Position 5 und 7 des Ivermectins rascher acetyliert und abgespalten. Die Reaktion läuft bereits bei Raumtemperatur innert 30 Sekunden vollständig ab. Dabei entstehen bedeutend weniger Nebenprodukte als bei der konventionellen Methode (vgl. Abb. 2).

* Der Strukturbeweis des aromatischen Ivermectin-Derivates wurde erstmals von *Mrozik* et al. (1) geführt.

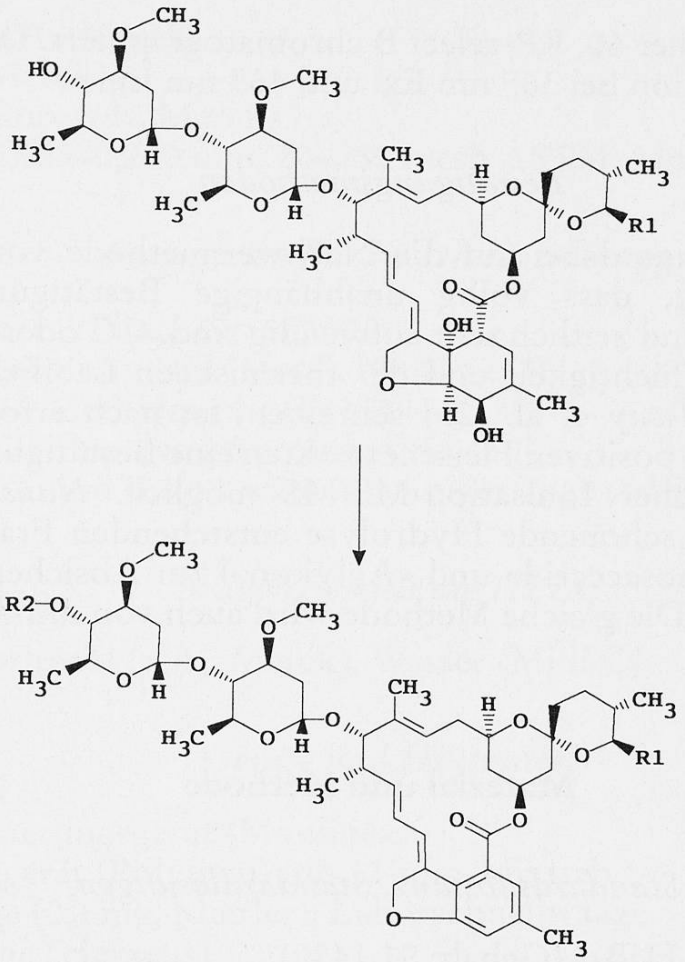


Abb. 2. Vorsäulenderivatisation zum fluoreszierenden Ivermectinderivat: (R1 = 80% s-Butyl, 20% iso-Propyl, R2 = Acetyl bzw. Trifluoracetyl)
Konventionelle Methode
Reaktionsbedingungen: Acetonitril/1-Methylimidazol/Essigsäureanhydrid, 1 Stunde, 95 °C (8).
Neue Methode
Reaktionsbedingungen: Acetonitril/1-Methylimidazol/Trifluoressigsäureanhydrid, 30 s., Raumtemperatur (23)

Über immunologische Screening-Methoden für die Bestimmung von Ivermectin, insbesondere mit EIA oder ELISA, ist wenig bekannt (24).

Wir berichten im folgenden von einer Analysenmethode für Ivermectin in Fleisch und Leber vom Rind, Kalb und vom Schwein. Die Methode geht von der neuen und rascheren Derivatisierung aus. Dabei wird die Chromatographie so gewählt, dass die beiden Ivermectine (s-Butyl und iso-Propyl) zusammen eluieren. Die Linearität der Methode wird gezeigt.

