

УДК 619:616.995.1-085

DOI:

Поступила в редакцию 15.03.2016

Принята в печать 28.11.2016

**Для цитирования:**

*Кочетков П. П., Варламова А. И., Абрамов В. Е., Мисюра Н. С., Абрамова Е. В., Абрамов С. В., Кошеваров Н. И., Архипов И. А. Определение фенбендазола и его метаболитов в молоке коров методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Российский паразитологический журнал. – 2016. – Т.38.- Вып.4. – С.*

**For citation:**

*Kochetkov P. P., Varlamova A. I., Abramov V. E., Misura N. S., Abramova E. V., Abramov S. V., Koshevarov N. I., Arkhipov I. A. Determination of fenbendazole and its metabolites in milk by the method of liquid chromatography coupled with tandem mass-spectrometry // Russian Journal of Parasitology, 2016, V.38, Iss.4, pp.*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНБЕНДАЗОЛА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В МОЛОКЕ  
КОРОВ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-  
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

**Кочетков П. П.<sup>1,2</sup>, Варламова А. И.<sup>1</sup>, Абрамов В. Е.<sup>1</sup>, Мисюра Н. С.<sup>2</sup>, Абрамова Е. В.<sup>1,2</sup>, Абрамов С. В.<sup>1,2</sup>, Кошеваров Н. И.<sup>2</sup>, Архипов И. А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К. И. Скрябина

117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: [varlamova@vniigis.ru](mailto:varlamova@vniigis.ru)

<sup>2</sup> «Международный научно-исследовательский центр охраны здоровья человека, животных и окружающей среды»

117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, стр. 11 А, e-mail: [cozos@mail.ru](mailto:cozos@mail.ru)

**Реферат**

Цель исследования – разработка методики определения фенбендазола и его метаболитов в молоке коров методом жидкостной хроматографии высокого давления с последующим масс-спектрометрическим детектированием.

Материалы и методы. Фенбендазол назначали 5 коровам в дозе 4,8 мг/кг перорально. Пробы молока отбирали через 1, 3, 5 и 10 сут после введения препарата. Методика работы включает описание реактивов, посуды и оборудования, масс-спектрометрические условия анализа фенбендазола и его производных, подготовку оборудования к работе, приготовление раствора элюента, подготовку хроматографа к анализу, определение хроматографических параметров стандартных образцов препарата, подготовку проб молока к анализу, определение параметров хроматографирования экстрактов, процедуру калибровки фенбендазола и метаболитов в элюенте.

Результаты и обсуждение. При изучении фармакокинетики фенбендазола и его метаболитов (сульфона и сульфоксида) в молоке коров установлено, что максимальные концентрации обнаружены через 24 ч после введения препарата и составили 22,6 нг/мл для фенбендазол сульфона, 34,0 нг/мл для фенбендазол сульфоксида и 19,7 нг/мл для фенбендазола. Спустя 10 сут после введения

препарата содержание фенбендазола и его метаболитов в молоке коров не превышало максимально допустимых значений.

*Ключевые слова:* молоко, фенбендазол, метаболиты, сульфоксид, сульфон, фармакокинетика, жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

### **Введение**

Вигисокс – комплексный антигельминтный препарат с содержанием 8 % фенбендазола, 72 % никлозамида и вспомогательных веществ. Фенбендазол, входящий в состав препарата, обладает выраженным нематодоцидным и в меньшей степени цестодоцидным и трематодоцидным действиями. Механизм действия его заключается в угнетении фумарат редуктазы, нарушении проницаемости клеточных мембран и нервно-мышечной иннервации, что приводит к гибели гельминта [14, 15]. Установлена высокая эффективность препарата при мониезиозе, диктиокаулезе, стронгилятозах пищеварительного тракта овец, коз и крупного рогатого скота в дозе 60 мг/кг, при трихоцефалезе – 80 мг/кг [1–3].

Для внедрения препарата в ветеринарную практику необходимы сведения по параметрам фармакокинетики и остаточным количествам его действующих веществ в органах и тканях животных, что и явилось целью наших исследований. В связи с тем, что после всасывания фенбендазол быстро метаболизируется в печени до сульфоксида (оксфендазола), обладающего антигельминтным действием, и в дальнейшем до сульфона, то их остаточные количества требуют детекции [8].

