

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 58, No 1 (2007)



### Tissue distribution and depletion of levamisole in sheep tissues

A. E. TYRPENOU (Α.Ε.ΤΥΡΠΕΝΟΥ), E. M. XYLOURI-FRANGIADAKI (Ε.Μ. ΞΥΛΟΥΡΗ-ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ), G. M. FRANGIADAKIS (Μ.Γ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.14971](https://doi.org/10.12681/jhvms.14971)

#### To cite this article:

TYRPENOU (Α.Ε.ΤΥΡΠΕΝΟΥ) A. E., XYLOURI-FRANGIADAKI (Ε.Μ. ΞΥΛΟΥΡΗ-ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ) E. M., & FRANGIADAKIS (Μ.Γ. ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗΣ) G. M. (2017). Tissue distribution and depletion of levamisole in sheep tissues. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 58(1), 11–21. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14971>

## Κατανομή και απομάκρυνση της λεβαμιζόλης σε ιστούς προβάτων

Α.Ε. Τυρπένου\*, Ε.Μ. Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη<sup>1</sup>,  
Μ.Γ. Φραγκιαδάκης<sup>1</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Θέμα της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της κατανομής της λεβαμιζόλης στους ιστούς-στόχους του προβάτου μετά από χορήγηση μιας δόσης υδροχλωρικής λεβαμιζόλης και με τελικό στόχο τον προσδιορισμό του χρόνου αναμονής, ώστε οι ιστοί του προβάτου να είναι ασφαλείς για ανθρώπινη κατανάλωση. Η υδροχλωρική λεβαμιζόλη χορηγήθηκε εφάπαξ *per os* με τη μορφή δισκίου του κτηνιατρικού φαρμακευτικού σκευάσματος Tridicine<sup>TM</sup> 300 mg στην προτεινόμενη θεραπευτική δόση των 300 mg/40 kg σ. β., ποσότητα η οποία αντιστοιχεί σε 7,5 mg λεβαμιζόλης ανά kg σ. β. Πραγματοποιήθηκαν πέντε δειγματοληψίες κάθε μία από τις οποίες αποτελείτο από τέσσερα πρόβατα στις 24, 96, 168, 240 και 336 ώρες μετά τη φαρμακευτική αγωγή. Δείγματα ιστών κρέατος, ήπατος, νεφρού και λίπους συλλέχθηκαν από κάθε πρόβατο και αφού συσκευάστηκαν, συντηρήθηκαν στους -45°C μέχρι τη χημική ανάλυσή τους. Η λεβαμιζόλη προσδιορίστηκε με υγροχρωματογραφική μέθοδο (HPLC) και οι μέσες συγκεντρώσεις της λεβαμιζόλης στους ιστούς-στόχους ήταν ανιχνεύσιμες σε όλα τα δείγματα από την 1η έως και τη 14η ημέρα μετά την παύση της θεραπευτικής αγωγής, με υψηλότερες τις συγκεντρώσεις στο νεφρό και το ήπαρ, οι οποίες κυμάνθηκαν από 838,88 µg/kg σε 39,18 µg/kg και από 1988,77 µg/kg σε 16,58 µg/kg, αντίστοιχα την 1η και τη 14η ημέρα. Στο κρέας και στο λίπος οι μέσες συγκεντρώσεις της λεβαμιζόλης την 1η ημέρα μετά την παύση της θεραπευτικής αγωγής ήταν 233,96 µg/kg και 173,89 µg/kg, αντίστοιχα και την 4η ημέρα μειώθηκαν σε επίπεδα χαμηλότερα του Μέγιστου Ορίου Καταλοίπων (MRL), γεγονός το οποίο σημαίνει ότι οι ιστοί του προβάτου είναι ασφαλείς για τον καταναλωτή. Υπολογίστηκε ένας χρόνος αναμονής 13 ημερών για το ήπαρ, το κύριο όργανο που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό αυτόν.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** λεβαμιζόλη, κατάλοιπα, ιστοί προβάτου, απομάκρυνση, χρόνος αναμονής

## Tissue distribution and depletion of levamisole in sheep tissues

Tyrpenou A.E.\*, Xylouri-Frangiadaki E.M.<sup>1</sup>,  
Frangiadakis M.G.<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** The subject-matter of this project was the residue distribution and depletion of levamisole in the sheep tissues after a single administration of levamisole hydrochloride and with final aim the appropriate withdrawal time determination, so that sheep tissues will be safe for human consumption. Levamisole hydrochloride was given *per os* with a single dose in the form of a tablet of the pharmaceutical product Tridicine<sup>TM</sup> 300 mg at the recommended therapeutic dose of 300 mg/40 kg body weight (b.w.), a quantity corresponding to 7.5 mg levamisole per kg b.w. Five sampling points comprised of four sheep each one, were performed at 24 h, 96 h, 168 h, 240 h and 336 h after medication. Tissue samples of muscle, liver, kidney and fat were collected, packed and stored at -45°C until analysis. Levamisole was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and mean levamisole concentrations found in the target tissues were detectable in all samples from the 1st until the 14th day after medication, with higher concentrations in kidney and liver ranging from 838.88 µg/kg to 39.18 µg/kg and from 1988.77 µg/kg to 16.58 µg/kg between the 1st and the 14th day, respectively. Concentrations in muscle and fat, the 1st day after medication, were 233.96 µg/kg and 173.89 µg/kg, respectively and the 4th day they were dropped below the maximum residue limit (MRL), which means that sheep tissues are safe for the consumer. A withdrawal time of 13 days was determined for liver, the main organ used for this calculation.

**Key words:** Levamisole, residues, sheep tissues, depletion, withdrawal time

\* Εργαστήριο Υγροχρωματογραφικής Ανάλυσης, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης - Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Κτίριο ΕΘΙΑΓΕ, 570 01 Θέρμη - Θεσσαλονίκη

<sup>1</sup> Εργαστήριο Ανατομίας & Φυσιολογίας των Αγροτικών Ζώων, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55 Αθήνα

\* HPLC Laboratory, Institute of Veterinary Research of Thessaloniki, National Agricultural Research Foundation, NAGREF Campus, P.O. Box 60272, Thessaloniki, 570 01 Thessaloniki, Greece

<sup>1</sup> Laboratory of Anatomy & Physiology of Farm Animals, Faculty of Animal Science, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos Street, 118 55 Athens, Greece



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λεβαμιζόλη είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο ευρέως φάσματος, το οποίο χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική θεραπευτική για περισσότερο από 30 χρόνια. Λόγω της ισχυρής του δράσης χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση των γαστρεντερικών και πνευμονικών νηματωδών σκωλήκων των βοοειδών, προβάτων και χοίρων δρώντας ως ένας νικοτινικός διεγέρτης των νευρικών γαγγλίων, ο οποίος ασκεί τόσο μουσκαρινικές όσο και νικοτινικές επιδράσεις σε χολινεργικούς υποδοχείς (Cherlet et al. 2000, Sahagun et al. 2001, Braund 2003). Η λεβαμιζόλη είναι το αριστερόστροφο εναντιομερές της τετραμιζόλης, ενώ ο οπτικός διαχωρισμός της D,L-τετραμιζόλης σε δεξιόστροφο (δεξαμιζόλη) και αριστερόστροφο (λεβαμιζόλη) ισομερές έδειξε ότι το δεύτερο ασκεί την πιο ισχυρή ανθελμινθική δράση. Η λεβαμιζόλη άρχισε να χρησιμοποιείται επιτυχώς από το 1969 με τη δεξαμιζόλη, η οποία έδωσε αντίθετα δυσμενή αποτελέσματα. Το αριστερόστροφο ισομερές της τετραμιζόλης χρησιμοποιείται επίσης στη θεραπευτική του ανθρώπου ως ανθελμινθικό φάρμακο, ενισχυτικό της θεραπείας κατά του καρκίνου (IPCS 1991), ενώ πρόσφατα η χρήση του έχει εστιαστεί στις ανοσοενισχυτικές του ιδιότητες (Dolezalova and Tkaczykova 2001).

