

Evaluation of QuEChERS Sample Preparation for Determination of Benzimidazoles Residues in Meat by UPLC-MS/MS

O.V. Bayer[†], O.V. Bondarets[†], V.M. Mykhalska^{*,‡}, L.V. Shevchenko[‡], O.M. Stupak[†], J.V. Fesenko[†], Y.V. Dovgopoli[†], N.V. Liniichuk[†], V.L. Kovalenko[†], I.V. Galka[§], M. J. Kryvenok[‡], V.M. Poliakovskiy[‡]

[†] State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, 30, Donetska Str., Kiev, 02000, Ukraine;

[‡] National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15 Heroyiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine;

*e-mail: mykhalska.vm@gmail.com;

[§] Institute of Veterinary Medicine of the NAAS, 30 Donetska Str., Kiev, 03151, Ukraine

Received: April 24, 2020; Accepted: February 06, 2021

DOI: 10.17721/moca.2021.32-40

A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC–MS/MS) multi-residue method has been used for the simultaneous quantification and identification of 9 residues and metabolites of benzimidazole derivatives that the most widely used as anthelmintic veterinary drugs of animals. The modified QuEChERS method was used for sample preparation, which was initially developed for pesticide residue analysis. This paper highlights how quick, easy, cheap, effective and rugged the QuEChERS extraction method is. The method was successfully validated according to the 2002/657/EC guidelines. Recovery of analytes was in the range 99–110%. The decision limits (CC_{α}) were calculated at MRL level for analytes with an established permitted limit as next: 104.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (albendazole), 53.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (fenbendazole), 54.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (flubendazole), 12.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (levamisole), 53.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (cambendazole), 64.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (mebendazole), 52.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (parabendazole), 105.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (thiabendazole), 234.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (triclobendazole). The suitability of the assay has been assessed through InterVal Software by quo data GmbH (Germany). The method achieves high quality of the results, good recovery, repeatabilities, within-lab reproducibilities, and wide analytical scope and has practical benefits, low cost, high sample throughput, little labor used and few lab ware.

Keywords: anthelmintic, benzimidazoles, residual content, liquid chromatography, mass spectrometry, meat

Оцінка придатності методу при застосуванні QuEChERS підходу для визначення залишків бензimidазолів у м'ясі тварин за допомогою UPLC-MS/MS

О.В. Байєр[†], О.В. Бондарець[†], В.М. Михальська^{*,‡}, Л.В. Шевченко[‡], О.М. Ступак[†], Ю.В. Фесенко[†], Я.В. Довгопол[†], Н.В. Лінійчук[†], В.Л. Коваленко[†], І.В. Галка[§], М.Я. Кривенюк[‡], В.М. Поляковський[‡]

[†] Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, вул. Донецька 30, Київ, 02000, Україна;

[‡] Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна;

*e-mail: mykhalska.vm@gmail.com;

[§] Інститут ветеринарної медицини НААН, вул. Донецька, 30, Київ, 03151, Україна

Надійшла: 24 квітня 2020 р; Прийнята: 06 лютого 2021 р

DOI: 10.17721/moca.2021.32-40

В роботі здійснено оцінку придатності застосування QuEChERS підходу для визначення залишків бензimidазолів у м'ясі тварин за допомогою методу на дефективній рідинній хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (PX-MS/MS) та встановлено параметри MS/MS детектування і визначено його валідаційні характеристики для аналізу залишкового вмісту бензimidазолів в м'ясі продуктивних тварин. Доведено, що цей метод є точним, практичним та універсальним, що підтверджується даними межі прийняття рішення CC_{α} для альбендазолу – 104.5 мкг/кг, фенбендазолу – 53.2 мкг/кг, флубендазолу – 54.2 мкг/кг, левамизолу – 12.1 мкг/кг, камбендазолу – 53.9 мкг/кг, мебендазолу – 64.2 мкг/кг, парабендазолу – 52.5 мкг/кг, тіабендазолу – 105.8 мкг/кг, тріклабендазолу – 234.2 мкг/кг, ступінь вилучення складає 99–110 % для всіх аналітів. Одержані результати щодо оцінки придатності, точності і відтворюваності результатів задовольняють вимоги Європейських директив. Використання пробопідготовки QuEChERS дозволяє зменшити витрати реактивів, навантаження на персонал лабораторії та на додаткове обладнання. Завдяки використанню дейтерованих стандартних зразків та визначення метаболітів бензimidазолів у м'ясі продуктивних тварин значно зменшується ймовірність як хибно негативних, так і хибно позитивних результатів, що підтверджує точність та специфічність методу. Розроблена методика з використанням QuEChERS підходу та PX-MS/MS дозволяє виявляти залишкові кількості 9 бензimidазолів та їх метаболітів, які застосовуються у тваринництві для профілактики гельмінтозів.

Ключові слова: антигельмінтики, бензimidазолі, залишковий вміст, рідинна хроматографія, мас-спектрометрія, м'ясо

Для лікування і профілактики гельмінтозів тварин у ветеринарній практиці широко застосовують лікарські речовини, які належать до групи бензimidазолів. Відомо, що систематична профілактика і своєчасне лікування гельмінтозів значно знижують захворюваність тварин, запобігають розвитку ускладнень і зниженню резистентності організму, що є основою збереження здоров'я тварин та виробництва безпечних харчових продуктів.