### **Материалы и методы**

Вигисокс вводили 5 коровам согласно инструкции однократно перорально в дозе 60 мг/кг живой массы, что соответствует 4,8 мг фенбендазола и 43,2 мг никлозамида на 1 кг живой массы. Молоко отбирали через 1, 3, 5 и 10 сут после введения препарата.

Коров в период опыта содержали в стандартных условиях хозяйства. Они не получали ранее каких-либо химиотерапевтических препаратов и были клинически здоровы.

Определение остаточных количеств фенбендазола и его метаболитов в молоке коров проводили на жидкостном хроматографе высокого давления с обращеннофазовой колонкой и масс-спектрометрическим детектором с тройным квадруполом. Обработку полученных данных осуществляли с помощью программы «MassHunter Workstation Software LC/MS Data Acquisition Triple Quadrupole Version B.06.00».

Для работы использовали следующие реактивы, посуду, оборудование: весы лабораторные ShinkoDenshi VIBRA HTR-220CE (класс точности специальный (1), предел взвешивания – 220 г, точность – 0,0001 г); жидкостной хроматограф высокого давления «Adilent 1290» с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6430 (QQQ), насосом «Agilent 1290», термостатом колонок «Agilent 1290» и автосемплером «Agilent 1290»; обращеннофазовая предколонка Phenomenex C 18 4,0 × 2,0 мм; хроматографическая обращеннофазовая колонка Zorbax SB-C18 (Ø сорбента 1,8 мкм), 50 × 2,1 мм; шейкер-перемешиватель Eppendorf Thermomixer compact AG 22331; центрифуга Eppendorf 5418; гомогенизатор SilentCrusher M («Heidolph»); центрифуга Eppendorf 5810R и бакет-ротатор A-4-81; вортекс Микроспин FV-2400 («BioSan»); полипропиленовые пробирки с крышками объемом 1,5, 15 и 50 мл («Greiner Bio»); посуда мерная лабораторная стеклянная, ГОСТ 1770; вода деионизированная (Milli-Q); ацетонитрил для ВЭЖХ, сорт 1, ТУ 6-09-5497 («Криохром»); аммиак, водный раствор, «хч» («Химмед»); азот марки ОСЧ, первый сорт, ГОСТ 9293-74; муравьиная кислота (НСООН) 98 %, 64-18-6 («Sigma Aldrich»); метанол для HPLC

(«Fluka»); этилацетат ГОСТ 22300-76 («Химмед»); стандартный образец фенбендазол («Sigma-Aldrich», 99,9 %), стандартный образец оксфендазол (фенбендазол сульфоксид) («Sigma-Aldrich», 98,8 %); стандартный образец фенбендазол сульфон («Sigma-Aldrich», 99,9 %).

Масс-спектрометрические условия анализа фенбендазола и его производных включали: метод ионизации – электроспрей в положительном режиме (ESI+); температура ионизации 350 °С; поток газа 10 л/мин; давление небулайзера 40 psi и напряжение +/- 5000 В.

Для количественного определения фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола методом масс-спектрометрии проводили исследование распада ионов под действием бомбардирующего потока молекул азота с последующим разрешением продуктов распада (методика MS/MS).

Для количественного определения по методу MRM и качественного подтверждения принадлежности пика были использованы ионные переходы, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

**Ионные переходы фенбендазола, фенбендазол сульфоксида и фенбендазол сульфона**

Вещество	MRM-переход	Параметры ионизации <sup>*</sup> /фрагментации <sup>**</sup>	Назначение
Фенбендазол (FEN)	300,1→268	FR=140, CE=20	Колич. определение
	300,1→190	FR=140, CE=30	Качественное подтверждение
	300,1→159	FR=140, CE=30	
Фенбендазола сульфоксид (FENSO)	316,0→284	FR=140, CE=15	Колич. определение
	316,0→191	FR=140, CE=15	Качественное подтверждение
	316,0→159	FR=140, CE=30	
Фенбендазола сульфон (FENSO <sub>2</sub> )	332,0→300	FR=100, CE=15	Колич. определение
	332,0→159	FR=100, CE=30	Качественное подтверждение

Примечание.<sup>\*</sup> Потенциал декластеризации (FR), В.