Επειδή η ανθελμινθική δράση της τετραμιζόλης αποδίδεται κυρίως στο L ή S - (-) εναντιομερές, ο έλεγχος της καθαρότητας των δύο εναντιομερών στα φαρμακευτικά σκευάσματα είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος (Chankvetadze et al. 2002). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η λεβαμιζόλη απορροφάται γρήγορα μετά από *per os*, υποδόρια ή τοπική χορήγηση και απεκκρίνεται με τον ίδιο ρυθμό, παραμένοντας ωστόσο χημικώς αμετάβλητη στα ούρα (McKellar 1997). Οι Paulson and Feil (1996), στην έρευνά τους με σημασμένη με  $^{14}\text{C}$  λεβαμιζόλη ( $^{14}\text{C}$ -levamisole) σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, έδειξαν ότι 48 ώρες μετά την αγωγή η λεβαμιζόλη κατανέμεται σε όλους τους ιστούς με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ. Οι Palermo and Milillo (1979) διαπίστωσαν από την έρευνά τους ότι η μεγαλύτερη αύξηση των συγκεντρώσεων της λεβαμιζόλης στο κρέας, ήπαρ και νεφρό του προβάτου διαπιστώθηκε μεταξύ της ημέρας 2 και 3 με βαθμιαία συνεχή μείωση μέχρι την ημέρα 7 μετά την αγωγή. Σε μια άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της λεβαμιζόλης στο πλάσμα του αίματος της αίγας μειώνονται τάχιστα και ανιχνεύονται έως και 6 ώρες μετά την αγωγή (Sahagun et al. 2001). Επίσης, η EMEA αναφέρει ότι στα βοοειδή, πρόβατα, χοίρους και πουλερικά τα κατάλοιπα της λεβαμιζόλης στο ήπαρ ήταν  $<100\mu\text{g/kg}$  την ημέρα 7 μετά την αγωγή και  $>10\mu\text{g/kg}$  την ημέρα 14 και  $<10\mu\text{g/kg}$  την ημέρα 21. Τέλος, οι Kindred and Walcott

## INTRODUCTION

Levamisole is a broad spectrum anthelmintic drug available for veterinary medical use for over 30 years. Due to its potent broad-spectrum activity is used for the control of gastrointestinal and pulmonary nematodes in cattle, sheep and pigs acting as a nicotine-like ganglionic stimulant producing both muscarinic and nicotinic effects at cholinergic receptors (Cherlet et al. 2000, Sahagun et al. 2001, Braund 2003). It is the levo-enantiomer of tetramisole and its optical resolution of D,L-tetramisole into its dextro- and levo-isomers revealed the levo- form to have more anthelmintic activity. The single enantiomer was introduced in 1969, since the other enantiomer (dexamisole) showed more adverse effects. It is used in human medicine as an anthelmintic as well as into other indications, including adjuvant therapy in cancer treatment (IPCS 1991) and currently its use has been focused on its immunomodulatory effects (Dolezalova and Tkaczykova 2001).

Because of the fact that the anthelmintic activity of tetramisole is mainly attributed to the L or S - (-) enantiomer, testing of the enantiomeric purity of the drug formulations is of significant interest (Chankvetadze et al. 2002). Also, it must be considered that levamisole is rapidly absorbed (after oral, subcutaneous or topical administration) and is rapidly excreted unchanged in urine (McKellar 1997). In a research programme with milking cows and  $^{14}\text{C}$  labeled levamisole, Paulson and Feil (1996) showed that 48 h after dosing levamisole, it is distributed in all tissues with highest concentrations observed in liver. Palermo and Milillo (1979) found out that the highest levamisole concentrations in muscle, liver and kidney sheep tissues were between 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> day with gradually depletion until the 7<sup>th</sup> day after dosing. In another study it was found that levamisole concentrations in goat's blood plasma are depleted very fast and they are determined at least 6h after dosing (Sahagun et al. 2001). Also, EMEA reports that in cattle, sheep, pigs and poultry levamisole residues in liver were  $<100\mu\text{g/kg}$  on day 7 after medication and  $>10\mu\text{g/kg}$  on day 14 and  $<10\mu\text{g/kg}$  on day 21. Finally, Kindred and Walcott (1996) reported that levamisole withdrawal periods are varying from 2 to 19 days depending on the species and the dosage regime. At this point, we should mention that levamisole is stable in boiling water at  $100^\circ\text{C}$  and unstable at  $260^\circ\text{C}$  in cooking oil, with a half-life of about 5 minutes (Rose et al. 1995).

In this study a residue depletion study of levamisole hydrochloride in sheep is described and the calculated withdrawal time of levamisole is proposed.



(1996) αναφέρουν ότι οι χρόνοι αναμονής της λεβαμιζόλης ποικίλλουν από 2 έως 19 ημέρες ανάλογα με το είδος ζώου και τη χορηγούμενη δόση. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι η λεβαμιζόλη παραμένει σταθερή σε βρασμένο νερό (100°C) και ασταθής σε μαγειρικό λάδι (260°C), με μια περίοδο ημίσειας ζωής περίπου 5 λεπτών (Rose et al., 1995).

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η πειραματική χορήγηση της υδροχλωρικής λεβαμιζόλης σε πρόβατα και η μελέτη της κατανομής και της απομάκρυνσής της στα πρόβατα. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η κατανομή της λεβαμιζόλης στους τέσσερις ιστούς-στόχους των προβάτων, ο ρυθμός της αποβολής των καταλοίπων της και τέλος, προτάθηκε ο χρόνος αναμονής της λεβαμιζόλης.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Πειραματόζωα

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 22 υγιή αρνιά φυλής Αρτας, ηλικίας περίπου 5 μηνών και μέσου βάρους  $40 \pm 2$  kg. Τα πρόβατα διατηρήθηκαν σε ελεγχόμενη εκτροφή με ελεύθερη βόσκηση και *ad libitum* πρόσβαση στο νερό. Επειδή η παρεχόμενη ενέργεια της βοσκής δεν μπορούσε να καλύψει τις ανάγκες ανάπτυξης των ζώων, χορηγείτο και πρόσθετη ισορροπημένη ζωοτροφή απαλλαγμένη αντιπαρασιτικών ουσιών. Η πρόσθετη ζωοτροφή που χορηγήθηκε αποτελείτο από καλαμπόκι (3,7 Mj ενέργεια και 5 g/kg ξηράς ουσίας), κριθάρι (3,3 Mj ενέργεια και 10 g/kg ξηράς ουσίας) ή βαμβακόπιτα (7,5 Mj ενέργεια και 139 g/kg ξηράς ουσίας). Πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου τα πρόβατα παρέμειναν σε ηρεμία στην εκτροφή για μια περίοδο προσαρμογής τριών ημερών. Σε κανένα από τα πρόβατα δεν είχε χορηγηθεί οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή για περίοδο τεσσάρων εβδομάδων πριν από τον πειραματισμό. Η υγεία και η συμπεριφορά των πειραματόζωων καταγράφονταν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία) ελέγχονταν και καταγράφονταν επίσης. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού η μέση θερμοκρασία ήταν  $25 \pm 0,8^\circ\text{C}$  και η μέση σχετική υγρασία  $35 \pm 5\%$ .