Kurzbeschreibung der Methode

Die Fleisch/Leber-Probe wird homogenisiert und mit Acetonitril polytronisiert. Anschliessend wird zentrifugiert, mit Wasser verdünnt und über eine Festphasen-Extraktionssäule gereinigt. Die organische Phase wird eingeengt, derivati-

siert und an LiChrospher 60, RP-select B chromatographiert. Die Analyse erfolgt mit Fluoreszenzdetektion bei 365 nm Ex. und 465 nm Em.

Bestätigungsmethoden

Wir beschränken uns dabei auf die Nachweismethode von Ivermectin und erwähnen gleichzeitig, dass völlig unabhängige Bestätigungsmethoden für Ivermectin apparativ und zeitlich sehr aufwendig sind. GC oder GC-MS kommen wegen der geringen Flüchtigkeit und der thermischen Labilität von Ivermectin nicht in Frage. Wie *Tway* et al. (25) schreiben, ist nach erfolgter präparativer HPLC-Reinigung von positiven Fleischextrakten eine Bestätigung von Ivermectin mit positiver chemischer Ionisation-MS/MS möglich. *Nausch* (26) hat vorgeschlagen, die durch schonende Hydrolyse entstehenden Fragmente von Ivermectin (genannt «Monosaccarid» und «Aglykon») zur Absicherung positiver Befunde heranzuziehen. Die gleiche Methode wird auch von *Markus* et al. beschrieben (14).

Material und Methode

Standardsubstanz, Standardlösungen

Ivermectin H_2B_{1a} und H_2B_{1b} (Gehalt: 91,14%)
Lieferant der Substanz: Merck Sharp & Dohme, CH-8152 Glattbrugg

Stammlösung:	11,0 mg einwägen und in 10 ml MeOH lösen (entspricht bei 91,14% Gehalt 10 mg Ivermectin H_2B_{1a} + H_2B_{1b} zusammen)
Verdünnungslösung:	100 µl der Stammlösung werden mit MeOH auf 10 ml aufgefüllt (= 10 ng/µl)
Standard I:	500 µl der Verdünnungslösung werden mit MeOH auf 10 ml aufgefüllt (= 500 pg/µl)
Standard II:	200 µl der Verdünnungslösung werden mit MeOH auf 10 ml aufgefüllt (= 200 pg/µl)
Standard III:	100 µl der Verdünnungslösung werden mit MeOH auf 10 ml aufgefüllt (= 100 pg/µl)

Die Wirkstoffkonzentration kann je nach Charge geringfügig schwanken, deshalb ist die Wirkstoffkonzentration zu beachten!

Chemikalien für das Clean up

- Wasser Milli-Q
- Methanol (z.A., Merck)
- Acetonitril (Chromasolv, Riedel-de Haen)
- Triethylamin (puriss. z.A., Fluka)

- 2-Propanol* (z.A., Merck)
- Hexan (z.A., Merck)
- Methanol (LiChrosolv, Merck)
- Kieselgel 60 (0,063–0,200 mm, 70–230 mesh ASTM; Merck)

Reagenzien für die Derivatisierung

- 1-Methylimidazol (Fluka Nr. 67560)
- Trifluoressigsäureanhydrid (Merck Nr. 808261)
- A: Acetonitril/1-Methylimidazol (1:1)
- B: Acetonitril/Trifluoressigsäureanhydrid (2:1)
  Die Lösungen A und B sind während einiger Tage stabil.

Reagenzien für die HPLC

Mobile Phase: Methanol (z.A., Merck), Wasser (Milli Q)