<sup>\*\*</sup> Напряжение ячейки соударения (CE), В.

Подготовка оборудования к работе включала приготовление раствора элюента и настройку хроматографа. Подвижная фаза раствора элюента состояла из 0,1%-ного раствора муравьиной кислоты в воде и 0,1%-ного раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле при соотношении компонентов 60 : 40 об/об.

Включение и настройку хроматографа проводили согласно прилагаемым инструкциям по эксплуатации. Хроматографическую колонку Zorbax SB-C18 предварительно промывали элюентом в течение 40 мин подачей элюента со скоростью 0,2 мл/мин.

Растворы стандартных образцов фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона, фенбендазола для построения калибровочного графика готовили следующим образом.

На аналитических весах взвешивали с точностью до четвертого десятичного знака по 0,0100 г стандарты фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола (с учетом чистоты стандартного образца). Навески растворяли в 10,0 мл элюента, получая при этом основные растворы с

концентрацией 1 мг/мл. Затем, методом последовательных растворов в подвижной фазе готовили образцы основных стандартных растворов с концентрациями аналитов 100, 10 и 0,5 мкг/мл.

Калибровочные стандартные образцы растворов в элюенте в концентрациях 5, 25, 50, 100, 500 и 2500 нг/мл готовили путём разбавления основных стандартных растворов (в соответствии с табл. 2).

Приготовление калибровочных образцов в молоке проводили по той же схеме (табл. 2), используя в качестве растворителя коровье молоко, не загрязнённое анализируемыми соединениями. Приготовленные стандартные образцы в молоке вортиксовали и выдерживали перед отбором пробы в течение 1,5 ч при комнатной температуре.

Таблица 2

**Приготовление калибровочных стандартных образцов**

Концентрация в пробе, нг/мл	V <sub>растворителя</sub> , мкл	V <sub>аликвоты</sub> , мкл	Основной стандартный раствор анализируемых соединений, мкг/мл
0 (холостая проба)	1000	0	–
5	990	10	0,5
25	950	50	
100	990	10	10
500	950	50	
2500	975	25	100

Примечание. V<sub>растворителя</sub> – объём добавляемого молока или элюента; V<sub>аликвоты</sub> – объём основного стандартного раствора анализируемых соединений.

Подготовку проб молока коров к анализу проводили по следующей схеме.

К стандартному образцу (или опытному образцу) молока объёмом 250 мкл добавляли 100 мкл ацетонитрила, затем 50 мкл насыщенного раствора аммиака. Смесь тщательно вортиксовали. Затем проводили трёхкратную экстракцию анализируемых соединений этилацетатом (3 × 1 мл). Этилацетатные экстракты объединяли и упаривали в токе азота. Сухой остаток растворяли в 250 мкл 80%-ного раствора ацетонитрила. Полученный экстракт переносили в хроматографические виалы, добавляя 2,5 мкл (1 % от отобранного объёма) муравьиной кислоты, вортиксовали смесь и переносили в хроматографические виалы объёмом 350 мкл для последующего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС.

Полученные стандартные образцы растворов фенбендазола, фенбендазолсульфоксида и фенбендазолсульфона в элюенте и молоке использовали для определения времени удерживания целевых компонентов и построения калибровочных графиков зависимости площади пика от концентрации анализируемых соединений. Для определения параметров хроматографирования экстрактов применяли процедуру калибровки хроматографических данных, которая имеет две цели: определение времени удерживания анализируемого компонента для его последующей идентификации (качественный анализ проб) и определение концентрации аналита при помощи калибровочного графика (метод внешнего стандарта). Наиболее оптимальные условия хроматографирования были достигнуты при следующих параметрах: изократическая подача элюента со скоростью 0,2 мл/мин; давление ~ 280 bar; объём вводимой пробы – 5 µл; температура термостата колонки – 30 °С; температура термостата автосемплера – 4 °С. Время удерживания определяемых соединений составило 1,0 мин для фенбендазол сульфоксида, 1,5 – для фенбендазол сульфона и 2,5 мин – для

фенбендазола. Длительность хроматографирования – 5 мин. Примеры полученных хроматограмм приведены на рисунке 1.

