

Методика

УДК 619:616.995.1-085

doi: 10.31016/1998-8435-2021-15-4-43-50

Методика количественного определения фенбендазола и его метаболитов в органах и тканях животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Анастасия Ивановна Варламова¹, Владислав Евгеньевич Абрамов²,
Иван Алексеевич Архипов³

^{1,2,3} Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. П. Коваленко Российской академии наук», Москва, Россия

¹ arsphoeb@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8364-5055>

² 53.net@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4902-5666>

³ arkipovhelm@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5165-0706>

(Одобрена на научно-методической комиссии ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН 21 мая 2021 г., протокол № 2 и Ученом совете ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН 2 сентября 2021 г., протокол № 4)

Аннотация

Цель исследований: разработать методику количественного определения фенбендазола (ФБЗ) и его метаболитов в органах и тканях овец методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Материалы и методы. Валидацию методики определения ФБЗ и его метаболитов после введения супрамолекулярного комплекса фенбендазола выполняли в соответствии с международными руководствами по показателям: линейность, степень извлечения, специфичность, прецизионность, правильность (точность), пределы количественного и качественного определения.

Результаты и обсуждение. Адаптирован метод количественного анализа ФБЗ и его метаболитов сульфона и сульфоксида в организме овец после введения супрамолекулярного комплекса. Предложенная методика имеет линейную зависимость ($R > 0,99$) в диапазоне 5–1000 нг/г и показала хорошую воспроизводимость и правильность.

Ключевые слова: супрамолекулярный комплекс, фенбендазол, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, калибровка, степень извлечения

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Для цитирования: Варламова А. И., Абрамов В. Е., Архипов И. А. Методика количественного определения фенбендазола и его метаболитов в органах и тканях животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Российский паразитологический журнал. 2021. Т. 15. № 4. С. 43–50. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2021-15-4-43-50>

© Варламова А. И., Абрамов В. Е., Архипов И. А., 2021



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Methodology

Methodology for the quantitative determination of fenbendazole and its metabolites in organs and tissues of animals by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection

Anastasiya I. Varlamova¹, Vladislav E. Abramov², Ivan A. Arkhipov³

^{1,2,3}All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV”, Moscow, Russia

¹arsphoeb@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8364-5055>

²53.net@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4902-5666>

³arkhipovhelm@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5165-0706>

Abstract

The purpose of the research is to develop a methodology for the quantitative determination of fenbendazole (FBZ) and its metabolites in organs and tissues of sheep by high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS).

Materials and methods. The method for determining of FBZ and its metabolites after the administration of the supramolecular complex of fenbendazole was validated in accordance with international guidelines for the following indicators: linearity, recovery, specificity, precision, accuracy, limits of quantitative and qualitative determination.

Results and discussion. The method of quantitative analysis of FBZ and its metabolites sulfone and sulfoxide in the body of sheep after the administration of the supramolecular complex has been adapted. The proposed method has a linear relationship ($R > 0.99$) in the range of 5–1000 ng / g and has shown a good reproducibility and accuracy.

Keywords: supramolecular complex, fenbendazole, HPLC-MS/MS, validation, calibration, recovery

Financial Disclosure: none of the authors has financial interest in the submitted materials or methods.

There is no conflict of interests

For citation: Varlamova A. I., Abramov V. E., Arkhipov I. A. Methodology for the quantitative determination of fenbendazole and its metabolites in organs and tissues of animals by high performance liquid chromatography with mass-spectrometry detection. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2021; 15 (4): 43–50. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2021-15-4-43-50>

© Varlamova A. I., Abramov V. E., Arkhipov I. A., 2021

Введение

Фенбендазол (ФБЗ) относится к наиболее часто применяемым в ветеринарии антигельминтным препаратам, так как обладает широким спектром действия. Препарат безопасен для организма животных. Известно, что ФБЗ не растворим в воде и, поэтому часть его не абсорбируется в организме и транзитом выделяется с фекалиями. В связи с этим, при отдельных гельминтозах животных, особенно, собак терапевтическая доза ФБЗ значительно повышается.

