

## Analiza reziduurilor de albendazol și a metaboliților acestuia din țesuturi animale prin LC-MS/MS

### LC-MS/MS Analysis of albendazole and its metabolites in animal tissues

Ana Csuma, Ana Cișmileanu

S.N. Institutul Pasteur S.A.

#### Rezumat

Tratarea animalelor cu produse medicamentoase de uz veterinar ridică problema reziduurilor care pot să persiste în unele țesuturi comestibile provenite de la animalele respective.

Pentru stabilirea timpului de așteptare necesar depleției reziduurilor la concentrații suficient de scăzute pentru a nu afecta sănătatea omului, testele biologice efectuate pe animale implică utilizarea de metode de analiză suficient de sensibile și de încredere pentru determinarea reziduurilor.

Obiectivul acestei lucrări a fost stabilirea și validarea unei metode sensibile și sigure pentru determinarea simultană a albendazolului și metaboliților acestuia, albendazol sulfoxidul, albendazol sulfona și amino-albendazol sulfona din țesuturi animale prin LC-MS/MS.

Metoda implică hidroliza cu HCl 6N pentru eliberarea metaboliților legați de proteine, în particular a amino-albendazol sulfonei, în special din ficat, urmată de extracția cu acetat de etil și purificarea extractului pe cartuș SPE C18. Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană XTerra MS C18 (10 cm x 2,1 mm x 3,5 μm), folosind ca fază mobilă metanol-acid formic 0,1 % cu gradient de eluție.

Detectția s-a făcut prin spectrometrie de masă în mod ESI<sup>+</sup>. S-au obținut limite de cuantificare mai mici de 4 μg/kg pentru fiecare component.

Coeficienții de corelare (R<sup>2</sup>) ai curbelor de calibrare (de la 0,01 μg/ml până la 0,5 μg/ml) au fost mai mari de 0,9935. Coeficienții de variație ai repetabilității pe țesuturi (mușchi și ficat) contaminate natural provenite de la animale tratate s-au situat între 5,75% și 11,6%.

Recuperările obținute pentru mușchi fortificat cu 10 μg/kg-100 μg/kg au fost între 70,2% și 88% cu coeficienți de variabilitate între 5,4% și 12,2%. Pentru ficat fortificat în domeniul 100 μg/kg-1000μg/kg s-au obținut recuperări între 70,3% și 83,2% cu coeficienți de variabilitate între 5,7% și 11%.

**Cuvinte cheie:** albendazol, -sulfoxid, -sulfonă, 2- amino-albendazol sulfonă, LC-MS/MS, reziduuri.

#### Abstract

Treating the animals with veterinary medicines raise the issue of residues that can persist in their edible tissues. In order to establish the withdrawal time necessary for depletion of the residues to sufficiently low concentration not to affect human health, biological tests performed on animals implicitly involve the use of sensitive and reliable analytical methods for residues determination.

The aim of this work was to establish and validate a sensitive and reliable method for simultaneous determination of albendazole and its metabolites, albendazole sulfoxide, albendazole sulfone and 2-amino-albendazole sulfone in animal tissues by LC/MS/MS.

The method involves acid hydrolysis with 6N HCl in order to release most residues, in particular the bound metabolite 2-amino-albendazole sulfone especially from liver, followed by extraction with ethyl acetate and solid phase clean-up of the extract on a C18 SPE cartridge.

The liquid chromatographic separation was achieved on a XTerra MS C18 column (10 cm x 2,1 mm, 3,5 μm), with gradient elution of 0,1 % formic acid – methanol. Detection was performed by mass spectrometry in ESI<sup>+</sup> mode. The limits of quantification were lower than 4 μg/ml for each component.

The correlation coefficients (R<sup>2</sup>) of the calibration curves (in the range from 0,01 μg/ml to 0,5 μg/ml) were higher than 0,9935. The relative standard deviations of repeatability on samples naturally contaminated from treated animals were between 5,75 % and 11,6 %.

Recoveries from fortified muscles in the range of 10 μg/kg to 100 μg/kg were between 70,2% and 88% with relative standard deviation of 5,4% - 12,2%. For liver fortified in the range of 100 μg/kg to 1000 μg/kg recoveries between 70,3% and 83,2% were obtained with relative standard deviation of 5,7 %-11 %.

**Key words:** albendazole, -sulfoxide, -sulfone, 2-amino-albendazole-sulfone, LC-MS/MS, residues.

#### Introducere

Helminții (cestode, nematode, trematode) reprezintă grupa cea mai importantă de paraziți care infestează rumegătoarele provocând pierderi economice importante.

Infestațiile la rumegătoare cu helminți sunt ținute sub control prin administrarea de

substanțe antiparazitare, care sunt esențiale pentru asigurarea stării de sănătate, a sporului de creștere în greutate și a performanțelor de reproducție.