### Χορήγηση της λεβαμιζόλης

Κάτω από ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες, μελετήθηκε η κατανομή και η απομάκρυνση της υδροχλωρικής λεβαμιζόλης μετά από τη χορήγησή της στα πρόβατα. Μια ποσότητα 300 mg/40 kg σ.β. υδροχλωρικής λεβαμιζόλης με τη μορφή δισκίου χορηγήθηκε *per os* σε κάθε πρόβατο, ποσότητα η οποία αντιστοιχούσε σε 7,5 mg/kg σ.β.

### Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε συγκεκρι-

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental animals

In this experiment, twenty-two, 2 years-old sheep healthy Artas' breed, weighing  $40 \pm 2$  kg, were used. The sheep were kept in the field having free access to the pasture and they also had *ad libitum* access to water. Since pasture energy and nutrients could not cover their production needs, they were additionally fed on antiparasitic-free balanced ratio and allowed to acclimate for three days before dosing. The supplemented feed provided was consisted of corn (3.7 Mj energy and 5 g/kg dry matter), barley (3.3 Mj energy and 10 g/kg dry matter) or cottonseed meal (7.5 Mj energy and 139 g/kg dry matter). None of the sheep had received any medication four weeks prior to the experiment. The health and the behaviour of the experimental animals were registered and the environmental conditions (temperature, humidity) were controlled and registered as well. During the experiment the mean temperature was  $25 \pm 0.8^\circ\text{C}$  and relative humidity was  $35 \pm 5\%$ .

### Administration of levamisole

Under controlled experimental conditions, tissue distribution and depletion of levamisole hydrochloride after administration to sheep, was studied. A quantity of 300 mg/40 kg b.w. of levamisole hydrochloride in the form of a tablet was administered *per os* to each sheep corresponding to 7.5 mg of levamisole per kg b.w.

### Tissue sampling

Sampling was performed at specific time points after medication, comprised of five samples of four sheep, each taken at 24 h, 96 h, 168 h, 240 h and 336 h (Table 1). The sheep were sacrificed and the target tissues (muscle, liver, kidney, fat) were collected, put in plastic bags and stored at  $-45^\circ\text{C}$  until the analysis. The sample size was 500 g for muscle tissue taken from femur region, 500 g from liver, the kidneys and 100 g perirenal fat. Also, tissue samples from the control animals were collected to establish baseline values for chromatographic analysis (baseline compensation control).

### Instrumentation

The liquid chromatographic system was the Alliance 2690 MX, Revision 1.21 Separation Module, (Waters) equipped with a UV/vis Photodiode Array Detector 991 (Waters). Injections were performed automatically on a Zorbax® SB-C<sub>18</sub>, 5 μm (250 x 4.6 mm) stainless steel column (Hewlett Packard), with a LiChrospher 60 RP-select B pre-column heated at  $50^\circ\text{C}$  and levamisole detection was performed by using a UV/vis PDA detector adjusted at a wavelength range from 200



μένες χρονικές στιγμές (5 δείγματα) μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, δηλαδή στις 24, 96, 168, 240 και 336 ώρες (Πίνακας 1). Μετά την ευθανασία των προβάτων, οι ιστοί-στόχοι (κρέας, ήπαρ, νεφρός, λίπος) συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες και συντηρήθηκαν στους  $-45^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυση. Το μέγεθος του δείγματος ήταν 500 γραμμάρια μυϊκού ιστού από τη περιοχή του μηρού, 500 γραμμάρια ήπατος, οι νεφροί και 100 γραμμάρια περινεφρικού λίπους. Δείγματα ιστών λήφθηκαν, επίσης, από τα πρόβατα μάρτυρες, στους οποίους δεν είχε χορηγηθεί υδροχλωρική λεβαμιζόλη, με σκοπό τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση της βασικής γραμμής κατά τη χρωματογραφική ανάλυση (baseline compensation control).

### Μηχανολογικός εξοπλισμός

Το υδροχρωματογραφικό σύστημα ήταν το Alliance 2690 MX, Revision 1.21 Separation Module (Waters, Η.Π.Α.), εφοδιασμένο με τον ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού πολλαπλών φωτοδιόδων-UV/vis Photodiode Array Detector 991 (Waters, Η.Π.Α.). Οι εγχύσεις γίνονταν αυτόματα σε ανοξείδωτη στήλη Zorbax® SB-C<sub>18</sub>, 5 μm (250 x 4.6 mm) (Hewlett Packard, Η.Π.Α.) με προστήλη LiChrospher 60 RP-select B σε θερμοκρασία  $50^{\circ}\text{C}$  και η ανίχνευση της λεβαμιζόλης γινόταν με τον ανιχνευτή UV/vis PDA προσαρμοσμένο σε ένα εύρος μήκους κύματος από 200 nm έως 480 nm και ρυθμισμένο στα  $\lambda_{\text{max}} \sim 220$  nm. Οι υπόλοιπες συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η συσκευή υπερκαθαρού νερού Ultrapure Water RiO™-Milli-Q®system, Millipore (Η.Π.Α.), ο αναμικτήρας vortex mixer Gennie 2 (Scientific Industries, Η.Π.Α.), ο ομογενοποιητής PCU Polytron-Aggregate® (Kinematica AG, Ελβετία), το λουτρό υπερήχων Transsonic 460 (Elma, Γερμανία), η συσκευή εξάτμισης διαλυτών reacti-therm heating module (Pierce, Αγγλία.), η φυγόκεντρος model 102B-K-UT (Runne, Γερμανία), ο αναλυτικός ζυγός model AE240 (Mettler, Ελβετία) και οι αυτόματες πιπέτες (Gilson, Γαλλία).

### Αντιδραστήρια

Το φαρμακευτικό σκεύασμα ήταν το Tridicine™ 300 mg (Farmazac-SynVet Ltd-Αθήνα-Ελλάδα) στη μορφή δισκίου με τη σύνθεση που φαίνεται στον πίνακα 2.

Η πρώτη αναλυτική χημική ουσία της υδροχλωρικής λεβαμιζόλης (Εικόνα 1) είχε προμηθευθεί από την εταιρεία Aldrich (Η.Π.Α.). Τα αντιδραστήρια καθαρότητας HPLC, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, το χλωροφόρμιο αναλυτικής καθαρότητας, ήταν από την εταιρεία LabScan (Αγγλία). Το τριφθοροξικό οξύ, το υδροχλωρικό οξύ, το καυστικό νάτριο και το άνυδρο θειικό νάτριο, αναλυτικής καθαρότητας, ήταν από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Τα

**Πίνακας 1.** Πλανόγραμμα δειγματοληψιών και ο αριθμός των αναλύσεων.

**Table 1.** Sampling plan and the number of analyses.

Χρόνος μετά την παύση χορήγησης της λεβαμιζόλης (ώρες)				
24	96	168	240	336
Αριθμός ζώων ανά ημέρα δειγματοληψίας				
4	4	4	4	4
Δύο (2) μάρτυρες				
Είδος δείγματος				
Κρέας	Ήπαρ	Νεφρός	Λίπος	
20 δείγματα	20 δείγματα	20 δείγματα	20 δείγματα	
Σύνολο αναλύσεων: 88				

**Πίνακας 2.** Σύνθεση (%) του φαρμακευτικού σκευάσματος.

**Table 2.** Synthesis (%) of the pharmaceutical product.

Δραστική ουσία	Ποσοστό (%)
Υδροχλωρική λεβαμιζόλη	0,300 g
Έκδοχα	Ποσοστό (%)
Λακτόζη	1,310 g
Άλευρο καλαμποκιού	0,720 g
Στεατικό μαγνήσιο	0,015 g
Γλυκολικό αμυλούχο νάτριο	0,120 g
Λαυρικό θειικό νάτριο	0,025 g
Ποβιδόνη	0,100 g

nm to 480 nm and monitored at  $\lambda_{\text{max}} \sim 220$  nm. The rest of the apparatuses used were: Ultrapure Water RiO™-Milli-Q®system, Millipore (USA), vortex mixer Gennie 2 (Scientific Industries, USA), aggregator model PCU Polytron-Aggregate® (Kinematica AG, Switzerland), ultrasonic bath Transsonic 460 (Elma, Germany), reacti-therm heating module (Pierce, U.K.), centrifuge model 102B-K-UT (Runne, Germany), analytical balance model AE240 (Mettler, Switzerland) and automated pipettes (Gilson, France).