Останнім часом асортимент антигельмінтиків на ринку України збільшився. В практиці ветеринарної медицини використовується велика кількість сполук, що мають різну хімічну структуру, мають здатність впливати на життєво важливі системи гельмінтів, які викликають захворювання людини і тварин, та характеризуються широким спектром дії, низькою токсичністю, мінімальною побічною дією у поєднанні з достатнім терапевтичним індексом [1, 2, 3].

Біологічні особливості окремих класів і груп гельмінтів, а також місця їх локалізації в організмі господаря обумовлюють різну чутливість цих паразитів до одних і тих же антигельмінтиків. У той же час, антигельмінтики в силу своєї хімічної природи і відмінностей у фармакодинаміці діють по-різному на одні й ті ж групи гельмінтів [4].

У сучасній ветеринарній практиці найбільш ефективними нематодцидами вважаються препарати групи бензimidазолів та макроциклічних лактонів, оскільки вони досить високоефективні та зручні в застосуванні [5]. Бензimidазоли широко використовуються не тільки в лікуванні й профілактиці паразитарних інвазій у ряду видів, а й в якості фунгіцидних агентів для сільськогосподарських культур під час зберігання і транспортування [6, 7]. Механізм дії бензimidазолів ґрунтується на двох процесах: перший – інгібування в мітохондріях гельмінтів ферменту фумаратредуктази, в результаті чого порушується засвоєння глюкози [8], а другий – інгібування синтезу білка тубуліна, в результаті чого порушується утворення мікротубулярного апарату клітин паразита, наприклад, апарату Гольджі, що призводить до його загибелі [9]. За спектром дії антигельмінтики поділяють на засоби: надширокого спектру дії (альбендазол), широкого спектру дії (мебендазол, празиквантел), засоби, які застосовують за кишкових гельмінтозів (у тому числі кишкових нематодозах – левамизол, пірантел, піперазину адипінат, дифезил; кишкових цестодозах – ніклозамід (фенасал), оксиклозамід, рафоксанід), а також за позакишкових гельмінтозів (дитразину цитрат, антимоніл-натрію тартрат, еметину гідрохлорид).

Використання антигельмінтиків для лікування та профілактики захворювань тварин зумовлює їх накопичення в організмі тварин, в харчових продуктах тваринного походження, а також

надходження у навколишнє середовище [10, 11]. Як будь-які токсичні речовини, антигельмінтики здатні негативно впливати також і на здоров'я людини, потрапляючи в організм з продуктами харчування тваринного походження, у тому числі з м'ясом. Тому в країнах Європейського Союзу існують регламентуючі акти на використання та контроль залишкового вмісту антигельмінтиків в м'ясі (м'язах) тварин. Згідно з Європейськими нормативними документами встановлені максимально допустимі рівні (МДР) у м'ясі продуктивних тварин для альбендазолу та його метаболітів – альбендазол сульфону, альбендазолу сульфоксиду та альбендазолу аміносульфону, тіабендазолу та його метаболіту 5-гідрокситіабендазолу, які складають 100 мкг/кг; для фенбендазолу та його метаболітів – фенбендазолу сульфону, фенбендазолу сульфоксиду, флюбендазолу та його метаболітів – гідроксифлюбендазолу, флюбендазолу аміну, камбендазолу, парабендазолу – 50 мкг/кг; для левамизолу – 10 мкг/кг; мебендазолу та його метаболітів – 5-гідроксимебендазолу, аміномебендазолу в суммі 60 мкг/кг; трікла-бендазолу та його метаболітів – триклабендазол сульфону, триклабендазол сульфоксиду кетотриклабендазолу – 225 мкг/кг [12].

Для визначення залишкового вмісту бензimidазолів у продуктах харчування та тканинах тварин запропоновано ряд методик з різним діапазоном чутливості [13-15]. Так, був розроблений чутливий метод одночасного визначення 10 залишків бензimidазолу та деяких його метаболітів у яйцях, молоці, курятині та свинині. Цей метод заснований на використанні мікроекстракцій полімерного моноліту з рідинною хроматографією та мас-спектрометрією з електро-спрей іонізацією (LC-ESI/MS) [16].

Також відомі дослідження з визначення 18 антигельмінтиків (включаючи бензimidазоли, макроциклічні лактони, саліциланіліди, заміщені феноли, тетрагідропіримідини та імідазотіазоли) у п'яти харчових матрицях тваринного походження із застосуванням рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (PX-MS/MS). Аналіти екстрагували з використанням ацетонітрилу/1% оцтової кислоти (молоко та яйця) та ацетонітрилу/1% оцтової кислоти з 0.5 мл дистильованої води (м'яси птиці, свиней та яловичина) та очищені з використанням насиченого розчину гексан/ацетонітрил. Такий метод високоефективний, дешевий, менш трудомісткий порівняно з іншими методами [17].