#### Albendazolul

Este un antiparazitar cu spectru larg din clasa benzimidazolilor, fiind folosit ca antihelmintic în tratamentul infestațiilor

gastrointestinale și pulmonare cu nematode (adulti, larve, ouă) (*Cooperia spp.*, *Haemonchus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Dictyocaulus spp.*, *Bunostromum spp.*), trematode adulte (*Fasciola spp.*, *Dicrocoelium spp.*, *Paramphistomum spp.*) și unele cestode (*Moniezia spp.*).

Administrarea albendazolului se face pe cale orală prin boluri sau suspensie.

Din tractul gastrointestinal al rumegătoarelor albendazolul se absoarbe, în proporție de circa 50 %, fiind metabolizat rapid în ficat la metabolitul activ sulfoxid, apoi sulfonă inactivă și ulterior prin deacetilarea grupării carbamat la aminosulfonă (6).

Albendazolul, în principal sub formă de metaboliți, se regăsește în toate organele și țesuturile animalelor tratate.

Cantitățile cele mai mari și mai persistente de reziduuri se regăsesc în ficat urmat de rinichi, apoi în mușchi și grăsime.

Conform legislației în vigoare reziduul marker constă din suma dintre albendazol și metaboliții acestuia (8).

Monitorizarea reziduurilor din produsele animaliere destinate consumului uman necesită tehnici care să determine atât compusul părinte cât și metaboliții acestuia și să fie suficient de selective și sensibile pentru detectarea și determinarea acestora la nivelul limitelor maxime de reziduuri (LMR) stabilite de legislație (8).

Există o serie de metode de analiză publicate pentru determinarea albendazolului și a metaboliților lui ca reziduuri în țesuturi de origine animală.

Metodele de separare folosite au la bază cromatografia de lichide de înaltă performanță iar ca tehnici de detecție detecția UV și fluorescență (3, 4) ca și detecția prin spectrometrie de masă [1, 2, 5).

Utilizarea cromatografiei de lichide în tandem cu spectrometria de masă s-a dovedit o tehnică care satisface cerințele privind performanța metodelor analitice ce pot fi folosite la determinarea reziduurilor de medicamente veterinare din produse animaliere destinate consumului uman, adică specificitate, selectivitate, sensibilitate, fidelitate și robustețe (7).

### Scopul lucrării

A fost optimizarea și validarea unei metode eficiente, selective și sensibile pentru determinarea reziduurilor de albendazol și a metaboliților acestuia din țesuturi.

## MATERIAL ȘI METODĂ

### Țesuturi animale

S-au folosit țesuturi animale provenite de la bovine tratate cu produsul Helmizol 1200 (doza: 10mg albendazol / kg greutate corporală) în studiile de depleție ale reziduurilor pentru stabilirea timpului de așteptare pentru acest produs.

### Standarde și solvenți

Pentru determinări s-au folosit standardele:

- albendazol,
- albendazol sulfoxid,
- albendazol sulfonă și
- 2-amino-albendazol sulfonă,

procurate de la Witega GmbH, cu puritate certificată, acetat de etil, carbonat de potasiu, acid formic, acid clorhidric, bicarbonat de potasiu, hexan, metanol HPLC de la Merck.

S-au preparat **soluții etalon stoc** separate cu concentrația de 0,2 mg / ml în N,N-dimetilformamidă.

Aceste soluții au fost apoi folosite pentru prepararea unei soluții etalon mixte conținând 10 μg/ml din fiecare component, prin diluarea soluțiilor stoc cu metanol.

S-au preparat **5 soluții de calibrare** în domeniul (0,01 μg/ml - 0,50 μg/ml) prin diluarea soluției etalon mixte cu metanol.

### Extracție și purificare

La o cantitate cunoscută de țesut omogenizat (circa 2,5 g) s-a adăugat HCl 6N (5 ml) și s-a supus hidrolizei (110 °C timp de 1 h). Hidrolizatului s-a adus la pH 8 cu NaOH pelete și după răcire la temperatura camerei s-a extras cu acetat de etil (5 ml).

Extractul s-a evaporat la sec sub curent de azot (50 °C) și reziduul s-a reluat în amestec etanol:acid clorhidric 0,2 N (66:33) (1 ml) și n-hexan (5 ml), s-a agitat la agitator vortex (2 min) și s-a centrifugat (1500 rpm, 5 min, 4 °C).

Stratul superior de n-hexan s-a îndepărtat. Extractul apos s-a modificat prin adăugare de soluție de bicarbonat de potasiu 2 % (4 ml) și extractul de probă modificat (pH 7-8) s-a purificat pe cartuș C18 (Waters), condiționat în prealabil cu acetat de etil (3 ml), etanol (3 ml) și apă distilată (3 ml).

După transferul extractului de probă, cartușul s-a spălat cu apă distilată (2 x 1 ml) și s-a uscat prin trecerea aerului 5 min.