Geräte und Hilfsmittel

- Probenzerkleinerungsgerät (Moulinex)
- Homogenisiergerät (Polytron) mit 12-mm-Mixstab
- Analysenwaage (0,1 mg, Mettler), Laborschnellwaage
- Laborzentrifuge (Heraeus)
- Vakuumeinheit für Bakerbond spe-Trennsäulen
- Bakerbond C8 (3 ml) Kartusche (Art.-Nr. 7087-03)
- Pasteurpipette, lang (mit wenig Glaswolle stopfen und mit Kieselgel 60 ca. 5,5 cm trocken füllen)
- Wasserbad
- Heizblock
- 50-ml-Zentrifugenglas
- 50-ml-Schüttelmesszylinder
- 10-ml-Reagenzglas (Spitzboden)
- 1-ml-Spritze (Hamilton)
- 250-µl-Spritze (Hamilton)
- 20-µl-Spritze (Hamilton)
- 1,5-ml-Autosampler-Vials

Probenaufbereitung

Extraktion der Probe

Die Probe wird mit der Moulinette S zu einem feinen Brei zerhackt. 5,0 g der Probe werden in ein 50-ml-Zentrifugenglas eingewogen und mit 12 ml Acetonitril

* Mittels 2-Propanol/Hexan (2:3) kann Chloroform ersetzt werden.

polytronisiert. Mit 3 ml Acetonitril wird der Polytron nachgespült. Anschliessend wird 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die gelbliche Lösung wird in einen Schüttelmesszylinder dekantiert, mit Wasser auf 50 ml verdünnt und mit 50 µl Triethylamin versetzt. Der trübe Probenextrakt wird durch Schütteln klar. Eine Bakerbond-C8-Kartusche wird auf der Vakuumeinheit mit 5 ml Acetonitril und einem Gemisch von 5 ml Acetonitril/Wasser (3:7) mit 0,1% Triethylamin konditioniert. Die gesamte Fleischextraktlösung wird vollständig durch die C8-Kartusche gesaugt. Das Ivermectin wird mit 5 ml Acetonitril in ein 10-ml-Reagenzglas eluiert (max. 1 Tropfen/s). Das Eluat wird im Wasserbad (40 °C) mit Stickstoff auf ca. 300 µl eingeengt (ein vollständiges Eintrocknen hätte Verluste an Ivermectin zur Folge). Die Lösung wird in ein 1,5-ml-Autosampler-Vial transferiert. Mit wenig Acetonitril wird das RG nachgespült. Im Heizblock (60 °C) wird mit Stickstoff zur Trockne eingeengt.

Derivatisierung der Probe

Die Probe wird mit 100 µl Derivatisierungslösung A versetzt, mit einem Deckel verschlossen und kurz kühlgestellt. Unter Eisbadkühlung werden 150 µl Derivatisierungslösung B durch das Septum dazugespritzt und ca. 1 min bei Raumtemperatur gut geschüttelt. Das Kieselgel in der Pasteurpipette wird mit 3 ml 2-Propanol/Hexan (2:3) konditioniert. Die gelbe Probelösung wird auf die Säule appliziert und wandert langsam in das Silicagel. Das alte Vial und die Spritze werden mit 0,5 ml 2-Propanol/Hexan (2:3) gespült und das Gemisch ebenfalls auf die Säule gegeben. Ab jetzt wird das Eluat in einem neuen 1,5-ml-Vial aufgefangen. Mit einem weiteren ml-2-Propanol/Hexan (2:3) wird Ivermectin von der Säule eluiert. Das Eluat wird im Heizblock mit Stickstoff zur Trockne eingeblasen und mit 250 µl Acetonitril aufgenommen (HPLC-Messlösung).

Derivatisieren der Standards

Je 250 µl der Standards I–III werden separat in drei Autosampler-Vials mit Stickstoff zur Trockne gebracht. Mit 100 µl Derivatisierungslösung A und 150 µl Derivatisierungsreagenz B wird der Standard Ivermectin unter Eisbadkühlung umgesetzt. Eine Nachreinigung über Kieselgel ist hier nicht notwendig.