Залишки бензimidазолів у харчових продуктах тваринного походження також визначають використовуючи твердофазну екстракцію та високоефективну рідинну хроматографію з флуоресцентним детектором [18], але при цьому не вдається виявляти метаболіти бензimidазолів

у матрицях. Метод РХ-МС/МС є підтверджуючим для виявлення рівня бензимидазолів у тканинах тварин, має вищу чутливість та охоплює широкий спектр аналітів на рівні слідових кількостей. Деякі розроблені методи для рідинних хромато-маспектрометрів мають високу вартість, особливо на етапі підготовки проб з використанням твердофазних колонок для кращого очищення супернатанту [19]. Вищевказані методи з використання РХ-МС/МС є достатньо чутливі та точні, однак є більш трудозатратні.

При цьому в літературі достатньо детально описано методи визначення бензимидазольних антигельмінтних препаратів в молоці та меді [20], в м'язах та печінці свиней, великої рогатої худоби, овець та птиці [21]. Також QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – Швидко, Просто, Дешево, Ефективно, Надійно і Безпечно) пробопідготовку в поєднанні з РХ-МС/МС використовують для визначення залишків ксенобіотиків, таких як пестициди, гормони, токсини, антибіотики [22], а також меламіну та рактопаміну [23] у тваринних матрицях: м'ясо, молоко, яйця та мед [24]. Однак, в літературі наведена незначна кількість публікацій, присвячених валідації методики визначення залишків бензимидазолів у суміші з їх метаболітами у харчових продуктах тваринного походження з використанням QuEChERS підходу за допомогою недефективної РХ-МС/МС, що ускладнює порівняння і співставлення отриманих валідаційних характеристик.

Процедура QuEChERS є перспективною методологією для пробопідготовки залишків ветеринарних препаратів, у тому числі бензимидазолів у продуктах тваринного походження. Однак, для досягнення високих показників вилучення аналіту з м'яса тварин, етапи екстракції, очищення та концентрації повинні бути оптимізовані відповідно до цільових сполук та матриці.

Метою нашої роботи було модифікувати та валідувати метод РХ-МС/МС з використанням QuEChERS підходу для кількісного визначення залишків бензимидазолів у суміші з їх метаболітами у м'ясі тварин.

Матеріали і методи дослідження

Визначення залишкових кількостей бензимидазолів виконано на рідинному хроматографі ACQUITY UPLC H-Class з використанням потрійно-квадрупольного мас-спектрометра Waters XEVO TQ-S micro (США) з аналітичною колонкою обернено-фазовою ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 100 mm x 2.1 mm).

Для проведення пробопідготовки зразків використовували наступне обладнання: центрифуга з максимальним прискоренням 14000 gpm «Eppendorf 5810 R», концентратор проб в тоці азоту «Liebisch Labortechnik» з можливістю нагрівання

до 130°C, вортекс лабораторний «Stuart Vortex mixer SA8» з обертанням 2500 rpm, орбітальний шейкер для пробірок «Stuart Tube Rotator SB 3» з обертанням 40 rpm, диспергатор «IKA T 25 digital ULTRA-TURRAX», для об'ємів від 1 до 2000 мл з діапазоном частот обертання від 3000 до 25 000 об/хв. [14].

Для дослідження відбирали проби м'язів масою не менше 500 г за принципом: окрема тварина – окрема проба. Від туш великої рогатої худоби і свиней відбирали м'язи діафрагми, від тушок курей – «темні м'язи», тушки кролів і річкової риби відбирали цілими. Після відбору проби були заморожені і зберігались за температури -20°C [25].

Проби м'яса різних видів продуктивних тварин (велика рогата худоба, свині, кури, кролі та риба) були додатково перевірені методом високо-ефективної рідинної хроматографії мас-спектрометрії на відсутність залишків бензимидазолів.

Збагачення контрольних зразків проводили стандартними розчинами для встановлення СС₅₀ залежно від показника максимально допустимого рівня (МДР). Оцінку придатності методу проводили на рівнях 0, 0.5, 1.0 та 1.5 МДР.

В роботі використовували сертифіковані субстанції: альбендазолу, альбендазолу сульфону, альбендазолу сульфоксиду, альбендазолу аміноссульфону, тіабендазолу, 5-гідрокситіабендазолу, фенбендазолу, фенбендазолу сульфону, фенбендазолу сульфоксиду, флюбендазолу, гідрокси-флюбендазолу, флюбендазолу аміну, камбендазолу, парабендазолу, левамізолу, мебендазолу, 5-гідроксимебендазолу, аміномебендазолу, тріклабендазолу, триклабендазолу сульфону, триклабендазолу сульфоксиду та кетотриклабендазолу виробництва Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, США). Для підготовки зразків та проведення аналізу використовували реактиви компанії Sigma-Aldrich (Німеччина).

Основні стандартні розчини з концентрацією 1 мг/мл вказаних бензимидазолів та їх метаболітів готувались шляхом розчинення в 1 мл диметил-сульфоксиду та 9 мл ацетонітрилу. Робочі стандартні розчини кожного з бензимидазолів та їх метаболітів, а також комплексний стандартний розчин усіх бензимидазолів готували шляхом двостадійного розведення основних стандартних розчинів: в першій стадії – ацетонітрилом (до концентрації 10 мкг/мл), а в другій (до концентрації 1000 нг/мл) – 0.1 % мурашиною кислотою у воді.