Albendazolul și metaboliții acestuia s-au luat cu acetat de etil (3 x 1 ml).

Eluatul s-a concentrat sub curent de azot (50 °C) și reziduul s-a reluat într-un volum cunoscut de metanol (1ml - 5ml), în funcție de concentrația predictibilă.

O cotă parte din extract (20 μl) s-a injectat în sistemul LC-MS/MS.

### Analiza LC

Analiza s-a efectuat cu un cromatograf de lichide de înaltă performanță Waters 2695 în tandem cu un detector MS-MS Quatro micro (Micromass).

Separarea cromatografică s-a făcut pe o coloană Xterra MS C18 (10 cm x 2,1 mm, 3,5 μm), menținută la 30 °C.

Faza mobilă a constat din:

- acid formic 0,1 % (solvent A)
- metanol (solvent B) cu gradient de eluție: 0-2 min 10 % B, 2-3 min de la 10 % B la 50 % B, 3-13 min 50 % B, 13-14

min de la 50 % B la 10 % B, 14-20 min 10% B, cu un debit de 0,2ml/min.

Volumul de injecție: 20 μl.

### Parametrii MS / MS

S-a aplicat MS în mod ESI pozitiv, cu următorii parametri:

- debit gaz de desolvare (azot): 350 l/h;
- temperatura de desolvare: 350 °C;
- temperatura sursei de ionizare: 120 °C;
- tensiunea la capilar 3,0 kV;
- tensiunea la extractor 2V.

Fragmentarea ionilor moleculari s-a făcut prin coliziune cu argon (3,0 x 10<sup>-3</sup> mbar).

Timpii de retenție și parametrii optimi pentru albendazol și metaboliții acestuia obținuți prin infuzie directă (debit 10 μl/min) de soluții etalon (concentrație 1 μg/ml) folosind o pompă tip seringă de 100 μl (Hamilton) sunt prezentați în Tabelul 1.

Tabelul 1

Ionii fragmentari și parametrii MS / MS pentru ABZ și metaboliții acestuia

Component	t <sub>r</sub> (min)	Ion precursor (m/z)	Ioni fragmentari (m/z)	Tensiunea la con (V)	Energia de coliziune, (eV)
2-NH <sub>2</sub> -Abz	1,80	240,1	132,9 ; 198,2	35	25
Abz-sulfoxid	9,41	282	240,2 ; 191,1	25	15
Abz-sulfonă	9,99	298	266,2 ; 223,1	35	20
Abz	12,60	266	234,2 ; 191,1	35	25

\* Ionul de cuantificare (cel mai abundent).

Controlul MS s-a făcut cu sistemul de date MassLynx, versiunea 4.1.

Evaluarea ariilor, analiza de regresie a curbei etalon și calculul concentrațiilor s-a făcut cu programul QuanLynx V4.1.

### REZULTATE ȘI DISCUȚII

Specificitatea a fost asigurată prin măsurarea a câte 2 ioni fragmentari rezultați din ionul precursor pentru fiecare substanță.

S-au identificat ca pozitive probele la care intensitățile relative ale ionilor fragmentari comparativ cu cei ai soluțiilor etalon de concentrații apropiate s-au încadrat în toleranțele maxime permise [3].

Selectivitatea s-a stabilit prin analiza de probe martor și probe fortificate cu substanțele respective (figura 1 a, b și c).

Pe cromatograma martor nu se observă interferențe cu picuri semnificative la aceiași timpi de retenție cu ai albendazolului și metaboliților acestuia.

S-a verificat linearitatea în domeniul 0,01 μg/ml până la 0,5 μg/ml (figura 2).

Coeficienții de corelare R<sup>2</sup> ai curbelor de calibrare au fost pentru:

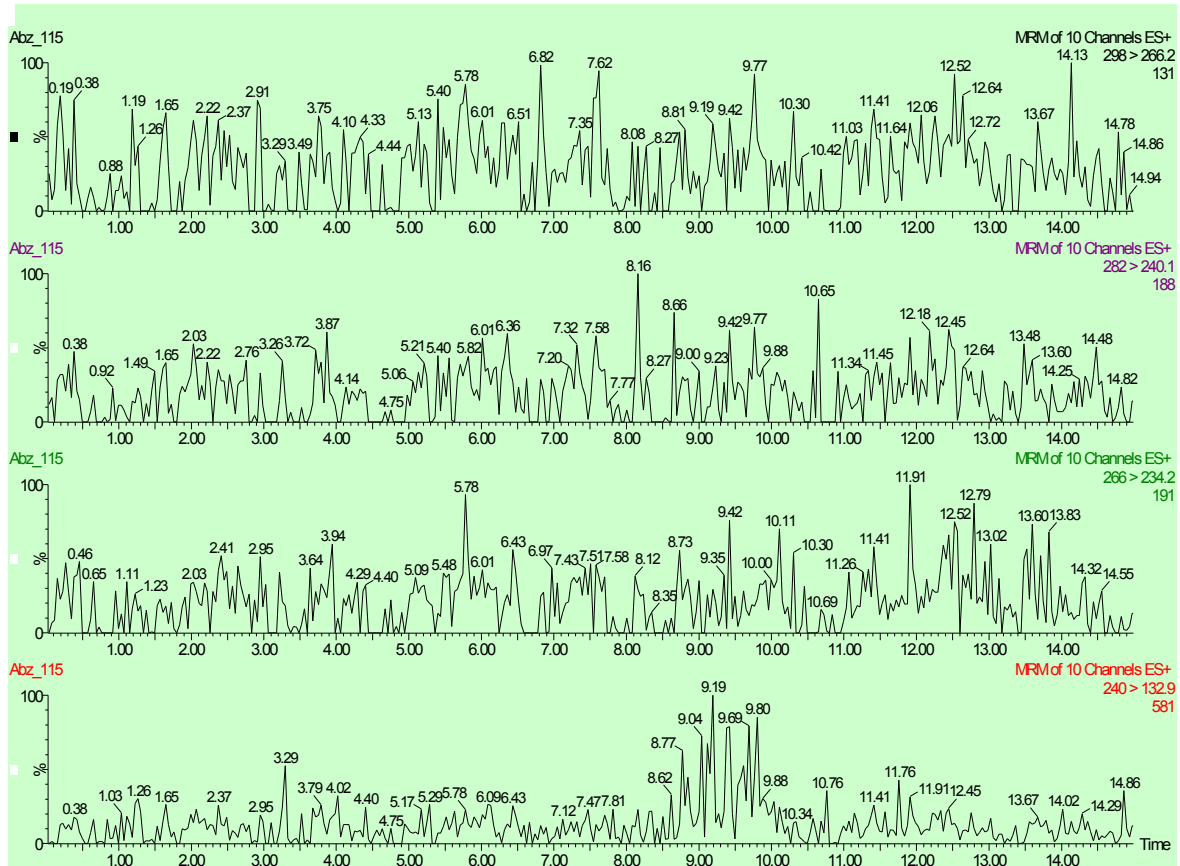
- 2-amino-albendazol sulfonă 0,9935,
- albendazol sulfoxid 0,9974,
- albendazol sulfonă 0,9948 și
- albendazol 0,9970.

Limita de detecție s-a calculat ca semnal / zgomot = 3 fiind estimată la 1,2 μg/kg și

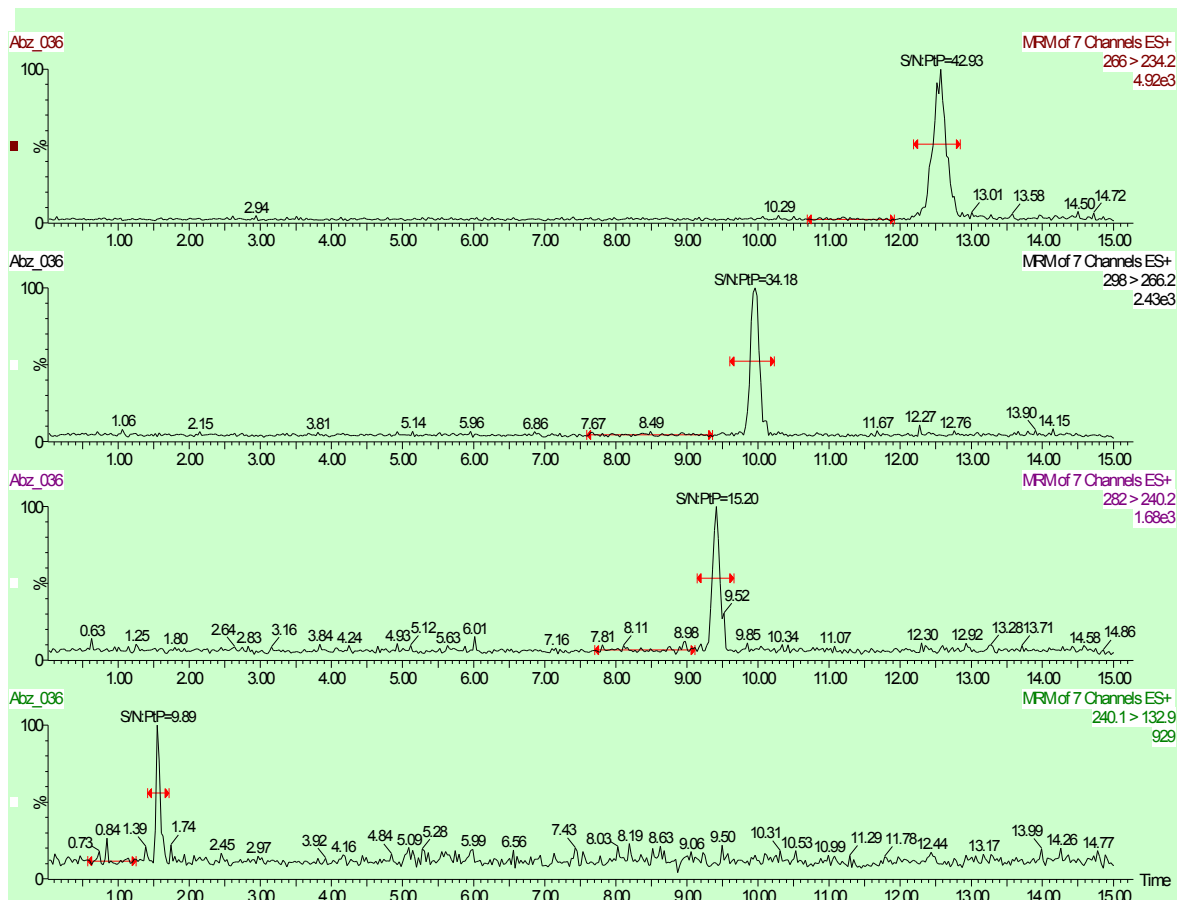
Limita de cuantificare ca semnal / zgomot = 10 fiind estimată la 4 μg/kg pentru fiecare analit individual (figura 1b).