Analyse mit HPLC: Bedingungen, Vorgehen und Auswertung

HPLC-Apparat und HPLC-Bedingungen

Apparatur: Hewlett-Packard 1090*

* Integratoreinstellungen:
Integration, Chromatogramm

– Peakwidth:	0,200	Threshold:	2
– Min. Area:	20	Shoulders:	Off
– Integ. Off:	0,00 min	y-Achse:	10 min auf 0,5 Seiten
– Integ. On:	2,00 min	x-Achse:	0 bis 100 mAU

Mobile Phase:	Methanol/Wasser (95/5 v/v)
Vorsäule:	LiChrospher 100 RP-18, 5 µm
Säule:	Stahlkartusche (Merck), 125 mm x 4 mm, mit Schnellverschraubung (Hewlett-Packard)
Stationäre Phase:	LiChrospher 60 RP-select B, 5 µm (Merck)
Fluss:	1,0 ml/min
Ofentemperatur:	40 °C
Einspritzvolumen:	20 µl
Elutionsdauer gesamt:	10 min (Ivermectin: 3,5 min)
Fluoreszenzdetektor:	Kontron SFM 23 (high, sens :6, 365 nm EX., 465 nm EM.)

Validierung der Methode

Rindsleber (5 g) wurde je in sechsfacher Ausführung mit 200 µl, mit 100 µl und mit 50 µl der Standardlösung I (entsprechend 20 ppb, 10 ppb und 5 ppb) dotiert (Abb. 3, 5–8). Ebenso wurde ein Ansatz mit undotierter Rindsleber analysiert (Blindwert).

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, liegt die Wiederfindung (Recovery) zwischen 62 und 75%. Dabei schwanken die Abweichungen um den Mittelwert nur in sehr geringem Masse (Standardabweichungen sind alle kleiner als 1 ppb).

Die Methode wurde auch für Kalbs- und Schweineleber erprobt.

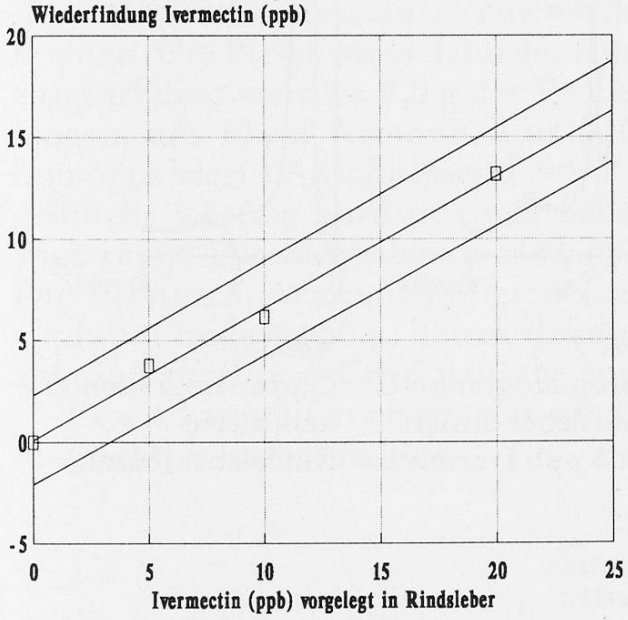
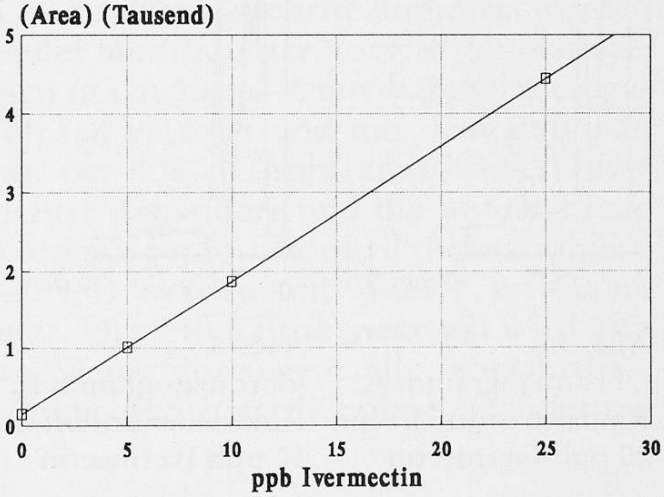