Кількісне визначення масової концентрації бензимидазолів проводили методом зовнішнього стандарту за здійсненим попередньо калібруванням хроматографа за градувальними розчинами з використанням матриці. Ідентифікацію бензимидазолів проводили за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності. Всі розрахунки отримували з використанням програмного забезпечення InterVal

Software компанії quo data GmbH (Німеччина).

Пробопідготовка. Підготовку зразка проводили за наступною схемою: попередньо було відібрано і гомогенізовано м'ясо від різних видів тварин масою 100 г за допомогою диспергатора. Після цього відбирали 10 г гомогенату до якого вносили суміш стандартних розчинів, після струшування додавали 10 мл ацетонітрилу для екстрагування. Після гомогенізації дослідного зразка протягом 30 с за допомогою диспергатора в пробу вносили 1 г натрію хлориду та 4 г магнію сульфату з подальшим ручним струшуванням протягом 1 хв. Далі вміст центрифугували при радіальному прискоренні 4000 об/хв. протягом 10 хв. Після центрифугування відбирали супернатант в поліпропіленову пробірку, в яку попередньо було внесено 1.5 г магнію сульфату та 0.5 г октадецил-силікагелю (C18) та змішували на вортексі протягом 30 с. Потім центрифугували зразок при 4500 об/хв та 4 °C протягом 10 хв., після чого відбирали 15 мл надосадового шару в пробірку, в яку попередньо вносили 250 мкл диметилсульфоксиду, та змішували на вортексі 30 с. Випаровували шар ацетонітрилу під струменем азоту за температури 50 °C. Потім залишок диметилсульфоксиду, що залишився після випаровування, пропускали через шприцевий фільтр у віалку для інжектування.

Точність та висока чутливість методу забезпечується за рахунок визначення бензimidазолів в суміші з їх метаболітами та додаванням дейтерованих стандартних зразків: альбендазолу з його метаболітами – альбендазол сульфону, альбендазолу сульфоксиду та альбендазолу аміносульфону та альбендазолу d-3, тіабендазолу з його метаболітом 5-гідрокситіабендазолу, фенбендазолу з його метаболітами – фенбендазолу сульфону, фенбендазолу сульфоксиду та фенбендазолу

d-3, флюбендазолу та його метаболітів – гідроксифлюбендазолу, флюбендазолу аміну, камбендазолу, парабендазолу, левамізолу з левамізолом d-5, мебендазолу та його метаболітів – 5-гідроксимебендазолу, аміномебендазолу, тріклабендазолу та його метаболітів – триклабендазол сульфону, триклабендазол сульфоксиду кетотріклабендазолу та використання високо-чутливого обладнання тандемного мас-спектрометра.

Параметри хроматографування. Дослідження вмісту бензimidазолів у м'ясі тварин проводили на потрійно-квадрольному мас-спектрометрі Waters XEVO TQ-S micro (США). Напруга електро-розпилення встановлювалася на рівні 3.0 кВ для позитивного режиму. Температури десольвації та джерела були встановлені на рівні 450 та 150 °C відповідно. Газ висушування – азот з потоком 900 л/год, газ – аргон.

Хроматографування зразків проводили в градієнтному режимі, система 0.1% розчин мурашиної кислоти у воді (А) / ацетонітрил (В), швидкість потоку 0.6 мл/хв., який змінювався залежно від часу 0 – 0.5 хв – 100% А; 1 – 3 хв – 50% А; 3.1-10 хв – 10% А; 10.1 – 13 хв. – 100% А. Температура хроматографічної колонки була встановлена на рівні 40 °C. Режим введення зразка автоматичний, об'єм інжекції становив 10 мкл.

Результати досліджень та їх обговорення

У зв'язку з присутністю матричних ефектів при визначенні антигельмінтиків разом з стандартними зразками використовували внутрішні стандартні зразки альбендазолу (Albendazol d-3), фенбендазолу (Fenbendazol d-3), левамізолу (Levamisole d-5) (рис. 1, 2). Параметри хроматографічних досліджень антигельмінтиків наведені в таблиці 1.