Для повышения растворимости, биодоступности и эффективности препарата была применена механохимическая технология с использованием поливинилпирролидона для адресной доставки, что позволило значительно повысить антигельминтную активность и снизить в 2–3 раза терапевтическую дозу.

Для внедрения супрамолекулярного комплекса фенбендазола (СМКФ) в ветеринарную практику необходимы сведения по параметрам фармакокинетики и остаточным коли-

чествам ФБЗ и его метаболитов в организме животных.

Целью наших исследований стала разработка методики количественного определения ФБЗ и его метаболитов в органах и тканях овец методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Материалы и методы

Методику определения ФБЗ и его метаболитов после введения супрамолекулярного комплекса фенбендазола проводили методом ВЭЖХ-МС/МС в экстрактах образцов биоматриц овец на основании методов, описанных ранее [1, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 16–18, 20, 21], а также при следующих лабораторных условиях.

Оптимальные условия хроматографирования были достигнуты при следующих параметрах: градиентный режим подачи подвижной фазы (компонент элюента А – 5 мМ формиата аммония в воде; компонент элюента В – 5 мМ муравьиной кислоты в ацетонитриле), скорость подачи элюента – 0,3 мл/мин., хроматографическая колонка Kromasil Eternity XT 2,5-C18, 2,1 × 100 мм (Ø сорбента – 2,5 мкм); предколонка Kromasil Eternity 2,1 × 10 мм; объем вводимой пробы – 5 мкл; температура термостата колонки – 30 °С; температура термостата автосемплера – 4 °С; время удерживания ФБЗ ~ 5,9 мин.; время удерживания фенбендазол сульфена ~ 4,2 мин.; время удерживания фенбендазол сульфоксида ~ 3,4 мин.; длительность хроматографирования – 8 мин.

Детектирование аналитов и внутреннего стандарта осуществляли с помощью метода tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) в режиме записи сигналов выбранных ионных реакций (MRM). Метод ионизации: электроспрей в отрицательном режиме (ESI⁻); температура ионизации 350 °С; поток газа 10 л/мин.; давление небулайзера 40 psi; напряжение +/- 5000 В.

В опыте использовали сыворотку крови овец 7-8 мес. возраста, а также полученные после убоя пробы внутренних органов: печени, почек, сердечной мышцы, легких, селезенки, мышечной ткани и подкожного жира. Все пробы хранили в холодильнике при температуре – 20 °С до анализа.

Для приготовления основных стандартных растворов аналита взвешивали по 0,0001 г фен-

бендазола, фенбендазол сульфоксида и фенбендазол сульфена (с учетом чистоты стандартного образца) и растворяли в 10 мл ацетонитрила, получая раствор с концентрацией 1 мг/мл.

Промежуточные стандарты аналита готовили из основных методом смешения и разбавления до достижения концентрации всех соединений в общем растворе 100 мкг/мл в ацетонитриле. Концентрации промежуточных стандартных образцов составляли 0,5; 2,5; 10; 25, 50 и 100 мкг/мл для каждого из аналитов.

Стандартные образцы ФБЗ, фенбендазол сульфоксида и фенбендазол сульфена в органах и тканях готовили путем добавления к 1 г (990 мкл для сыворотки крови) гомогенизированного биоматериала, помещенного в полипропиленовую пробирку объемом 15 мл, 10 мкл соответствующего промежуточного раствора аналита (0,5; 2,5; 10; 25, 50 и 100 мкг/мл) до достижения концентраций 5, 25, 100, 250, 500 и 1000 нг/г. После этого стандартные образцы вортиксовали в течение 10 с и оставляли в покое на 30 мин. перед использованием при комнатной температуре. Стандартные образцы использовали свежеприготовленными.