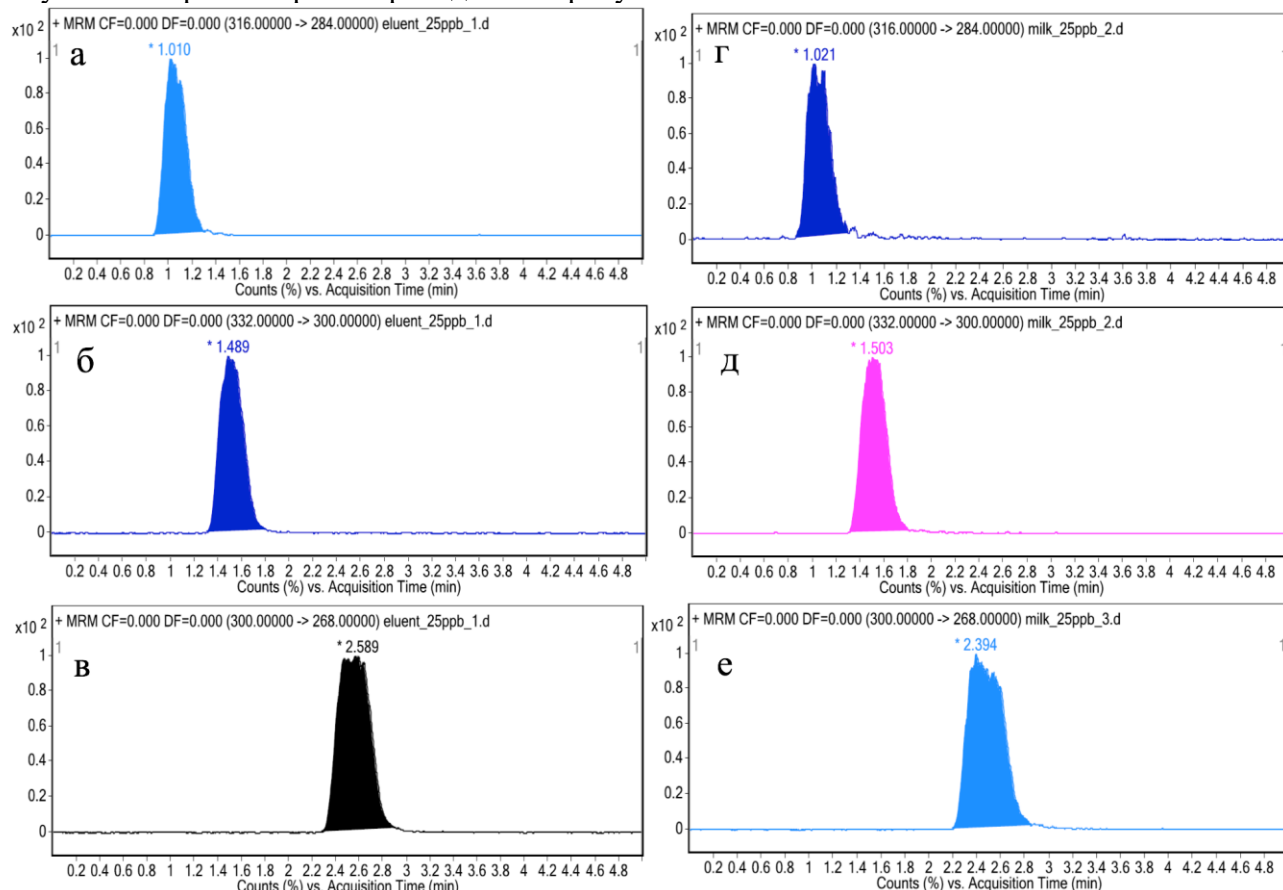


Рис. 1. Примеры хроматограмм стандартных растворов в элюенте (а, б, в) и хроматограмм экстрактов стандартного образца молока (г, д, е) с концентрацией аналитов 25 нг/мл (на рисунке показаны основные MRM-переходы фенбендазол сульфоксида (а, г), фенбендазол сульфона (б, д) и фенбендазола (в, е))

Были построены графики корреляции отношения площадей пиков фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола в экстрактах к их концентрациям в молоке коров, и рассчитана степень их извлечения ( $E$ , %) по формуле:

$$E = 100 \times S_{обр.} / S_{см.},$$

где  $S_{обр.}$  – площадь пика стандарта (фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона, фенбендазола) в экстракте;  $S_{см.}$  – площадь пика фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона, фенбендазола в стандартном образце раствора в элюенте. Средняя степень извлечения фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона, фенбендазола из молока составила соответственно 98,4; 91,8 и 91,4 %.