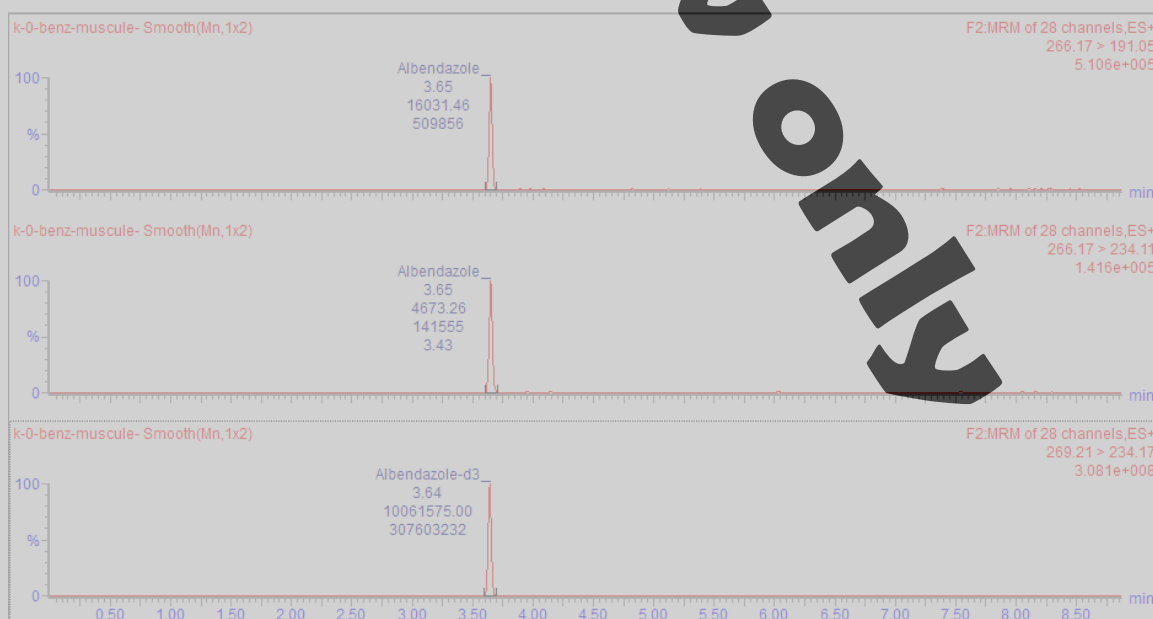


Рис. 1. Хроматограма альбендазолу та дейтерованого стандарту альбендазол d-3 (C = 100 мкг/кг).

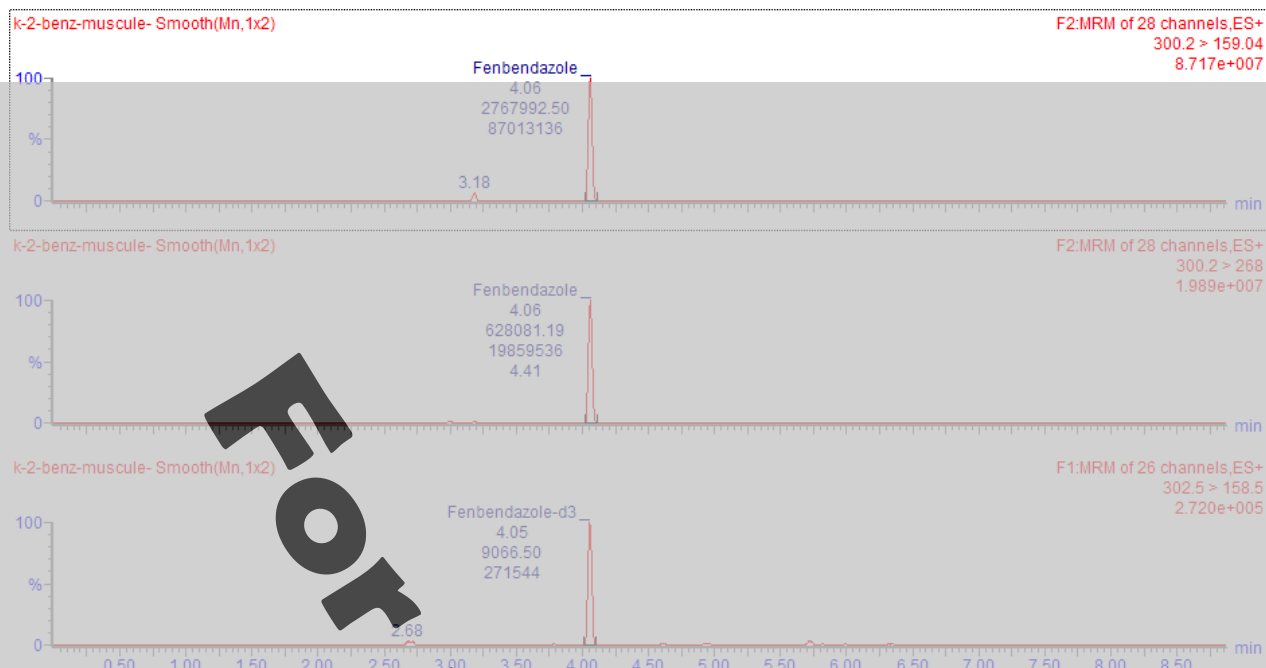


Рис. 2. Хроматограма фенбендазолу з дейтерованим стандартом фенбендазол d-3 (C = 50 мкг/кг).

Таблиця 1. Параметри сканування даних для досліджень антигельмінтиків.