Abb. 3. Graphische Darstellung der Wiederfindungen von Ivermectin in Rindsleber mit Prognoseintervallen (95%)



Korrelationskoeffizient: = 0,9989

Abb. 4. Eichkurve von Ivermectin (lineare Regression) zur Auswertung über externen Standard. Die Leberprobe (5 g) wird derivatisiert und in 250 µl Acetonitril aufgenommen. Davon werden 20 µl eingespritzt. Es gilt folgende Umrechnung: 1 ppb entspricht 0,4 ng oder 1 ng entspricht 2,5 ppb

Tabelle 1. Wiederfindungen bei dotierten Rindslebern

Rindsleber dotierter Gehalt (ppb)	Anzahl	Mittelwert (ppb)	Standard-abweichung (ppb)	Relative Standardabweichung (%)	Wieder-findung (%)
20 ppb	$n = 6$	13,2	0,947	7,19	66% ± 4,8
10 ppb	$n = 6$	6,2	0,606	9,85	62% ± 6,1
5 ppb	$n = 6$	3,8	0,341	9,06	75% ± 6,8

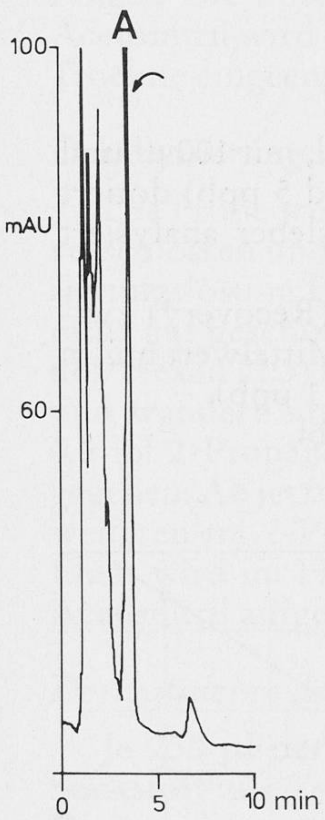


Abb. 5.
Chromatogramm A: Rindsleber dotiert mit 20 ppb Ivermectin

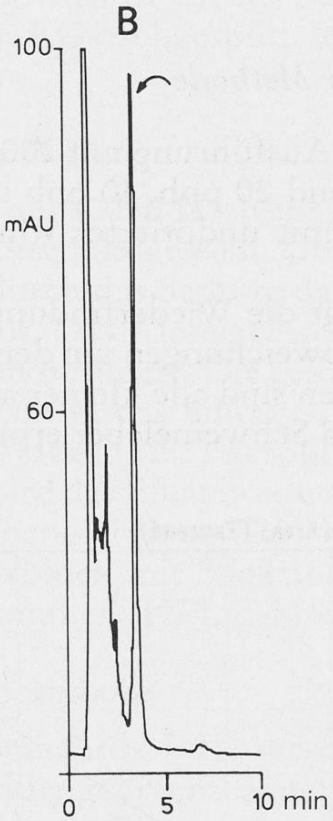


Abb. 6.
Chromatogramm B: Rindsleber dotiert mit 10 ppb Ivermectin

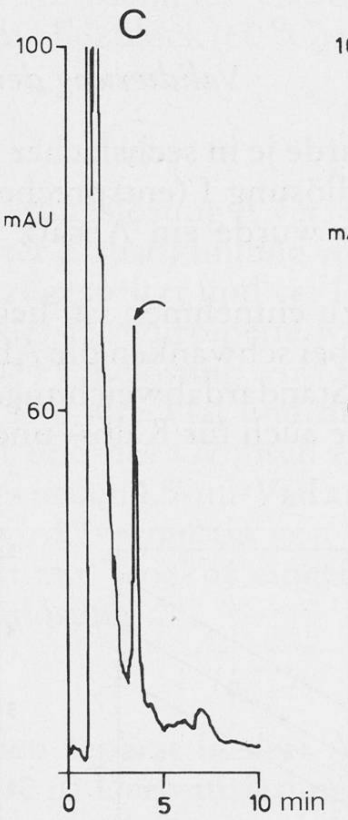


Abb. 7.
Chromatogramm C: Rindsleber dotiert mit 5 ppb Ivermectin

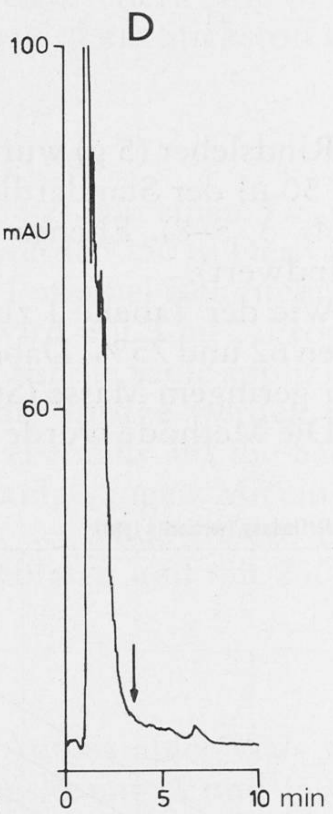


Abb. 8.
Chromatogramm D: undotierte Rindsleber (blank)

Nachweisgrenze

Die analytische Nachweisgrenze für derivatisiertes Ivermectin liegt bei 40 pg. Die probenbezogene Nachweisgrenze (Signal/Rauschen > 3:1) beträgt 1 ppb. Die Bestimmungsgrenze (Signal/Rauschen > 10:1) beträgt 2,5 ppb. Der Nachweis von Ivermectin im kritischen Bereich des Toleranzwertes von 20 ppb ist somit unproblematisch.

Auswertung

Ivermectin liegt als Gemisch von 22,23-Dihydroavermectin B_{1a} (H_2B_{1a}, 80%) und 22,23-Dihydroavermectin B_{1b} (H_2B_{1b}, 20%) vor. Wird eine kurze HPLC-Säule (z.B. LiChrospher 60, RP-select B [125 mm]) eingesetzt, werden H_2B_{1a} (s-Butylderivat) und H_2B_{1b} (iso-Propylderivat) praktisch zusammen eluiert. Deshalb gehen wir bei der Auswertung vom Total der beiden Substanzen aus. Der Toleranzwert gilt für die Summe beider Substanzen.