### Chemicals and reagents

The pharmaceutical product was the Tridicine™ 300 mg (Farmazac-SynVet Ltd-Athens-Greece) in the form of a tablet having the synthesis which can be seen in table 2.

The analytical chemical standard of levamisole hydrochloride (Figure 1) was purchased from Aldrich (USA). HPLC grade methanol, acetonitrile, ethyl acetate and chloroform p.a. were from LabScan, (U.K.)

φίλτρα διήθησης της κινητής φάσης τύπου HV 0,45  $\mu\text{m}$  και FH 0.5  $\mu\text{m}$  και τα φίλτρα διήθησης του τελικού εκχυλίσματος Ø13 mm Millex®GV Hydrophilic PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ , ήταν από την εταιρεία Millipore (H.Π.Α.).

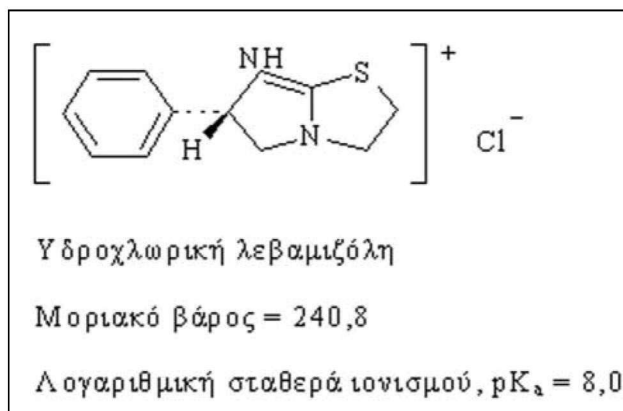
### Πρότυπα διαλύματα και χρωματογραφία

Το μητρικό διάλυμα της λεβαμιζόλης 1.000  $\mu\text{g/kg}$  παρασκευάστηκε σε μεθανόλη HPLC με τη χρησιμοποίηση μηχανικού αναδευτήρα και λουτρού υπερήχων και συντηρήθηκε στους 4°C για 3 μήνες. Οι ενδιάμεσες πρότυπες αραιώσεις παρασκευάστηκαν επίσης σε μεθανόλη HPLC. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας ήταν πάντα πρόσφατα παρασκευασμένα με αραιώσεις σε κινητή φάση ώστε να έχουμε συγκεντρώσεις 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0  $\mu\text{g/mL}$ . Επίσης, παρασκευάζονταν και διαλύματα σε μεθανόλη για τις επιβαρύνσεις για το κρέας, το νεφρό και το λίπος ( $n=5$ ) ώστε να έχουμε επίπεδα επιβάρυνσης 1/2 MRL, 1 MRL, 2 MRL και 4 MRL των 10  $\mu\text{g/kg}$ , ενώ για το ήπαρ τα αντίστοιχα επίπεδα επιβάρυνσης υπολογίζονταν στο MRL των 100  $\mu\text{g/kg}$  (Πίνακας 3) (Κανονισμός, 508/1999).

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της λεβαμιζόλης, είχε τα παρακάτω χαρακτηριστικά: τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης  $r^2 = 0,999884$ , κλίση της ευθείας (slope) = 0,00447, σταθερός όρος (y-intercept) = 0,000150. Ο χρόνος συγκράτησης της λεβαμιζόλης ήταν  $R_t = 4,334 \pm 0,025 \text{ min}$  ( $RSD\% = 0,58$ ) ( $n = 10$ ). Σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε (Tympenou and Xylouri 2006), η μέση ανάκτηση ( $R\%$ ) που επιτεύχθηκε ήταν  $75,65 \pm 2,74\%$  ( $RSD\% = 10,4$ ) για το κρέας,  $70,25 \pm 1,07\%$  ( $RSD\% = 1,52$ ) για το νεφρό,  $72,37 \pm 3,6\%$  ( $RSD\% = 4,97$ ) για το ήπαρ και  $69,44 \pm 2,22\%$  ( $RSD\% = 3,19$ ) για το λίπος ( $n = 5$ ). Το όριο ανίχνευσης (LOD) ήταν 2,0  $\mu\text{g/kg}$  για το κρέας, το νεφρό και το λίπος και 5,0  $\mu\text{g/kg}$  για το ήπαρ ( $n = 5$ ). Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ), σύμφωνα με την ισχύουσα εξίσωση  $LOQ = 3 \times LOD$ , ήταν 6,6  $\mu\text{g/kg}$  για το κρέας, το νεφρό και το λίπος και 16,5  $\mu\text{g/kg}$  για το ήπαρ. Στην εικόνα 2 φαίνονται χρωματογραφήματα δειγμάτων ήπατος και νεφρού ζώων που πήραν τη θεραπευτική αγωγή.

### Μέθοδος στατιστικής ανάλυσης

Η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή η οποία προτείνεται από την Επιτροπή για τα Φαρμακευτικά Προϊόντα για Κτηνιατρική Χρήση (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use-CVMP) για τον υπολογισμό του χρόνου αναμονής, εφαρμόζοντας το πρόγραμμα Withdrawal-Time Calculation Programme WT1.4 (Hekman 2004). Το ίδιο ισχύει για το νεφρό και το



**Εικόνα 1.** Υδροχλωρική λεβαμιζόλη, μοριακό βάρος = 240,8 και  $pK_a = 8,0$

**Figure 1.** Levamisole hydrochloride, m.w. = 240.8 and  $pK_a = 8.0$

**Πίνακας 3.** Μέγιστο Όριο Καταλοίπων – MRL (Καν. 508/1999).

**Table 3.** Maximum Residue Limit – MRL (Reg. 508/1999).

Ουσία	Κατάλοιπο - Δείκτης	Είδος ζώου	MRL	Ιστός-στόχος
Λεβαμιζόλη υδροχλωρική	Λεβαμιζόλη	Βοοειδή, πρόβατα, χοίροι, πουλερικά	10 $\mu\text{g/kg}$ 100 $\mu\text{g/kg}$	Κρέας, νεφροί, λίπος Ήπαρ