Подготовку проб органов, тканей и сыворотки крови к анализу проводили следующим образом. Отбирали навеску 1,00 г (1,00 мл для сыворотки крови) гомогенизированного биоматериала в полипропиленовую пробирку объемом 15 мл. В каждую пробирку добавляли по 2,5 мкл раствора внутреннего стандарта концентрацией 50 мкг/мл. Смесь перемешивали на вортексе в течение 10 с и оставляли в покое на 5 мин. Затем добавляли 7 мл этилацетата, содержащего 1% (об/об) аммиака водного, вортиксовали и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 мин. при 550 об/мин., центрифугировали 5 мин. при 9000 об/мин. Экстракты отбирали в чистые полипропиленовые пробирки объемом 15 мл, добавляли 3 мл гексана (кроме образцов сыворотки крови), вортиксовали и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 мин. при 550 об/мин. Затем образцы центрифугировали 5 мин. при 9000 об/мин., отбрасывали гексановую фракцию, этилацетатную фракцию переливали в чистые полипропиленовые пробирки. Упаривали при 50 °С в токе азота. Сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы, проводя обработку образцов в УЗ-ванне при комнатной температуре, в тече-

ние 5 мин. центрифугировали при 12000 об/мин., фильтровали через шприцевые фильтры и переносили в вials объемом 1 мл для последующего хроматографирования.

Валидация методики количественного определения фенбендазола сульфоксида, фенбендазола сульфона и ФБЗ была выполнена в соответствии с руководствами [2, 4, 6, 9, 10, 13-15] по показателям: линейность, степень извлечения, специфичность, прецизионность, правильность (точность), пределы количественного и качественного определения.

Для проведения качественного и количественного анализа экстрактов применяли процедуру калибровки хроматографических данных. При получении калибровочных графиков для фенбендазола сульфоксида, фенбендазола сульфона и фенбендазола использовались линейная интерполяция со свободным коэффициентом. Для построения калибровочных зависимостей отношений величин MRM-сигналов аналитов от концентраций в биоматрицах был выбран диапазон от 5 до 1000 нг/г (нг/мл для сыворотки крови). Экстракты калибровочных стандартных образцов инжесировались в хромато-масс-спектрометрическую систему поочередно (от меньшей к большей концентрации) по 3 инъекции на уровень. Так как матричный эффект экстрактов сыворотки крови и экстрактов мышечной ткани оказался одинаковым, для дальнейшего расчета концентраций в опытных образцах сыворотки крови использовали калибровочную зависимость для мышечной ткани.

Коэффициенты интерполяции найденных линейных зависимостей используют в дальнейшем при определении содержания аналитов в опытных образцах органов и тканей овец, а также контрольных образцах биоматриц.

Для оценки потерь аналитов в процессе пробоподготовки и оценки влияния матрицы экстракта на отклики, были изучены степени извлечения аналитов на низком (5 нг/г), среднем (250 нг/г) и высоком (1000 нг/г) уровнях концентраций.

Для корректной оценки степени извлечения аналита требуется учет матричного эффекта [13, 14]. Поэтому, для наиболее точного учета процессов массопереноса и влияния компонентов матрицы на отклик детектора,

зависимость отклика изучали на основе стандартных образцов растворов, приготовленных из экстрактов холостых проб органов и тканей.

Степень извлечения (E, %) рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{S_{Std}^{extr}}{S_{IS}^{extr}} / \frac{S_{Std}^{poes}}{S_{IS}^{poes}} \cdot 100\%,$$

где S_{Std}^{extr} – площадь пика фенбендазола, фенбендазола сульфоксида, фенбендазола сульфона в экстракте калибровочного образца биоматрицы; S_{IS}^{extr} – площадь пика внутреннего стандарта в экстракте калибровочного образца биоматрицы; S_{Std}^{poes} – площадь пика фенбендазола, фенбендазола сульфоксида, фенбендазола сульфона в холостом экстракте биоматрицы с добавлением СО аналитов и внутреннего стандарта после процедуры пробоподготовки (среднее значение площади пика соответствующей концентрации); S_{IS}^{poes} – площадь пика внутреннего стандарта в холостом экстракте биоматрицы с добавлением СО аналитов и внутреннего стандарта после процедуры пробоподготовки (среднее значение площади пика соответствующей концентрации).