La analiza a 6 probe paralele fortificate la limita de cuantificare, coeficientul de variație a fost mai mic de 20 %.

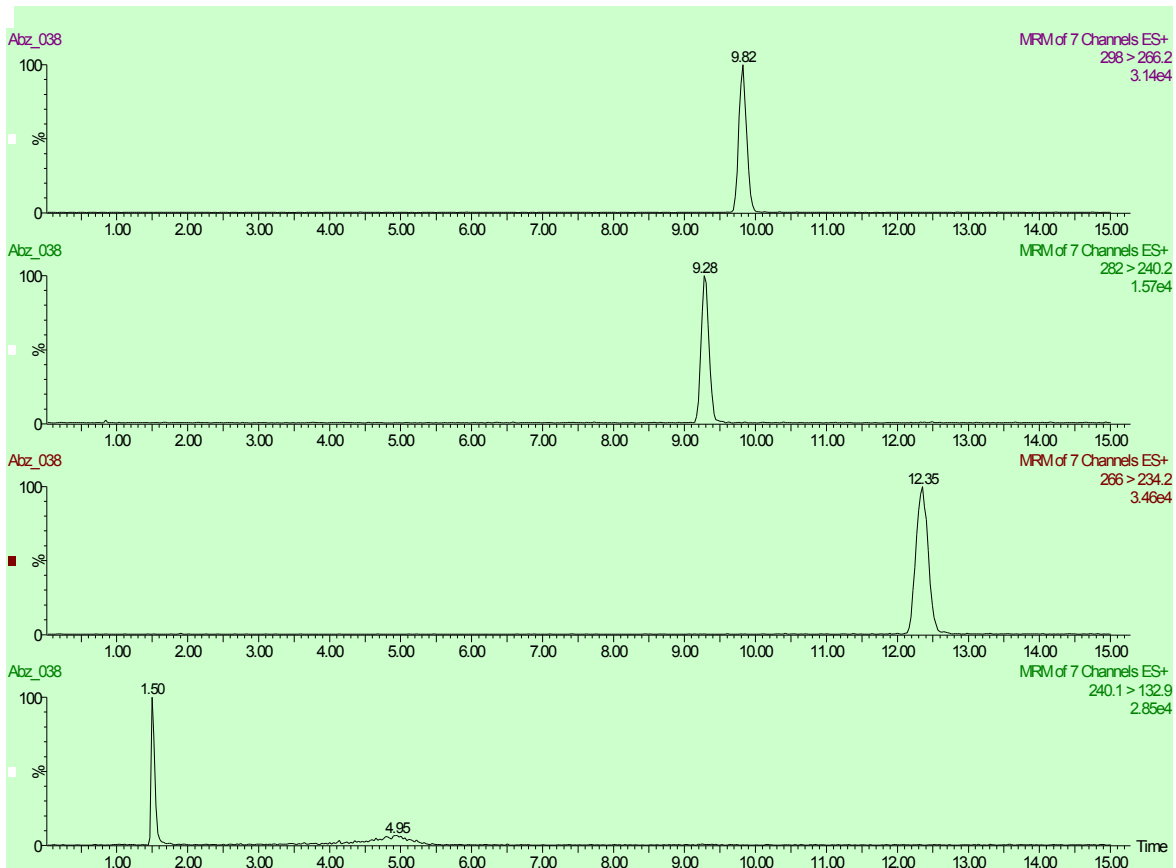
Fidelitatea metodei s-a verificat în termeni de repetabilitate pe probe contaminate natural provenite de la animale tratate (Tabelul 2) și recuperări din probe martor fortificate (Tabelul 3).