Полученные результаты калибровки фенбендазола, фенбендазола сульфоксида и фенбендазола сульфона методом внешнего стандарта (калибровочного графика) с весами  $1/x^2$  и свободным коэффициентом ( $y = ax + b$ ) [6] приведены в таблице 3. Стабильность калибровочных растворов в процессе исследования оценивали согласно методике [5].

Таблица 3

Результаты калибровки фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола в образцах молока коров

Вещество	Предел обнаружения, нг/мл	Предел количественного определения, нг/мл	Стандартная калибровочная кривая, нг/мл	Диапазон линейности, нг/мл
Фенбендазола сульфон	0,3	1,1	$y=326,4x-83,6$ $R^2 = 0,99$	5 – 2500
Фенбендазола сульфоксид	0,3	1,1	$y=93,7x+247,4$ $R^2 = 0,97$	5 – 2500
Фенбендазол	0,3	0,9	$y=629,3x-219,1$ $R^2 = 1,00$	5 – 2500

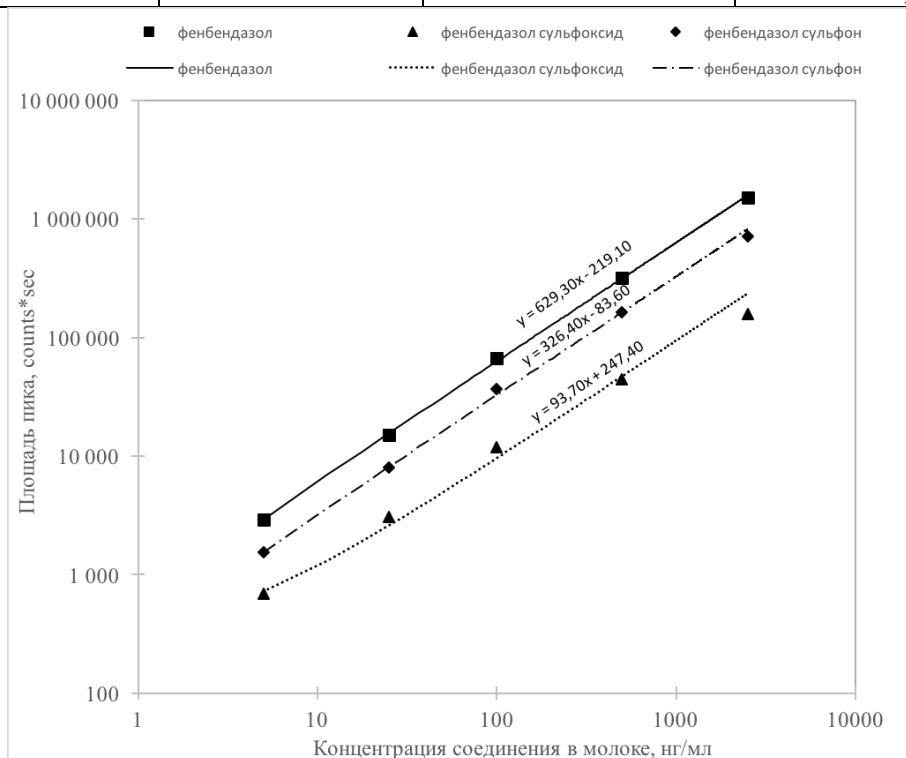


Рис. 2. Графики калибровочных зависимостей аналитических сигналов от концентрации фенбендазола, фенбендазол сульфоксида и фенбендазол сульфона

Для вычисления концентраций фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола в экстрактах применяли уравнение, полученное для линии тренда калибровочного графика по экстрактам:

$$C = (S_{обр} - a)/k,$$

где  $C$  – искомая концентрация соединения в соответствующем образце, нг/мл;  $S_{обр}$  – площадь пика исследуемого вещества в экстракте пробы;  $k$  и  $a$  – коэффициенты корреляции, использованные для вычисления остаточных количеств исследуемого вещества в образцах молока (приведены в табл. 3).