Специфичность методики подтверждали на основании хроматограмм экстрактов холостых проб тканей и сыворотки крови овец (без добавления аналита), полученных по методике пробоподготовки, описанной ранее.

Для определения качественных пределов детектирования (LOD) и пределов количественного определения (LOQ) фенбендазола и его метаболитов в органах и тканях и сыворотке крови использовали пробы чистых биоматриц.

На полученных хроматограммах «холостых» проб выделяли пики, соответствующие временам удерживания фенбендазола и его метаболитов в тех же условиях. Определение LOD и LOQ осуществляли по формулам:

$$LOD = 3 \cdot \frac{SD}{k} \cdot pn$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{SD}{k},$$

где SD – стандартное отклонение площадей пиков шума базовой линии, соответствующих

временам удерживания фенбендазола и его метаболитов; k – коэффициент угла наклона калибровочной кривой.

Показатели правильности, прецизионности и стабильности калибровочной зависимости методики оценивали в соответствии с [1–13] по содержанию аналитов в контрольных образцах биоматриц овец. Для эксперимента были использованы несколько стандартных образцов биоматриц (контрольных стандартных образцов, QC) аналита на низком (5 нг/г, LQC), среднем (250 нг/г, MQC) и высоком (1000 нг/г, HQC) уровнях концентраций. На протяжении исследования (в разные дни) были проведены измерения концентраций аналитов в 3 сериях контрольных образцов (по 3 инъекции каждого QC).

Результаты обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы SAS/Stat № 9.4 SAS System for Windows, а также Microsoft Excel PKSolver 2.0.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что основные фрагменты фенбендазола имеют m/z , равные 268 и 159 Da и их использовали в дальнейшем для определения его количества по методу MRM (m/z 268 Da) и качественного подтверждения принадлежности пика (m/z 159 Da). Для фенбендазола сульфоксида для количественного определения был использован фрагмент с m/z 268 Da, а для количественного подтверждения был использован фрагмент с m/z 191 Da. Для фенбендазола сульфона для количественного определения был использован фрагмент с m/z 300 Da, а для качественного подтверждения был использован фрагмент с m/z 159 Da. Для количественного подтверждения внутреннего стандарта был использован фрагмент с m/z 264,1 Da.

Коэффициенты корреляции свидетельствовали о высокой степени линейности откликов хромато-масс-спектрометрической системы в данном диапазоне концентраций.

Значения средних степеней извлечения фенбендазола из биоматриц составили 85,7% для мышечной ткани, 82,7% для печени, 88,5% для почек и 78,0% для кожи с подкожной жировой клетчаткой; для фенбендазола сульфоксида 99,9% для мышечной ткани, 103,5% для печени, 89,5% для почек и 96,5% для кожи с подкожной жировой клетчаткой; для фенбендазола сульфона 81,8% для мышечной ткани,

103,9% для печени, 85,8% для почек и 102,6% для кожи с подкожной жировой клетчаткой.

Подтверждение специфичности методики было выполнено на основании хроматограмм экстрактов холостых проб тканей и сыворотки крови овец (без добавления аналита). Было установлено, что остаточные пики шума сигналов в области времен удерживания анализируемых соединений не влияют на результаты количественного определения в диапазоне калибровки (5–1000 нг/г). Методика позволяет достоверно отделять отклики аналита от матричных за счет использования высокоселективного масс-спектрометрического детектирования, хроматографического разделения и подтверждения принадлежности пиков с помощью ионного отношения.