Компонент	Материнський іон	Дочірні іони	Напруга на конусі	Енергія зіткнення
Левамізол	204.97	123.02; 177.99	35	26; 30
Альбендазол	266.17	191; 234.1	38	30; 15
Фенбендазол	300.2	159; 268	36	28; 23
Альбендазол сульфон	298.1	159.08; 266.2	36	30; 20
Альбендазол сульфоксид	282.2	159.06; 240.1	30	30; 15
Альбендазол аміносульфон	240.1	133.1; 198.1	36	27; 20
Фенбендазол сульфон	331.9	158.9; 300	35	36; 21
Фенбендазол сульфоксид	316.1	159.05; 191.09	35	30; 24
Флюбендазол	313.8	123; 282	40	35; 24
Гідроксифлюбендазол	316.2	125.1; 160	40	33; 35
Флюбендазоламін	256.06	123.05; 95.1	45	26; 34
Камбендазол	302.96	216.85; 260.95	35	26; 18
Мебендазол	296.14	105.05; 264.1	35	32; 18
5-гідроксимебендазол	298.25	160; 266.15	38	33; 22
Аміномебендазол	238.1	105.09; 133.05	50	24; 34
Парбендазол	247.6	172.6; 215.6	36	24; 15
Тіабендазол	201.9	130.85; 174.8	45	32; 24
5-гідрокситіабендазол	217.87	146.87; 190.85	45	32; 24
Триклабендазол	359.04	274.07; 343.97	45	36; 27
Триклабендазол сульфон	389	244.16; 309.9	55	28; 27
Триклабендазол сульфоксид	375	181; 212.86	35	40; 30
Кетотриклабендазол	326.3	117.6; 181.6	40	26; 12

Валідаційна характеристика методики. Підтверджуючий метод був валідований у відповідності до Рішення Єврокомісії 2002/657/ЕС [14]. Протягом процедури валідації встановлено такі параметри: специфічність, селективність, точність, лінійність, внутрішня лабораторна відтворюваність, витяг, межа прийняття рішення (CC_α) та здатність виявлення (CC_β).

CC_α – межа рішення, вище якої можна прийти до висновку з імовірністю помилки α , що зразок є невідповідним.

CC_β – це найменший вміст досліджуваної речовини, який можна виявити, ідентифікувати або визначити кількісно у пробі з імовірністю похибки β .

Відповідно до рішення Єврокомісії 2002/657/ЕС [14] поняття межа виявлення, межа кількісного визначення для залишків ветеринарних препаратів з групи дозволених речовин замінені на CC_α та CC_β , розрахунок яких проводиться від МДР:

$$CC_\alpha = C_{MRL} + 1.64 \times S_{r, MRL}$$

$$CC_\beta = CC_\alpha + 1.64 \times S_{r, CC_\alpha, MRL}$$

Лінійність визначалась для всіх компонентів в діапазоні від 5 до 500 мкг/кг, коефіцієнт варіації (R^2) становив не менше 0.98, що гарантує точність кількісного аналізу.

Всі ці параметри визначали при проведенні оцінки придатності методики для аналізу контрольних зразків м'яса (всього 160 зразків), які попередньо були додатково проаналізовані на відсутність у них цільового аналіту. Збагачення аналітом проводили на рівнях 0; 0.5; 1.0; 1.5 МДР (валідаційного рівня) для речовин, для яких встановлено МДР [14]. Речовини, для яких не встановлено МДР, валідувались на межу виявлення з рівновіддаленими відстанями. Дослідження проводилися 2 дні двома операторами в п'яти матрицях (м'язи великої рогатої худоби, свиней, кролів, риби та птиці).

Оцінку придатності запропонованої методики для аналізу зразків м'язів проводили методом "введено-знайдено". Точність методики оцінювали за допомогою середньостатистичного відхилення результатів, отриманих для кожної концентрації бензимидазолів. Витяг вираховували за концентрацією навантажених певною кількістю цільового аналіту та площі хроматографічного піку контрольних зразків. CC_α та CC_β розраховували за градуальною залежністю, побудованою при збагаченні різними концентраціями стандарту матриці згідно міжнародного стандарту ISO 11843 [18].

Згідно 2002/657/ЕС [14] при валідації аналітичних методів, результати вважаються прийнятні, якщо CV (коефіцієнт варіації) не перевищує меж вказаних у таблиці 2 на різних рівнях.

В результаті проведених досліджень були отримані валідаційні параметри для різних бензимидазолів (табл. 3, 4).

Розрахунок стандартні відхилення повторюваності та відтворюваності методики, а також ступінь вилучення при визначенні бензимидазолів на різних калібрувальних рівнях (табл. 4).

Таблиця 2. Відтворюваність (CV, %) для кількісного визначення бензимидазолів на різних концентраційних рівнях.

Масова частка	Відтворюваність CV (%)
< 1 мкг/кг	*
1-10 мкг/кг	32*
10-100 мкг/кг	23
100-1000 мкг/кг (1 мг/кг)	16

Примітка. (*) - для масових часток менших ніж 100 мкг/кг застосування рівняння Хорвіца дає неприпустимо високі значення.

Таблиця 3. Критичні концентрації CC_α та CC_β (мкг/кг) для бензимидазолів.

Бензимидазоли	Рівень інтересів	CC_α	CC_β
Альбендазол	100.0	104.5	111.66
Фенбендазол	50.0	53.2	58.07
Флюбендазол	50.0	54.2	60.99
Левамізол	10.0	12.1	15.00
Камбендазол	50.0	53.9	59.61
Мебендазол	60.0	64.2	71.04
Парабендазол	50.0	52.5	56.15
Тіабендазол	100.0	105.8	114.52
Тріклабендазол	225	234.2	248.71

Таблиця 4. Повторюваність, внутрішня лабораторна відтворюваність та ступінь вилучення (R) бензимидазолів.