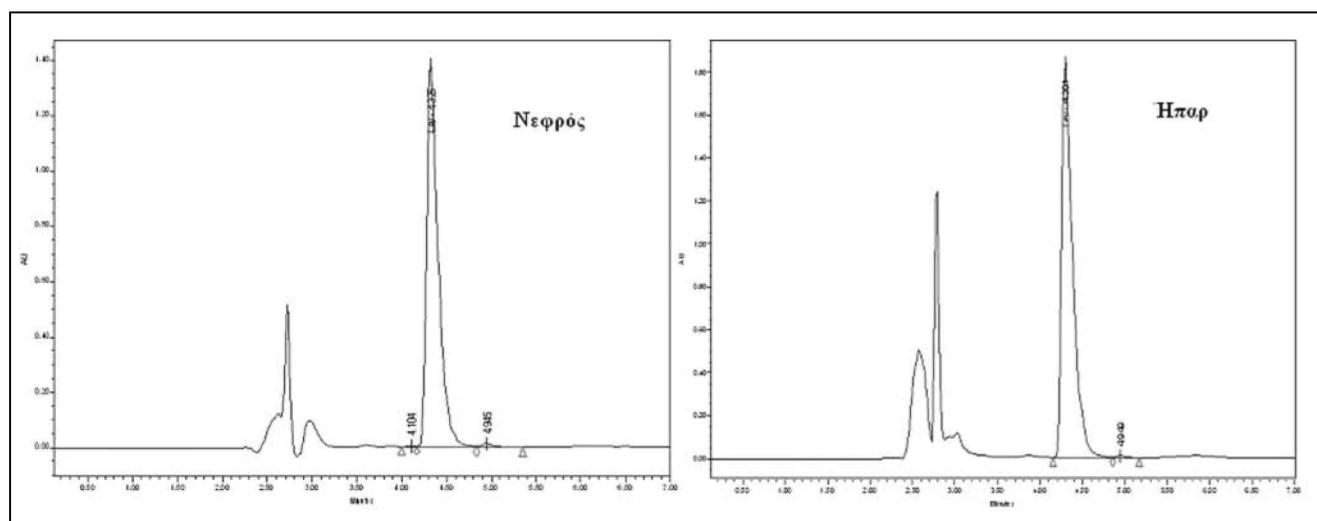
and trifluoroacetic acid, hydrochloric acid, sodium hydroxide and sodium sulfate anhydride of p.a. grade were from Merck (Germany). Mobile phase filters type HV 0.45  $\mu\text{m}$  and FH 0.5  $\mu\text{m}$  and syringe filters Ø13 mm Millex®GV Hydrophilic PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  were from Millipore (USA).

### Levamisole standards and chromatography

Levamisole stock solution of 1.000  $\mu\text{g/kg}$  was prepared in HPLC methanol using vortex mixer and sonication and stored at 4°C for 3 months. Intermediate standard solutions were also prepared in HPLC methanol. Subsequent working standard solutions were always freshly prepared from the stock solution by diluting aliquots in the mobile phase used to get concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0  $\mu\text{g/mL}$ . Spiking solutions for muscle, kidney and fat tissues ( $n=5$ ) were prepared also in methanol in order to obtain fortification levels of 1/2 MRL, 1 MRL, 2 MRL and 4 MRL of 10  $\mu\text{g/kg}$  and for liver tissue the corresponding fortifications were calculated based on the MRL of 100  $\mu\text{g/kg}$  (Table 3) (Regulation 508/1999).

The calibration standard curve used for the levamisole concentrations calculation was  $r^2 = 0.999884$ ,





**Εικόνα 2.** Χρωματογραφήματα πραγματικών δειγμάτων νεφρού και ήπατος.

**Figure 2.** Chromatograms of real incurred kidney and liver tissue samples.

ήπαρ, όργανα τα οποία θεωρούνται οι ιστοί επιλογής για τα κατάλοιπα. Ο χρόνος αναμονής υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το παραπάνω πρόγραμμα με την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της λογαριθμικής μετατροπής των μέσων τιμών των δεδομένων, όταν το άνω όριο ανοχής, με 95% όριο εμπιστοσύνης, ήταν κάτω από το MRL, το οποίο ορίστηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα κατάλοιπα της λεβαμιζόλης στους ιστούς του προβάτου (Hekman 2004).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 4 αναφέρονται τα αναλυτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με τις μέσες τιμές για τους τέσσερις ιστούς-στόχους κάθε σημείου δειγματοληψίας από τα αντίστοιχα πρόβατα μετά τη θεραπευτική αγωγή.

Όπως παρατηρείται, οι συγκεντρώσεις της λεβαμιζόλης σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν ήταν υψηλότερες την πρώτη ημέρα μετά τη φαρμακευτική αγωγή και στη συνέχεια παρουσίαζαν πτώση (Εικόνα 3). Όλες οι τιμές που ήταν κάτω από το LOQ δεν συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα 4 και αναφέρονται ως τιμές κάτω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (<LOQ).

Τα αποτελέσματα της ημιλογαριθμικής καμπύλης των συγκεντρώσεων της λεβαμιζόλης σε σχέση με το χρόνο, όλα τα αναλυτικά δεδομένα, η γραμμή παλινδρόμησης, το άνω όριο εμπιστοσύνης (95%), καθώς και ο υπολογισμένος χρόνος αναμονής για το MRL 10 µg/kg για το νεφρό και 100 µg/kg για το ήπαρ, αναφέρονται στις εικόνες 4 και 5. Επίσης, οι παράμετροι του υπολογισμού του χρόνου αναμονής της λεβαμιζόλης, σύμφωνα με το πρόγραμμα WT1.4, για το νεφρό και το

slope = 0.00447, y-intercept = 0.000150. Levamisole retention time achieved was  $R_t = 4.334 \pm 0.025$  min (RSD% = 0.58) (n = 10). According to the method used (Tyrpenou and Xylouri, 2006), mean recovery (R%) achieved was  $75.65 \pm 2.74\%$  (RSD% = 10.4) for muscle tissue,  $70.25 \pm 1.07\%$  (RSD% = 1.52) for kidney,  $72.37 \pm 3.6\%$  (RSD% = 4.97) for liver and  $69.44 \pm 2.22\%$  (RSD% = 3.19) for fat (n = 5). The limit of detection (LOD) was 2.0 µg/kg for muscle, kidney and fat and 5.0 µg/kg for liver tissue (n = 5). The limit of quantification (LOQ), according to the equation  $LOQ = 3.3 \times LOD$ , was 6.6 µg/kg for muscle, kidney and fat and 16.5 µg/kg for liver. In figure 2, characteristic chromatograms of real incurred liver and kidney samples can be observed.

## Method of statistical analysis

The linear regression method was that proposed by the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) for the calculation of the withdrawal time for slaughter following the programme Withdrawal-Time Calculation Programme WT1.4 (Hekman 2004) and for kidney and liver the tissue of choice for residue surveillance. As far as withdrawal time for muscle and fat tissue is concerned, there was no need for calculation, because levamisole levels beyond 4<sup>th</sup> day after medication were below the LOQ. The withdrawal time was estimated using the above mentioned programme with linear regression analysis of the semi-log-transformed tissue concentrations and determined at the time when the upper one-sided tolerance limit, with a confidence of 95%, was below the MRLs established by the EU for the residues of levamisole in sheep tissues (Hekman 2004).

**Πίνακας 4.** Λεβαμιζόλη σε ιστούς προβάτου (μg/kg) μετά από per os χορήγηση στη δόση των 300 mg/40 kg σ.β. (4 πρόβατα ανά δείγμα).  
**Table 4.** Levamisole in sheep tissues (μg/kg) after per os administration at the dose of 300 mg/40 kg b.w. (4 sheep per sample).