Расчитанные значения пределов количественного и качественного (LOQ и LOD, соответственно) для калибровочных кривых фенбендазола составляли 4,5 и 1,5 нг/г, соответственно для мышечной ткани и сыворотки крови; 4,2 и 1,4 нг/г для печени; 4,8 и 1,6 нг/г для почек и 4,4 и 1,3 нг/г для подкожного жира. Подтвержденные значения LOQ и LOD для калибровочных кривых сульфоксида фенбендазола составляли 3,5 и 1,2 нг/г, соответственно для мышечной ткани и сыворотки крови; 4,0 и 1,3 нг/г для печени; 4,1 и 1,3 нг/г для почек и 4,5 и 1,5 нг/г соответственно для подкожного жира. Подтвержденные значения LOQ и LOD для калибровочных кривых сульфона составили 3,7 и 1,2 нг/г, соответственно для мышечной ткани и сыворотки крови; 4,3 и 1,4 нг/г для печени; 4,2 и 1,4 нг/г для почек и 4,8 и 1,6 нг/г соответственно для подкожного жира.

Заключение

Предложенная методика определения ФБЗ и его метаболитов в биоматрицах овец имеет линейную зависимость ($R > 0,99$) в диапазоне 5–1000 нг/г и показала хорошую воспроизводимость и правильность.

Метод позволяет идентифицировать ФБЗ и его метаболиты в модельных пробах и образцах биологических матриц овец.

Список источников

1. Chen D., Tao Y., Zhang H., Pan Y., Liu Z., Huang L., Wang Y., Peng D., Wang X. U., Dai M., Yuan Z. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination

- of benzimidazole residues in edible tissues. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879 (19): 1659-1667.
2. *Chiap P., Boulanger B., Dewe W., Crommem J., Hubert P.* An Analysis of the SFSTP guide on Validation of Chromatographic bioanalytical Methods: Progress and Limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 32: 753-765.
 3. *Danaher M., De Ruyck H., Crooks S. R. H., Dowling G., O'Keefe M.* Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B. Annal Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 845 (1): 1-37.
 4. EMEA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
 5. *Enouri S. S., Guerin M. T., Wilson I. G., Dowling P. M., Johnson R. J.* Tissue residue depletion of fenbendazole after oral administration in turkeys. *Can. Veterinary J.* 2019; 60 (3): 282-286.
 6. *Ermer J. J., Miller H. McB.* Method Validation in Pharmaceutical Analysis. John Wiley & Sons, 2006; 418.
 7. *Garcia-Gomez D., Garcia-Hernandez M., Rodriguez-Gonzalo E., Carabias Martinez R.* A fast and reliable method for the quantitative determination of benzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404: 2909-2914.
 8. *Gili M., Prearo M., Stella P., Ostorero F., Abete M. C.* Multiresidue screening method for detection of benzimidazoles and their metabolites in liver and muscle by high-performance liquid chromatography method development and validation according to Commission decision 2002/657/EC. *Ital. J. Food Saf.* 2014; 3: 1-5.
 9. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. A commitment to quality and continuous improvement. Laboratory and Scientific Section United Nations Office On Drugs And Crime. Vienna, 2009.
 10. *Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., McDowall R. D.* Validation on bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 17: 193-218.
 11. *Kochetkov P. P., Varlamova A. I., Abramov V. E., Misyura N. S., Abramova E. V., Abramov S. V., Koshevarov N. I., Arkhipov I. A.* Determination of fenbendazole and its metabolites in cow milk by liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Russian J. of Parasitol.* 2016; 38 (4): 554-562.
 12. *Majewsky M., Castel D., Le Dret L., Johann P., Jones D. T., Pfister C. M., Haefeli W. E.* Systematic identification of suspected anthelmintic benzimidazole metabolites using LC-MC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 151: 151-158.
 13. *Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez C. M.* Strategies for the Assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2003; 75: 3019-3030.
 14. *Sargent M. (Ed.)*, Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee. 2013; 68.
 15. *Schechtman L. M.* Internationally harmonized processes for test method evaluation, validation and regulatory acceptance: The role of OECD guidance document 34. *Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments.* 2008; 14, Special Issue: 475-782.
 16. *Silva G. R., Lima J., Souza L. F., Santos F. A., Lana M. A., Assis D. C., Cancado S. V.* Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. *Talanta*, 2017; 171: 307-320.
 17. *Sun W., Nguyen K. D., Fitch W. L., Banister S. D., Tang H., Zhang X., Yu L., Engleman E. G., Rajadas J.* In vitro and vivo model metabolite identification of a novel benzimidazole compound ZLN005 by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectromet.* 2018; 32 (6): 480-488.
 18. *Whelan M., Kinsella B., Furey A., Moloney M., Cantwell H., Lehotay S. J., Danaher M.* Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A.* 2010; 1217: 4612-4622.
 19. *Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S.* PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine.* 2010; 99 (3): 306-314.
 20. *Zheng F., Xiao H. M., Zhu Q. F., Yu Q. W., Feng Y. Q.* Profiling of benzimidazoles and related metabolites in pig serum based on SiO₂@NiO solid-phase extraction combined precursor ion scan with high resolution orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 2019; 284: 279-286.