Бензимидазоли	C, мкг/кг	s _p , мкг/кг	s _p , %	s _{wR} , мкг/кг	s _{wR} , %	R, %
Альбендазол	50.000	2.652	5.3	2.652	5.3	101.9
	100.000	2.673	2.7	2.673	2.7	101.1
	150.000	2.680	1.8	2.894	1.9	100.8
Фенбендазол	25.000	1.809	7.2	1.809	7.2	102.6
	50.000	1.831	3.7	1.855	3.7	101.4
	75.000	1.839	2.5	2.052	2.7	101.0
Флюбендазол	25.000	2.309	9.2	2.309	9.2	103.5
	50.000	2.377	4.8	2.394	4.8	100.5
	75.000	2.401	3.2	3.317	4.4	99.6
Левамізол	5.000	1.232	24.6	1.232	24.6	104.5
	10.000	1.218	12.2	1.268	12.7	105.7
	15.000	1.213	8.1	1.274	8.5	106.1
Камбендазол	25.000	1.791	7.2	2.902	11.6	103.3
	50.000	1.826	3.7	2.266	4.5	101.3
	75.000	1.839	2.5	2.264	3.0	100.6
Мебендазол	25.000	1.755	7.0	1.755	7.0	106.2
	50.000	1.821	3.6	2.068	4.1	101.6
	75.000	1.845	2.5	2.904	3.9	110.1
Парабендазол	25.000	1.278	5.1	1.278	5.1	103.6
	50.000	1.301	2.6	1.427	2.9	101.8
	75.000	1.309	1.7	1.421	1.9	101.2
Тіабендазол	50.000	3.308	6.6	3.308	6.6	104.3
	100.000	3.375	3.4	3.375	3.4	102.2
	150.000	3.399	2.3	3.399	2.3	101.5
Тріклабендазол	112.500	4.841	4.3	4.841	4.3	101.5
	225.000	4.904	2.2	5.345	2.4	100.2
	337.500	4.926	1.5	6.973	2.1	99.8

Примітка. s – стандартне відхилення; s_p – відносне стандартне відхилення, %; s_w – стандартне відхилення внутрішньо-лабораторної відтворюваності; s_{wR} – коефіцієнт варіації відтворюваності, %.

Як видно з даних таблиці 4, при аналізі зразків м'яса з концентрацією бензимидазолів від 25 до 150 мкг/кг ступінь вилучення становить від 99.6 до 110.1%, що відповідає вимогам нормативних документів 2002/657/ЕС, (в межах 80 – 110 %) [14]. Коефіцієнт варіації відтворюваності результатів аналізу вмісту бензимидазолів у м'ясі тварин також знаходився в межах прийнятних значень, які не повинні перевищувати 23 %, а на рівнях інтересів 50 та 100 мкг/кг цей показник був достатньо низьким, і навіть не перевищував 10%, за виключенням левамізолу, для якого на рівні 10 мкг/кг він склав 12.7%, що вказує на достатню прецизійність даного методу.

З отриманих даних можна зробити висновок, що всі результати, одержані при розрахунку відтворюваності та повторюваності при визначенні бензимидазолів, входять у допустимі межі згідно рішення ЄС 657/2002 на різних рівнях валідації [14]. При валідації методики визначення залишкового

вмісту бензимидазолів у м'ясі продуктивних тварин встановлено, що використання надефективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (PX-МС/МС) дозволяє одержувати дані високої точності.

Протягом 2016–2019 рр. було проаналізовано 645 зразків продукції тваринного походження (м'яса свиней, великої рогатої худоби, птиці та риби) на залишковий вміст бензимидазолів: альбендазолу, фенбендазолу та левамізолу. При цьому встановлено, що 57 проб м'яса свиней містили залишки альбендазолу у концентрації нижче 50 % МДР, 22 проби м'яса великої рогатої худоби містили залишки фенбендазолу на рівні 20 – 40 % МДР, у м'ясі риби частіше виявляли залишки фенбендазолу та левамізолу, але в кількостях, які не перевищували МДР. Таким чином, вище викладені результати досліджень показали необхідність розширення діапазону досліджень бензимидазолів.

Заключення

Проведено оцінювання придатності методу надефективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії, встановлено параметри МС/МС детектування і визначено його валідаційні характеристики для аналізу залишкового вмісту бензimidазолів у м'ясі продуктивних тварин. Розроблена методика є високоспецифічною, практичною, універсальною й відповідає вимогам Європейської директиви 2002/657/EC. Пробопідготовка QuEChERS була апробована при визначенні бензimidазолів без додаткової твердофазної екстракції, що зменшує час

пробопідготовки та витрати реактивів. Валідацію методики визначення залишків imідазолів у м'ясі тварин забезпечили дослідженням 160 зразків на 4 валідаційних рівнях двома операторами, протягом 2 днів. Запропонована методика проста у виконанні, не вимагає застосування додаткових способів очистки зразків, таких як фільтрування чи твердофазна екстракція, та базується на вилученні аналітів шляхом екстракції "рідина-рідина" та застосуванні знежирення зразків. Таким чином, ця методика є ефективною у моніторингу залишків антигельмінтиків у харчових продуктах тваринного походження.