α/α	Κρέας	Mean	SD	Λίπος	Mean	SD	Νεφρός	Mean	SD	Ήπαρ	Mean	SD
Πρώτη ημέρα μετά τη θεραπευτική αγωγή (24 ώρες)												
1	120,08			177,58			672,43			1308,08		
2	152,47	233,96	177,8	161,18	173,89	29,02	544,21	838,88	381,72	1497,09	1988,77	887,24
3	194,51			144,41			740,59			1878,79		
4	495,77			212,38			1398,29			3271,11		
Τέταρτη ημέρα μετά τη θεραπευτική αγωγή (96 ώρες)												
1	6,47			7,20			34,47			118,24		
2	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-	17,63	31,20	9,22	99,39	118,24	30,24
3	<LOQ			<LOQ			34,46			160,91		
4	<LOQ			<LOQ			38,25			94,41		
Έβδομη ημέρα μετά τη θεραπευτική αγωγή (168 ώρες)												
1	<LOQ			<LOQ			10,26			56,95		
2	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-	16,77	16,32	7,16	52,72	64,66	12,15
3	<LOQ			<LOQ			26,24			79,40		
4	<LOQ			<LOQ			12,01			69,55		
Δέκατη ημέρα μετά τη θεραπευτική αγωγή (240 ώρες)												
1	<LOQ			<LOQ			18,13			19,05		
2	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-	14,81	19,03	3,97	38,81	27,05	9,8
3	<LOQ			<LOQ			24,37			31,46		
4	<LOQ			<LOQ			18,81			18,88		
Δέκατη τέταρτη ημέρα μετά τη θεραπευτική αγωγή (336 ώρες)												
1	<LOQ			<LOQ			52.18*			12,77		
2	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-	9.04	39,18	20,66	22,71	16,58	4,6
3	<LOQ			<LOQ			42.47*			13,29		
4	<LOQ			<LOQ			53.04*			17,55		

\* απομακρυσμένες τιμές (outliers) που δεν λήφθηκαν υπόψη

LOD = 6.6 μg/kg για κρέας, νεφρό, λίπος και LOQ = 16.5 μg/kg για ήπαρ

ήπαρ συμπεριλαμβάνονται στους πίνακες 5 και 6, αντίστοιχα. Όσον αφορά στα δεδομένα για τον υπολογισμό του χρόνου αναμονής στο κρέας και το λίπος, διαπιστώθηκε ότι τα κατάλοιπα της υδροχλωρικής λεβαμιζόλης στους υπό ανάλυση ιστούς απομακρύνθηκαν γρήγορα μέχρι την τέταρτη ημέρα μετά την παύση χορήγησης του φαρμάκου, σε επίπεδα κάτω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (<LOQ). Μόνο ένα δείγμα και από τους δύο ιστούς, την τέταρτη ημέρα μετά την παύση της αγωγής, ήταν πάνω από το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (>LOQ). Έτσι, συμπεραίνεται ότι τα κατάλοιπα στο κρέας και το λίπος δεν μπορούν να ληφθούν ως δεδομένα για τον υπολογισμό του χρόνου αναμονής, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Αξιολόγηση των Κτηνιατρικών Φαρμακευτικών Προϊόντων (EMA 1995).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η λεβαμιζόλη βιοσυγκεντρώνεται κατά προτίμηση

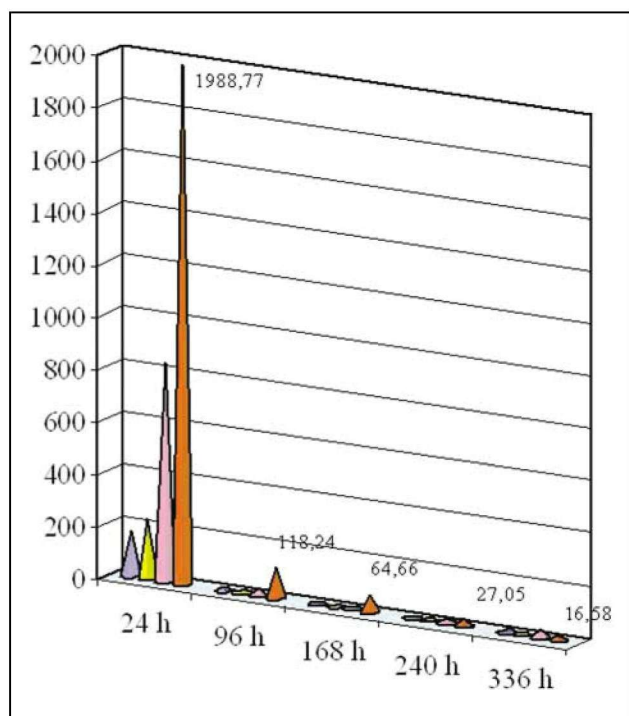
## RESULTS

The analytical results of this depletion study, with the mean calculated values from the four target tissues of each sampling point of four sheep after medication, are presented in table 4.

As it can be observed, levamisole concentrations in all tissues tested were higher the first day after medication and declined thereafter (Figure 3). Values below the LOQ are not included and are marked as <LOQ.

The results of the semi-log curve of levamisole concentration in relation to time, relative data, the regression line, the upper confidence limit (95%), as well as the calculated withdrawal time for the MRL of 10 μg/kg for kidney and 100 μg/kg for liver, are presented in figures 4 and 5, respectively. Also, withdrawal time parameters of levamisole in kidney and liver, calculated by the programme WT1.4, are included in tables 4 and 5, respectively. Concerning calculation of

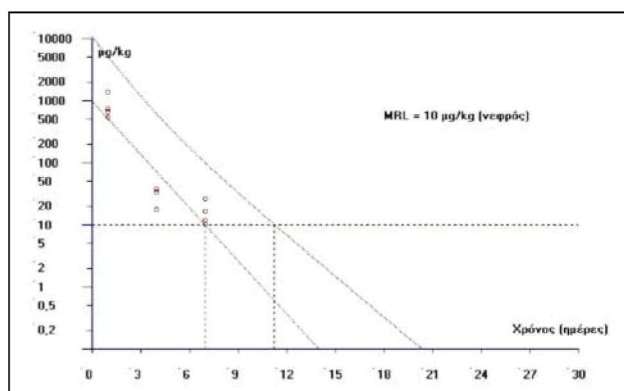




**Εικόνα 3.** Ιστογράμμο απομάκρυνσης των καταλοίπων της λεβαμιζόλης από το κρέας, το ήπαρ, το λίπος και το νεφρό των προβάτων.

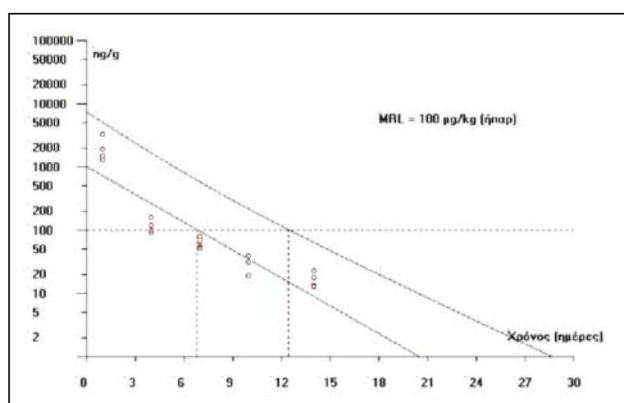
**Figure 3.** Histogram of levamisole residue depletion from muscle, liver, kidney and fat sheep tissues.