21. Zhu X., Wang S., Liu Q., Xu Q., Zhang C., Xu S. S., Wang X., Li D., Hu H. Simultaneous determination of benzimidazoles and their metabolites in plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies in rabbits. *J. AOAC. Int.* 2011; 94: 839-846.

Статья поступила в редакцию 02.09.2021; принята к публикации 14.09.2021

Об авторах:

Варламова Анастасия Ивановна, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, кандидат ветеринарных наук, **ORCID ID:** 0000-0001-8364-5055, **arsphoeb@mail.ru**

Абрамов Владислав Евгеньевич, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, доктор ветеринарных наук, профессор, **ORCID ID:** 0000-0003-4902-5666, **53.net@mail.ru**

Архипов Иван Алексеевич, ВНИИП – фил. ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28), Москва, Россия, доктор ветеринарных наук, профессор, **ORCID ID:** 0000-0001-5165-0706, **arkhipovhelm@mail.ru**

Вклад соавторов:

Варламова А. И. – обзор и проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка статьи.

Абрамов В. Е. – развитие методологии, критический анализ материалов, программное и ресурсное обеспечение, статистический анализ, подготовка статьи.

Архипов И. А. – научное руководство, разработка методологии, критический анализ материалов и формирование выводов, подготовка статьи.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Reference

- Chen D., Tao Y., Zhang H., Pan Y., Liu Z., Huang L., Wang Y., Peng D., Wang X. U., Dai M., Yuan Z. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879 (19): 1659-1667.
- Chiap P., Boulanger B., Dewe W., Crommem J., Hubert P. An Analysis of the SFSTP guide on Validation of Chromatographic bioanalytical Methods: Progress and Limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 32: 753–765.
- Danaher M., De Ruyck H., Crooks S. R. H., Dowling G., O’Keeffe M. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B. Annal Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 845 (1): 1-37.
- EMA. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
- Enouri S. S., Guerin M. T., Wilson I. G., Dowling P. M., Johnson R. J. Tissue residue depletion of fenbendazole after oral administration in turkeys. *Can. Veterinary J.* 2019; 60 (3): 282-286.
- Ermer J., J. Miller H. McB. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. John Wiley & Sons, 2006; 418.
- Garcia-Gomez D., Garcia-Hernandez M., Rodriguez-Gonzalo E., Carabias Martinez R. A fast and reliable method for the quantitative determination of benzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404: 2909-2914.
- Gili M., Prearo M., Stella P., Ostorero F., Abete M. C. Multiresidue screening method for detection of benzimidazoles and their metabolites in liver and muscle by high-performance liquid chromatography method development and validation according to Commission decision 2002/657/EC. *Ital. J. Food Saf.* 2014; 3: 1-5.
- Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. A commitment to quality and continuous improvement. Laboratory and Scientific Section United Nations Office On Drugs And Crime. Vienna, 2009.
- Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., McDowall R. D. Validation on bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 17: 193–218.
- Kochetkov P. P., Varlamova A. I., Abramov V. E., Misyura N. S., Abramova E. V., Abramov S. V., Koshevarov N. I. Arkhipov I. A. Determination of fenbendazole and its metabolites in cow milk by liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Russian J. of Parasitol.* 2016; 38 (4): 554-562.