Література

1. Arhipov, I.A. Antigel'mintiki: farmakologiya i primeneniye M.: Tipografiya Rossel'nozhakademii. **2009**, 406. ISBN 978-5-85941-305-8 (in Russ).
2. Ray, M.; Kaplan, D.V.M. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. **2020**, 36 (1), 17-30. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001>
3. Claerebout, E.; De Wilde, N.; Van Mael, E.; et al. Anthelmintic resistance and common worm control practices in sheep farms in Flanders, Belgium. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. **2020**, 20, April 100393 <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100393>
4. Bansal, Y.; Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**, 20 (21), 6208-6236 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013>
5. Kuzmin, A.A. Antigel'mintiki v veterinarnoy meditsine. M.: Akvarium LTD, **2004**. 144 s. (in Russ).
6. Danaher, M.; De Ruyck, H.; Crooks, S.R.; et al. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **2006**, 845 (1), 1-37. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.046>
7. Li, S.; Liang, Q.; Ahmed, S.A.H.; et al. Simultaneous Determination of Five Benzimidazoles in Agricultural Foods by Core-Shell Magnetic Covalent Organic Framework Nanoparticle-Based Solid-Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal. Methods*. **2020**, 13, 1111-1118. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01708-4>
8. Boezor, K.; Olba, W.; Olaszek, M. The influence of some anthelmintics on the bioenergetic metabolism of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33(15), 2323-2325.
9. Friedman, P.A.; Platzer, E.G. Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. *Biochem. et biophys. acta*. **1980**, 630 (2), 271-278.
10. Bayer, E.V.; Novozhitskaya, Y.N.; Shevchenko, L.V.; et al. Monitoring of residues of veterinary preparations in food products. *Ukrainian Journal of Ecology*. **2017**, 7 (3), 251-257. https://doi.org/10.15421/2017_76 (in Ukr)
11. Carmen, T.C. Avances en el análisis de benzimidazoles en muestras alimentarias, mediambientales y clínicas. *Tesis doctoral*. Granada: Universidad de Granada. **2018**, 308 p. <http://hdl.handle.net/10481/58797>
12. Codex Alimentarius. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL. 2e **2014**. Updated as at the 37th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2014).
13. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. OJ L **1996**, 125, 10-31.
14. Commission Decision 2002/657/EC, **2002**. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. J. Europ. Comm., No. L 221/8.
15. Cai, Y.; He, X.; Cui, P. L.; et al. Molecularly imprinted microspheres based multiplexed fluorescence method for simultaneous detection of benzimidazoles and pyrethroids in meat samples. *Food Chemistry*. **2020**, 319 (30), 126539 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126539>
16. Hu, X.Z.; Wang, J.X.; Feng, Y.Q. Determination of benzimidazole residues in edible animal food by polymer monolith microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric Food Chem*. **2010**, 58 (1), 112-9. <https://doi.org/10.1021/jf902888a>
17. Yoo, K.-H.; Park, D.-H.; El-Aty, A.M.A.; et al. Development of an analytical method for multi-residue quantification of 18 anthelmintics in various animal-based food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Anal.*, **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.008>

18. ISO 11843 Capability of detection. Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case, **2003**.

19. Bayer, O.V.; Kaminska, O.V.; Shevchenko, L.V.; et al. Development and evaluation of the suitability of the method for determining the content of egg coccidiostats using ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Methods Objects Chem. Anal.*, **2019**, 14 (1), 43-51. <https://doi.org/10.17721/moca.2019.43-51>

20. Zhang, Y.; Huang, X.; Yuan, D. Determination of benzimidazole anthelmintics in milk and honey by monolithic fiber-based solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407(2), 557–567. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8284-8>

21. Chen, D.; Tao, Y.; Zhang, H.; et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. *J. Chrom. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* **2011**, 879 (19), 1659–1667. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.04.004>

22. Fagerquist, C.K.; Lightfield, A.R.; Lehotay, S.J. Confirmatory and quantitative analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (5), 1473–1482. <https://doi.org/10.1021/ac040138q>

23. Garcia, C.V.; Gotah, A. Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin. *J Anal Methods Chem.* **2017**, article ID 2603067. <https://doi.org/10.1155/2017/2603067>

24. Kinsella, B.; Byrne, P.; Cantwell, H.; et al. Determination of the new anthelmintic monepantel and its sulfone metabolite in milk and muscle using a UHPLC-MS/MS and QuEChERS method. *J. Chrom. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2011**, 879 (31), 3707-3713 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.10.011>

25. Zahrebelnyi, V.O.; Novozhytska, Yu.M.; Hlushchenko, O.H.; Saienko, N.O. Metodychni vказivky shchodo orhanizatsii ta vykonannia Planu derzhavnoho monitorynhu zalyshkiv veterynarnykh preparativ ta inshykh zabrudniuvachiv u zhyvykh tvarynakh, neobroblenykh kharchovykh produktakh tvarynnoho pokhodzhennia. Kyiv, DNDILDVSE. **2015**, 45.