στο ήπαρ και το νεφρό, όπως επίσης αναφέρεται από την EMEA (EMEA Summary 2). Φαίνεται σαφώς ότι το ήπαρ ειδικά αποτελεί ένα σημαντικό ιστό, από την άποψη των καταλοίπων, που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στην ανάλυση για τον προσδιορισμό καταλοίπων τόσο για τις μελέτες απομάκρυνσης όσο και για τον καθορισμό του χρόνου αναμονής. Αναφορικά με τον υπολογισμό του χρόνου αναμονής, θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα κατάλοιπα στο νεφρό παρουσίασαν βαθμιαία πτώση τις ημέρες 1, 4 και 7 και ήταν πάνω από το MRL (10 µg/kg) κατά τη διάρκεια των ημερών 10 και 14. Οι αυξημένες αυτές τιμές αξιολογήθηκαν ως ενδεχόμενο αναλυτικό λάθος, το οποίο δεν μας επέτρεψε τη χρησιμοποίησή τους στη στατιστική επεξεργασία για τον υπολογισμό του χρόνου αναμονής, γιατί θεωρήθηκαν απομακρυσμένες τιμές (outliers). Τα κατάλοιπα στο ήπαρ ήταν πάνω από το MRL (100 µg/kg) την ημέρα 1 και 4 και κάτω από το MRL, αλλά υψηλότερα από το LOQ στη συνέχεια. Τα παραπάνω ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με όσα αναφέρονται από την EMEA, όπου αναφέρεται ότι μετά τη 14η ημέρα η συγκεντρώνση της αυτούσιας ουσίας στους εν λόγω ιστούς είναι μικρή, αλλά σε σταθερή αναλογία. Επομένως, είναι προφανές ότι τα κατάλοιπα αυτά είναι περισσότερο σταθερά και απαιτείται στατιστική



**Εικόνα 4.** Ημιλογαριθμική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της λεβαμιζόλης στο νεφρό.

**Figure 4.** Semi-log representation of levamisole concentrations in sheep kidney.



**Εικόνα 5.** Ημιλογαριθμική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της λεβαμιζόλης στο ήπαρ.

**Figure 5.** Semi-log representation of levamisole concentrations in sheep liver.

withdrawal time for muscle tissue and fat showed that levamisole residues in these tissues were depleted fast until the 4<sup>th</sup> day after medication, at levels below the LOQ and only one sample of both tissues on day 4 after medication was above the LOQ. Hence, it is presumed that residues in muscle and fat could not be taken into account for withdrawal time calculation, according to The European Agency for the Evaluation of Veterinary Medicinal Products (EMEA 1995).

## DISCUSSION

The results of the present study clearly indicate that levamisole is preferably accumulated in liver and kidney in good agreement with EMEA (EMEA Summary 2) and clearly demonstrate that especially liver represents an important tissue from the residue point of view. Concerning withdrawal time determination, it should be pointed out that the residues in kidney showed a gradual depletion during the days 1, 4 and 7 and an increase over

**Πίνακας 5.** Παράμετροι του χρόνου αναμονής της λεβαμιζόλης στο νεφρό.**Table 5.** Withdrawal time parameters of levamisole in kidney (Programme WT1.4).

Παράμετροι του χρόνου αναμονής (ΝΕΦΡΟΣ)			
SSTOT	.....254,9946	SLOPE	.....-0,9170
SSPE	.....1,3926	SXY	.....0,7666
SSREG	.....249,1176	F-test	.....28.9811 (1/9) (p<0,025)
SSLOF	.....4,4844	Cochran-test	.....0,3717 (3/3) (p>0,05)
ICTP	.....981,9776	Bertlett-test	.....0,0705 (2) (manually)
CORR	.....-0,6567	Shapiro/Wilk	.....0,9455 (12) (p>0,10)
Υπολογισμένος χρόνος αναμονής = 11,43 ημέρες			
*SSPE = sum of squares due to variability within the groups		*SXY = residual error	
*SSREG = sum of squares due to regression		*F-test = test for log-linearity of the data-set	
*SSLOF = sum of squares due to lack of fit		*Cochran-test = test for homogeneity of variances	
*EXP (CPT) = intercept of the regression-line		*Bartlett-test = test for homogeneity of variances	
*LK (SLOPE) = calculated slope of the regression-line		*Shapiro/Wilk = test for normality of the calculated residuals	
*CORR = calculated correlation coefficient			

**Πίνακας 6.** Παράμετροι του χρόνου αναμονής της λεβαμιζόλης στο ήπαρ.**Table 6.** Withdrawal time parameters of levamisole in liver (Programme WT1.4).

Παράμετροι του χρόνου αναμονής ΗΠΑΡ			
SSTOT	.....460,6364	SLOPE	.....-0,9077
SSPE	.....1,3801	SXY	.....0,7463
SSREG	.....450,6101	F-test	.....31.3239 (3/15) (p<0,025)
SSLOF	.....8,6462	Cochran-test	.....0,3549 (5/3) (p>0,05)
ICTP	.....1016,5707	Bertlett-test	.....1,9649 (4) (manually)
CORR	.....-0,3377	Shapiro/Wilk	.....0,9472 (20) (p>0,10)
Υπολογισμένος χρόνος αναμονής = 12,6 ημέρες			
*SSPE = sum of squares due to variability within the groups		*SXY = residual error	
*SSREG = sum of squares due to regression		*F-test = test for log-linearity of the data-set	
*SSLOF = sum of squares due to lack of fit		*Cochran-test = test for homogeneity of variances	
*EXP (CPT) = intercept of the regression-line		*Bartlett-test = test for homogeneity of variances	
*LK (SLOPE) = calculated slope of the regression-line		*Shapiro/Wilk = test for normality of the calculated residuals	
*CORR = calculated correlation coefficient			

ανάλυση σύμφωνα με όσα περιγράφονται στο "Note for Guidance: Approach towards harmonisation of withdrawal times" (EMA, 1995).

Για τον υπολογισμό του χρόνου αναμονής για το νεφρό χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των τριών πρώτων χρονικών στιγμών δειγματοληψίας, δηλαδή των ημερών 1, 4 και 7, και για το ήπαρ χρησιμοποιήθηκαν όλα τα αναλυτικά δεδομένα από όλα τα σημεία δειγματοληψίας. Η στατιστική ανάλυση έδωσε χρόνο αναμονής για το νεφρό και το ήπαρ 11,43 και 12,6 ημέρες, αντίστοιχα. Έτσι, μπορεί να προταθεί με ασφάλεια κατάλληλος χρόνος αναμονής 13 ημερών για τη λεβαμιζόλη. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με εκείνα της EMA, ότι δηλαδή τα επίπεδα της λεβαμιζόλης πέφτουν κάτω από το MRL μέχρι την ημέρα 21 και με εκείνα των Kindred and Walcott (1996), ότι δηλαδή οι χρόνοι αναμονής της λεβαμιζόλης κυμαίνονται από 2

the MRL (10µg/kg) on days 10 and 14. These higher figures were taken as a possible analytical mistake, which did not enable us to use them in the statistical analysis for the determination of withdrawal time, because they were assessed as outliers. The residues in liver were over the MRL (100 µg/kg) on days 1 and 4 and below the MRL, but higher than the LOQ thereafter. This finding is in accordance with that of the EMA, where it is mentioned that over 14 day time the unchanged drug concentration in these tissues is a small, but constant portion. Therefore, it is obvious that these residues are more consistent and they need statistical analysis according to that described in the Note for Guidance: Approach towards harmonisation of withdrawal times (EMA 1995).