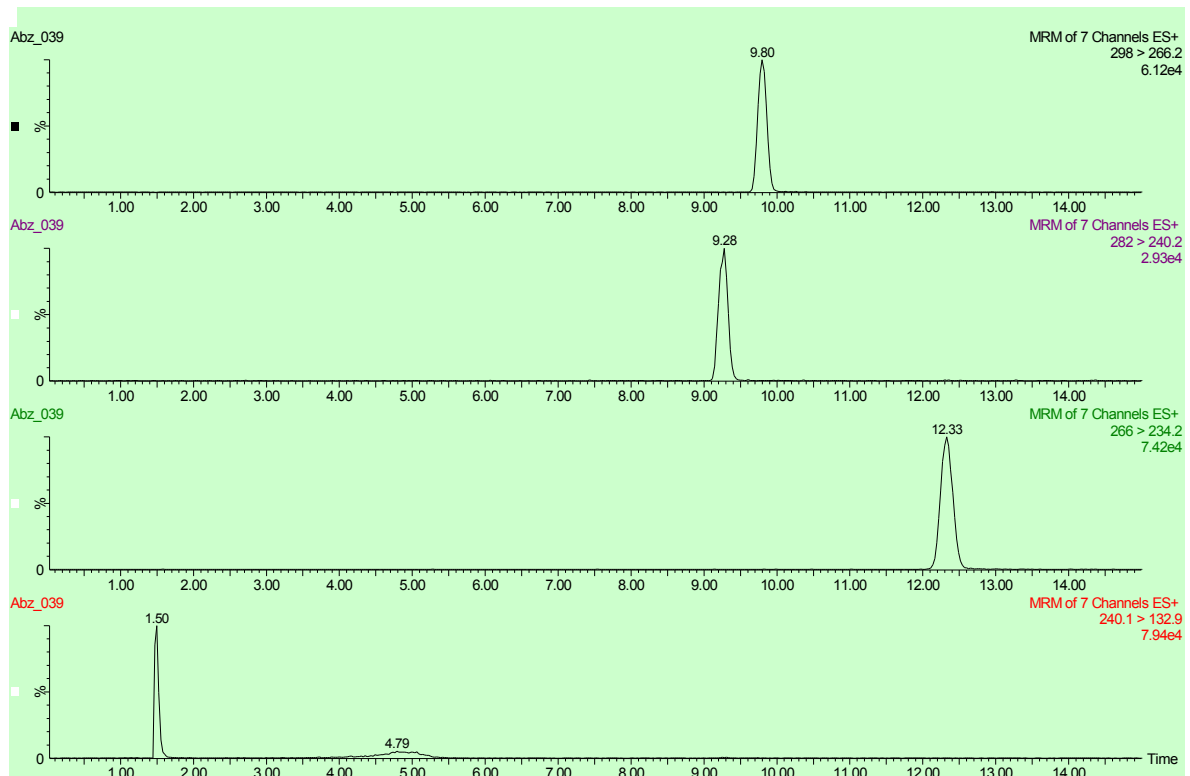
**a. proba martor de ficat**



**b. probă de ficat fortificat cu albendazol și metaboliții acestuia la nivel de 4 μg/kg fiecare.**



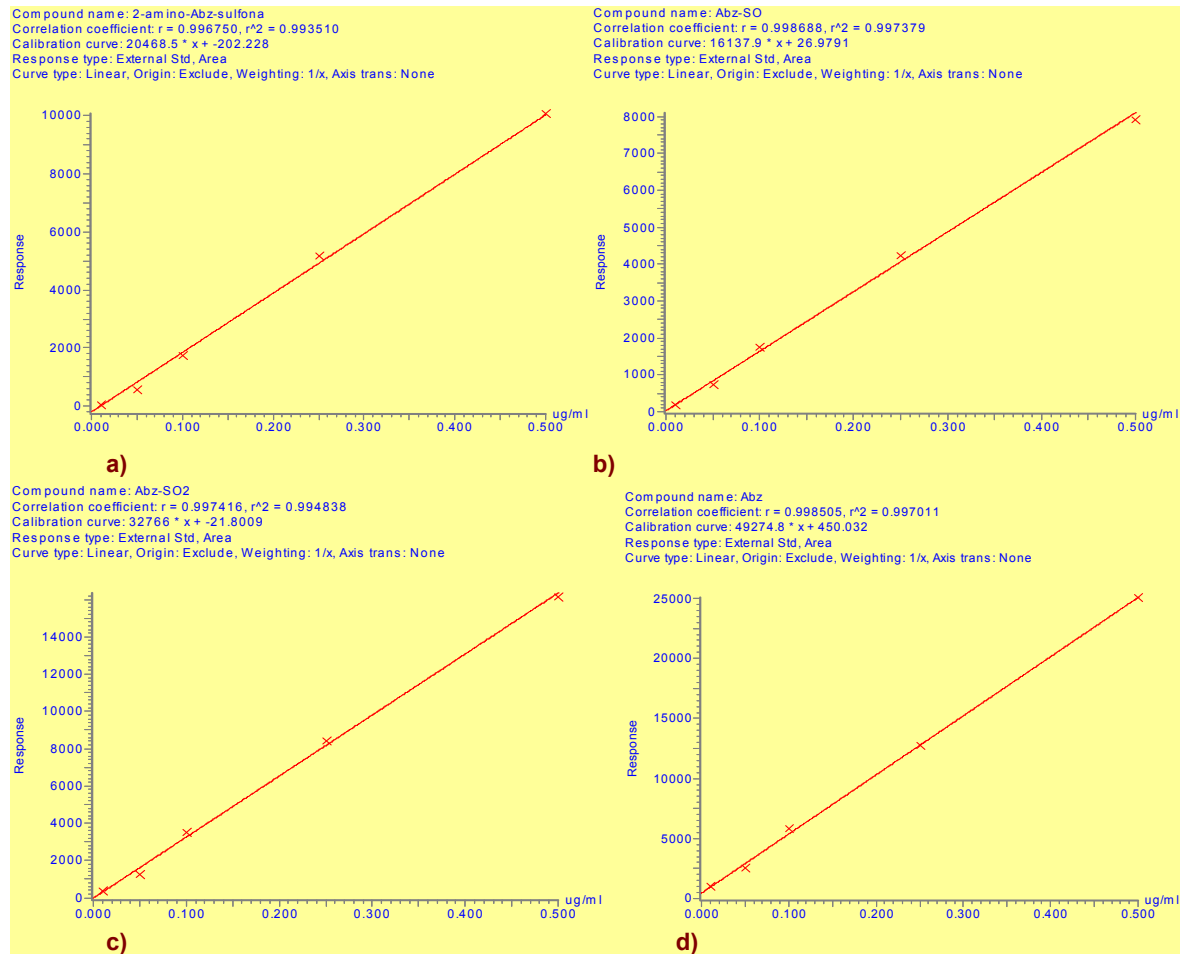
c. probă de ficat fortificat cu albendazol și metaboliții acestuia la nivel de 100 µg/kg fiecare.



d. soluție etalon de calibrare 0,25 µg/ml din fiecare component

Figure 1 – Cromatograme LC-MS/MS:

a) probă martor de ficat; b) probă de ficat fortificat cu albendazol și metaboliții acestuia la nivel de 4 µg/kg fiecare; c) probă de ficat fortificat cu albendazol și metaboliții acestuia la nivel de 100 µg/kg fiecare; d) soluție etalon 0,25 µg/ml. Identificarea peak-urilor: 2-amino-albendazol sulfona (1,80 min); albendazol sulfoxid (9,41 min); albendazol sulfonă (9,99 min), albendazol (12,6 min).



**Figura 2 - Curbe de calibrare în domeniul 0,01 µg/ml până la 0,5 µg/ml:**  
a) 2-amino-albendazol sulfonă; b) albendazol sulfoxid; c) albendazol sulfonă; d) albendazol

**Tabelul 2**

Repetabilitate pe probe de țesuturi contaminate natural obținute de la animale tratate (n =6)

Metabolitul	Mușchi		Ficat	
	$\bar{x} \pm s$ (n=6), µg/kg	CV, %	$\bar{x} \pm s$ (n=6), µg/kg	CV, %
<b>2-aminosulfonă</b>	63,0 ± 3,90	6,19	319,6 ± 21,60	6,75
<b>Sulfoxid</b>	25,8 ± 2,00	7,75	371,9 ± 31,40	5,75
<b>Sulfonă</b>	8,8 ± 0,84	9,77	127,0 ± 9,90	7,80
<b>Albendazol</b>	4,1 ± 0,48	11,60	37,3 ± 3,58	9,60

$\bar{x}$  - valoarea medie; s - abatere standard; CV -coeficient de variabilitate; n -număr de probe paralele