Die Auswertung der Resultate erfolgt über externen Standard.

Mit den Standards I, II und III wird eine 3-Punkte-Eichung durchgeführt (Abb. 4).

Resultate

Die vorgelegte Methode wurde für Schweins-, Rinds- und Kalbsleber getestet und für Rindsleber «validiert». Die Standardabweichungen für den Bereich zwischen 5 und 20 ppb lagen immer unter 1 ppb, die Wiederfindungen zwischen 62 und 75%. Bei einzelnen Proben von Schweine- und Rindsleber ist uns aufgefallen, dass im Chromatogramm nach vier Minuten noch weitere Substanzen eluiert wurden. Diese «Verunreinigungen» stammten von älterem Probenmaterial, das mehrmals zuvor aufgetaut und wieder eingefroren wurde und zudem einen hohen Fettanteil besass. Abklärungen haben ergeben, dass diese Verunreinigungen, falls sie stark interferieren, durch einen weiteren Aufarbeitungsschritt eliminiert werden können. Die Probe muss dann gemäss folgender modifizierter Vorschrift nochmals aufgearbeitet werden: 5,0 g der Probe werden in ein 50-ml-Zentrifugenglas eingewogen, mit 10 ml Acetonitril und 10 ml Hexan versetzt und mit dem Polytron homogenisiert. Anschliessend wird 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die gelbliche Lösung wird in einen Scheidetrichter dekantiert und die untere Phase abgetrennt. Die verbleibende Hexanphase wird mit 5 ml Acetonitril rückextrahiert. Die vereinten Acetonitrilphasen (ca. 15–20 ml) werden mit Wasser auf 50 ml verdünnt und mit 50 µl Triethylamin versetzt. Der trübe Probenextrakt wird nun auf die Bakerbond-C8-Kartusche appliziert (Weiterfahren gem. allg. Vorschrift).