Referring to withdrawal time calculation for kidney, the data of the first three sampling points, e.g. the 1, 4



έως 19 ημέρες ανάλογα με το είδος του ζώου και το φαρμακευτικό σκεύασμα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο προτεινόμενος χρόνος αναμονής των 13 ημερών είναι αποδεκτός.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, με βάση τη σωστή οργάνωση και εκτέλεση του βιολογικού πειραματισμού, αλλά και την αποδοτικότητα της αναλυτικής μεθόδου που εφαρμόστηκε, έδειξαν ότι τα κατάλοιπα της λεβαμιζόλης απομακρύνονται γρήγορα από τους ιστούς του προβάτου και πιο συγκεκριμένα:

1. Οι συγκεντρώσεις των καταλοίπων της λεβαμιζόλης μετά από την εφ' άπαξ χορήγηση του φαρμακευτικού σκευάσματος Tridicine™ 300 mg (Farmazac SynVet ΕΠΕ) στη θεραπευτική δόση των 7,5 mg/kg σ.β./ημέρα, στο κρέας και στο λίπος, κατέρχονται κάτω του MRL των 10 µg/kg εντός των τριών πρώτων ημερών μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Στους νεφρούς οι συγκεντρώσεις της λεβαμιζόλης βρίσκονται σε επίπεδα κάτω του MRL των 10 µg/kg κατά την ημέρα 14 μετά την παύση χορήγησης (9µg/kg). Τέλος, στο ήπαρ, το οποίο αποτελεί και το κύριο όργανο για τον καθορισμό του χρόνου αναμονής, οι συγκεντρώσεις της λεβαμιζόλης κατέρχονται κάτω του MRL των 100 µg/kg αμέσως μετά την 4η ημέρα από την παύση χορήγησης του φαρμάκου.

2. Ο χρόνος αναμονής (Withdrawal Period) για το Μέγιστο Όριο Καταλοίπων (MRL) των 100 µg/kg λεβαμιζόλης για το ήπαρ των προβάτων με όριο εμπιστοσύνης (Confidence Interval) 95% υπολογίστηκε σε 12,6 ημέρες. Λαμβάνοντας υπόψη και το χρόνο αναμονής για το νεφρό, ο οποίος υπολογίστηκε σε 11,43 ημέρες, ο χρόνος αναμονής που προτείνεται με ασφάλεια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, είναι οι 13 ημέρες. Σύμφωνα με το χρόνο αυτό, είναι σαφές ότι οι συγκεντρώσεις των καταλοίπων της λεβαμιζόλης στους ιστούς του προβάτου βρίσκονται σε επίπεδα κατά πολύ χαμηλότερα από το MRL, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι μετά την πάροδο του χρόνου αυτού το τελικό προϊόν είναι απολύτως ασφαλές για τον καταναλωτή.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε από τη φαρμακευτική εταιρεία Farmazac SynVet/Veterinary & Public Health Products, Αθήνα-Ελλάδα, στα πλαίσια σχετικού προγράμματος. □

and 7 day were used, because the following two sampling points of 10 and 14 day found to be at the same concentration levels and did not allow to accurately calculate the withdrawal time. As about liver, all the data from all sampling points were used. This statistical analysis gave a withdrawal time for kidney and liver of 11.43 and 12.6 days, respectively. Hence, an appropriate mean withdrawal time of 13 days for levamisole could be safely proposed. Comparing our results to those of the EMEA that levamisole levels drop below the MRL until day 21 and those from Kindred and Walcott (1996) that levamisole withdrawal periods ranging from 2 to 19 days depending on the species and the dosage regime, we can conclude that the withdrawal time proposed of 13 days is acceptable.

## CONCLUSIONS

The results of this study, based on the proper organization and execution of the biological experiment, as well as on the efficiency of the analytical method applied, showed that levamisole residues are depleted fast from the sheep tissues, and more precisely:

1. Levamisole residue concentrations after a single dose of the pharmaceutical product Tridicine™ 300 mg (Farmazac SynVet Ltd) at the therapeutic dose of 7.5 mg/kg b.w./day, in muscle and fat drop below the MRL of 10 µg/kg in the first three days after dosing. In kidney, levamisole concentrations drop below the MRL of 10 µg/kg during the 14<sup>th</sup> day after dosing (9µg/kg). Finally, in liver, which is the main organ for withdrawal time determination, levamisole concentrations drop below the MRL of 100 µg/kg, just after the 4<sup>th</sup> day after medication.

2. The withdrawal time, which was calculated for the MRL of 100 µg/kg in sheep liver, with confidence interval 95%, found to be 12.6 days. Taking into account the results for the kidney, in which levamisole concentrations remain also during the 14<sup>th</sup> day at levels below the MRL, the withdrawal time suggested should be the higher value of 13 days. According to this time, it is clear that levamisole concentrations in sheep tissues are at levels quite lower than MRL, which means that after this time the final product is absolutely safe for consumption.

## Acknowledgments

This study was financially supported by the pharmaceutical company Farmazac SynVet/Veterinary & Public Health Products in Athens-Greece, in the framework of a relevant research project. □

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Braund KG (2003) Neurotoxic Disorders. In: Braund, K.G. (Ed), Clinical Neurology in Small Animals-Localization, Diagnosis and Treatment. International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA, pp 1-23.
- Chankvetadze B, Burjanadze N, Santi M, Massolini G, Blaschke G (2002). Enantioseparation of tetramisole by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography and application of these techniques to enantiomeric purity determination of a veterinary drug formulation of L-levamisole. *J Sep Sci*, 25:733-740.
- Cherlet M, de Baere S, Croubels S, de Backer P (2000) Quantitative analysis of levamisole in porcine tissues by high-performance liquid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 742:283-293.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 508/1999 of 4 March 1999 amending Annexes I to IV to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Communities L 60/16 9. 3. 1999.
- Dolezalova M, Tkaczykova M (2001) LC determination of the enantiomeric purity of levamisole using stationary phase with bonded naphthylethylcarbamoylated-beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal*, 25:407-415.
- EMA (<1995) EMA Levamisole-Summary (2). Committee for Veterinary Medicinal Products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit.
- EMA (1995) EMA, Note for Guidance: Approach towards harmonisation of withdrawal times. The European Agency for the Evaluation of Veterinary Medicinal Products. EMA/MRL/036/95-Final.
- Hekman P (2004) BRD Agency for the Registration of Veterinary Medicinal Products, The Netherlands, pp 1-8.
- IPCS (1991) IPCS-Levamisole. In: Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. The thirty-sixth meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). WHO Food additives series: 27. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, pp 75-101.
- Kindred T, Walcott J (1996) The FSIS National Residue Programme. In: Haagsma N, Ruiter A (Eds), Proceedings of the EuroResidue III conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, COLOPHON, Veldhoven, The Netherlands, pp 175-184.
- McKellar QA (1997) Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Vet Parasitol*, 72:413-435.
- Palermo D, Milillo MA (1979) Gas-chromatographic determination of levamisole residues in sheep flesh. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 55:1859-1862.
- Paulson GD, Feil VJ (1996) The disposition of 14C-levamisole in the lactating cow. *Xenobiotica* 26:863-875.
- Rose MD, Argent LC, Shearer G, Farrington WHH (1995) The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 2. levamisole. *Food Addit Contam* 12:185-194.
- Sahagun AM, Teran MT, Garcia JJ, Fernandez N, Sierra M, Diez MJ (2001) Oral bioavailability of levamisole in goats. *J Vet Pharmacol Ther*, 24:439-442.
- Tyrpenou AE, Xylouri-Frangiadaki EM (2006) Determination of Levamisole in Sheep Muscle Tissue by High-Performance Liquid Chromatography and Photo Diode Array Detection. *Chromatographia* 63:321-326.