**Tabelul 3**

Recuperări din țesuturi fortificate cu albendazol și metabolizii acestuia

Țesut	Nivel de fortificare µg/kg	n	2-aminosulfonă		sulfoxid		sulfonă		albendazol	
			$\bar{R} \pm s$ µg/kg	CV %	$\bar{R} \pm s$ µg/kg	CV %	$\bar{R} \pm s$ µg/kg	CV %	$\bar{R} \pm s$ µg/kg	CV %
Mușchi	10	4	70,2 ± 8,1	11,6	75,8 ± 6,7	8,8	81,6 ± 7,3	8,9	85,0 ± 10,4	12,2
	25	6	73,1 ± 7,1	9,7	80,7 ± 5,5	6,8	80,3 ± 5,4	6,7	80,1 ± 7,1	8,9
	50	6	75,5 ± 4,9	6,5	82,6 ± 5,5	6,7	83,0 ± 4,8	5,8	83,7 ± 6,4	7,7
Ficat	100	4	79,5 ± 5,9	7,4	85,1 ± 5,6	6,6	85,5 ± 4,6	5,4	88,0 ± 5,6	6,4
	100	4	71,5 ± 4,8	6,7	76,3 ± 5,9	7,7	71,0 ± 7,8	11,0	73,6 ± 4,3	5,9
	250	6	74,0 ± 5,9	8,0	83,2 ± 4,8	5,8	81,2 ± 4,7	5,8	76,9 ± 4,4	5,7
	500	6	70,3 ± 4,8	6,9	74,2 ± 6,1	8,2	75,6 ± 6,6	8,8	80,5 ± 5,6	7,0
	1000	4	72,9 ± 6,8	9,3	78,6 ± 6,9	8,8	80,4 ± 8,0	9,9	81,2 ± 5,2	6,4

$\bar{R}$  - recuperare medie; s – abatere standard; CV – coeficient de variabilitate; n – număr de probe paralele



**Coeficienții de variație ai repetabilității** pe țesuturi (mușchi și ficat) contaminate natural provenite de la animale tratate s-au situat între: 5,75% și 11,6% în funcție de analit și de conținut.

**Recuperările din mușchi fortificat** (10 μg/kg - 100 μg/kg) au fost între 70,2% și 88% cu coeficienți de variabilitate între 5,4% și 12,2% și pentru ficat fortificat (100 μg/kg - 1000 μg/kg) între 70,3% și 83,2% cu coeficienți de variabilitate între 5,7% și 11% în funcție de analit.

## CONCLUZII

1. Metoda descrisă permite analiza simultană a reziduurilor de albendazol și a metaboliților acestuia, albendazol sulfoxid, albendazol sulfonă și amino-albendazol sulfonă.
2. Hidroliza cu acid a țesuturilor combinată cu extracția cu un solvent organic eliberează majoritatea reziduurilor în special metabolitul 2-aminosulfonă din reziduu legat prezent în ficat.
3. Probe folosite au fost contaminate natural și au provenit de la animale tratate și probe martor (negative) fortificate prin adăugare de soluții etalon pentru a obține concentrații de 10 μg/kg-100 μg/kg pentru mușchi și 100 μg/kg-1000 μg/kg pentru ficat.
4. Metoda este sensibilă (limita de detecție 1,2 μg/kg și limita de cuantificare 4 μg/kg) și prezintă înaltă fidelitate (coeficienții de variație ai repetabilității pe probe contaminate natural provenite de la animale tratate au fost mai mici de 15% și s-au obținut recuperări mai mari de 70% din probe de mușchi fortificate între 10 μg/kg și 100 μg/kg și din probe de ficat fortificate între 100 μg/kg și 1000 μg/kg).
5. Metoda poate fi folosită pentru determinarea cantitativă a reziduurilor de albendazol și metaboliților acestuia din probe de mușchi și ficat.

## BIBLIOGRAFIE

1. Balizs, G. (1999). Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Chromatography B*, 727, 176-177, 1999.
2. Bonato, P.S. Moraes de Oliveira, A.R. et al., (2007), Simultaneous determination of albendazole metabolites, praziquantel and its metabolite in plasma by high-performance liquid chromatography - electrospray mass

spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 558-563.

3. Dowling, G., Cantwell, H., O'Keefee, M. et al., (2005), Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver, *Analytica Chimica Acta* 529, 285-292.
4. Su, S.C., Chang, C.L. et al., (2003), Simultaneous determination of albendazole, thiabendazole, mebendazole and their metabolites in livestock by HPLC, *J. Of Food and Drug Analysis*, vol.II, no.4, 307-319.
5. De Ruyck, H., Daeseleire, Els et al., (2002), Determination and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk, *Journal of Chromatography A*, 976, 184-194.
6. **Comitetul de experți FAO/OMS (1989)**, Evaluarea unor reziduuri de medicamente veterinare în alimente. Raportul 34 al Comitetului de experți FAO/OMS pentru aditivi alimentari. Raport tehnic seria 788, OMS, Geneva, Elveția.
7. **Decizia Comisiei Europene 2002/657/EC** privind implementarea Directivei 96/23/EC referitoare la performanțele metodelor analitice și interpretarea rezultatelor.
8. **Regulamentul Comisiei (EU) Nr. 37/2010** referitor la substanțe farmacologic active și clasificarea acestora în raport cu limitele maxime de reziduuri în alimente de origine animală