Es wird zurzeit noch geprüft, ob die Methode für Schafsleber ohne Abänderung übernommen werden kann.

Zusammenfassung

Eine Vorsäulenderivatisations-Methode zur quantitativen Bestimmung von Ivermectin in Leber von Schweinen, Rindern und Kälbern wird beschrieben. Die Probe wird mit Acetonitril extrahiert und an einer Festphasenextraktions-Säule (C_8) gereinigt. Die anschliessende Derivatisation, bei Raumtemperatur durchgeführt, dauert nur ca. eine Minute. Die Analyse geschieht mittels HPLC an LiChrospher-Umkehrphase. Ivermectin wird als Derivat im Fluoreszenzdetektor hochspezifisch detektiert und quantifiziert (Exitation: 365 nm, Emission: 465 nm). Die Wiederfindung beträgt 62%–75%.

Résumé

Une méthode de dérivatisation pré-colonne est présentée pour la détermination quantitative des résidus d'ivermectine dans le foie de porcs et de boeufs. L'échantillon est extrait avec de l'acetonitrile et purifié sur colonne avec phase solide C_8.

La dérivatisation est effectuée à témperature ambiante; le temps de réaction est d'environ 1 min. L'ivermectine est séparée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse avec LiChrospher. Une dérivatisation pré-colonne permet une détection à haute spécificité dans le domaine de la fluorescence (excitation: 365 nm, émission: 465 nm). Le taux de récupération se trouve entre 62 et 75%.

Summary

A method based on pre-column derivatization is presented for the quantitative determination of ivermectin residues in liver of porc and cattle. The sample is extracted with acetonitrile and further clean-up is achieved by solid-phase extraction on a C_8 cartridge.

Ivermectin is converted to a fluorescent derivative at room temperature in about one minute and separated on a LiChrospher reversed-phase column. The derivative of ivermectin is highly specific detected and quantitated by fluorescence detection (exitation: 365 nm, emission: 465 nm). Recovery: 62%–75%.

Literatur

1. *Mrozik, H., Eskola, P., Fisher, M., Egerton, J., Cifelli, S.* and *Ostlind, D.:* Avermectin acyl derivatives with anthelmintic activity. J. Med. Chem. **25,** 658–663 (1982).
2. *Campbell, W., Fisher, M., Stapley, E., Albers-Schönberg, G.* and *Jacob, T.:* Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. Science **221,** 823–828 (1983).
3. *Slanina, P., Kuivinen, J., Ohlsen, C.* and *Ekström, L.:* Ivermectin residues in the edible tissues of swine and cattle: Effect of coocking and toxicological evaluation. Food Add. Contam. **6,** 475–481 (1989).
4. *Chiu, S., Green, M., Baylis, F., Eline, D., Rosegay, A., Meriwether, H.* and *Jacob, T.:* Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep and rat. J. Agric. Food Chem. **38,** 2072–2078 (1990).
5. *Chiu, S., Sestokas, E., Taub, R., Green, M., Baylis, F., Jacob, T.* and *Lu, A.:* Metabolic disposition of ivermectin in swine. J. Agric. Food Chem. **38,** 2079–2085 (1990).
6. *Dickinson, C.:* Improved HPLC method for quantitation of ivermectin in whole blood, serum or muscle tissue. J. Chromatogr. **528,** 250–275 (1990).
7. *Fischer, J., Kelly, M., Smyth, M.* and *Jandera, P.:* Determination of ivermectin in bovine plasma by column-switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction and trace enrichment. J. Pharmaceut. Biomed. Analysis **11,** 217–223 (1993).
8. *Tway, P., Wood, J.* and *Downing, G.:* Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using HPLC with fluorescence detection. J. Agric. Food Chem. **29,** 1059–1063 (1981).
9. *Nordlander, I.* and *Johnsson, H.:* Determination of ivermectin residues in swine tissues. An improved clean-up procedure using solid-phase extraction. Food Add. Contam. **7,** 79–82 (1990).