12. Majewsky M., Castel D., Le Dret L., Johann P., Jones D. T., Pfister C. M., Haefeli W. E. Systematic identification of suspected anthelmintic benzimidazole metabolites using LC-MC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 151: 151-158.
13. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez C. M. Strategies for the Assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2003; 75: 3019-3030.
14. Sargent M. (Ed.), Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee. 2013; 68.
15. Schechtman L. M. Internationally harmonized processes for test method evaluation, validation and regulatory acceptance: The role of OECD guidance document 34. Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments. 2008; 14, Special Issue: 475-782.
16. Silva G. R., Lima J., Souza L. F., Santos F. A., Lana M. A., Assis D. C., Cancado S. V. Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach. *Talanta*, 2017; 171: 307-320.
17. Sun W., Nguyen K. D., Fitch W. L., Banister S. D., Tang H., Zhang X., Yu L., Engleman E. G., Rajadas J. In vitro and vivo model metabolite identification of a novel benzimidazole compound ZLN005 by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectromet.* 2018; 32 (6): 480-488.
18. Whelan M., Kinsella B., Furey A., Moloney M., Cantwell H., Lehotay S. J., Danaher M. Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A.* 2010; 1217: 4612-4622.
19. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine.* 2010; 99 (3): 306-314.
20. Zheng F., Xiao H. M., Zhu Q. F., Yu Q. W., Feng Y. Q. Profiling of benzimidazoles and related metabolites in pig serum based on SiO₂@NiO solid-phase extraction combined precursor ion scan with high resolution orbitrap mass spectrometry. *Food Chem.* 2019; 284: 279-286.
21. Zhu X., Wang S., Liu Q., Xu Q., Zhang C., Xu S. S., Wang X., Li D., Hu H. Simultaneous determination of benzimidazoles and their metabolites in plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies in rabbits. *J. AOAC. Int.* 2011; 94: 839-846.

The article was submitted 02.09.2021; accepted for publication 14.09.2021

About the authors:

Varlamova Anastasia I., All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” (117218, Moscow, B. Cheremushkinskaya st., 28), Moscow, Russia, Candidate of Veterinary Sciences, **ORCID ID:** 0000-0001-8364-5055, **arsphoeb@mail.ru**

Abramov Vladislav E., All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” (117218, Moscow, B. Cheremushkinskaya st., 28), Moscow, Russia, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, **ORCID ID:** 0000-0003-4902-5666, **53.net@mail.ru**

Arkhipov Ivan A., All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV” (117218, Moscow, B. Cheremushkinskaya st., 28), Moscow, Russia, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, **ORCID ID:** 0000-0001-5165-0706, **arkhipovhelm@mail.ru**

Contribution of co-authors:

Varlamova Anastasia I. – review and research, analysis and interpretation of the data obtained, preparation of the article.

Abramov Vladislav E. – development of methodology, critical analysis of materials, software and resource support, statistical analysis, article preparation.

Arkhipov Ivan A. – scientific leadership, development of methodology, critical analysis of materials and formation of conclusions, preparation of an article.

All authors have read and approved the final manuscript.