10. *Prabhu, S., Wehner, T.* and *Tway, P.:* Determination of ivermectin levels in swine tissues at the ppb level by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Agric. Food Chem. **39,** 1468–1471 (1991).
11. *Schenk, F., Barker, S.* and *Long, A.:* Matrix solid-phase dispersion extraction and liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine liver tissue. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 655–658 (1992).
12. *Reising, K.:* Rapid analysis for ivermectin residue in liver and muscle tissue by liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 751–753 (1992).
13. *Markus, J.* and *Sherma, J.:* Liquid chromatography/fluorescence determination of ivermectin in animal tissue and plasma. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 757–767 (1992).
14. *Markus, J.* and *Sherma, J.:* Liquid chromatography/fluorescence confirmatory assay of ivermectin in cattle, sheep, and swine liver tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 767–771 (1992).
15. *Petz, M.:* Zur Analytik von Ivermectin-Rückständen in Leber. Lebensmittelchemie **47,** 44–46 (1993).
16. *Unglaub, W.* und *Remensperger, U.:* Avermectine (IVOMEC) und ihr Nachweis. Tierärztl. Umschau **45,** 19–22 (1990).
17. *Oehler, D.* and *Miller, J.:* Liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine serum. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **72,** 59 (1989).
18. *Kojima, H., Yamamoto, K.* and *Nakanishi, Y.:* Determination of 22,23-dihydroavermection B_{1a} in dog plasma using solid-phase extraction and HPLC. J. Chromatogr. **413,** 326–331 (1987).
19. *Chiou, R., Stubbs, R.* and *Bayne, W.:* Determination of ivermectin in human plasma and milk by HPLC with fluorescence detection. J. Chromatogr. **416,** 196–202 (1987).
20. *Schnitzerling, H.* and *Nolan, J.:* Normal phase liquid chromatographic determination of nanogram quantities of ivermectin in cattle blood or plasma. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68,** 36–40 (1985).
21. *Tolan, J., Eskola, P., Fink, D., Mrozik, H.* and *Zimmermann, L.:* Determination of avermectins in plasma at nanogram levels using HPLC with fluorescence detection. J. Chromatogr. **190,** 367–376 (1980).
22. *Kijak, P.:* Liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine milk: Interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 747–750 (1992).
23. *De Montigny, P., Shim, J.* and *Pivnichny, J.:* Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and n-methylimidazole as the derivatization reagent. J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 507–511 (1990).
24. *Schmidt, D., Clarkson, C., Swanson, T., Egger, M., Carlson, R., Van Emon, J.* and *Karu, A.:* Monoclonal Antibodies for immunoassay of avermectins. J. Agric. Food Chem. **38,** 1763–1770 (1990).
25. *Tway, P., Downing, G., Slayback, J., Rahn, G.* and *Isensee, R.:* Confirmatory assay of ivermectin in cattle tissue using CI MS/MS. Biomed. Mass Spectrom. **11,** 172–176 (1984).
26. *Nausch, I.:* Rückstandsanalytik des Antiparasitikums Ivermectin in Rinderleber. Lebensmittelchemie **46,** 40–52 (1992).

Dr. Dominik Guggisberg
Bundesamt für Veterinärwesen
Sektion Chemie
Schwarzenburgstrasse 161
CH-3097 Liebefeld-Bern