На основании полученных хроматограмм холостых проб молока (без добавления аналитов) были экспериментально установлены предел обнаружения (LOD) и предел измерения (LOQ). Определение LOD и LOQ осуществляли в соответствии с методикой [5, 9, 10, 13]. Пример «пустых» хроматограмм, использованных для вычисления LOD и LOQ, приведен на рисунке 3. На хроматограммах выделены «пики» шумов при времени удерживания, соответствующих временам удерживания фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона, фенбендазола.

LOD и LOQ рассчитывали по формулам:

$$\text{LOD} = 3 \times SD(S_{\text{сумма}}) \times k^{-1}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times SD(S_{\text{сумма}}) \times k^{-1},$$

где  $SD(S_{\text{сумма}})$  – стандартное отклонение отклика фенобендазол сульфоксида, фенобендазол сульфона и фенобендазола в холостых пробах тканей;  $k$  – калибровочный коэффициент (табл. 3).

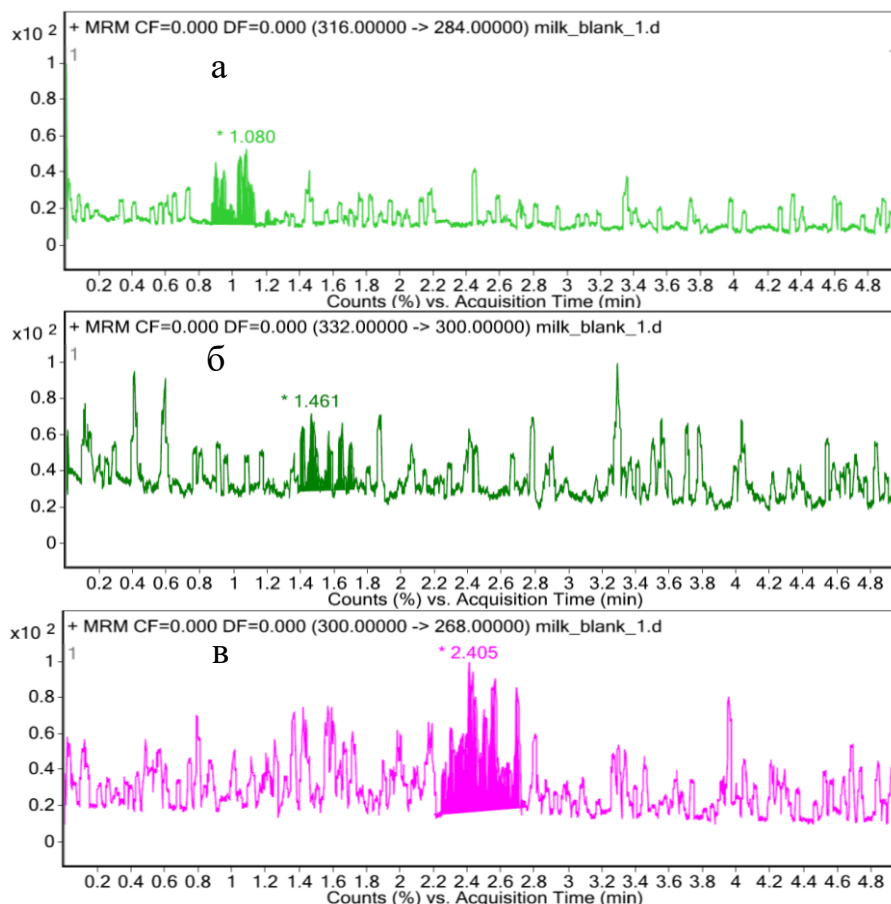


Рис. 3. Хроматограмма экстракта холостой пробы молока, использованной для вычисления LOD и LOQ фенобендазол сульфоксида (а), фенобендазол сульфона (б) и фенобендазола (в).

Результаты вычисления LOD и LOQ приведены в таблице 4.

Таблица 4

**Метрологические характеристики методики определения фенобендазол сульфоксида, фенобендазол сульфона, фенобендазола в образцах молока**

Соединение	Диапазон линейности, нг/мл	LOD, нг/мл	LOQ, нг/мл	Повторяемость RSD, %	Точность, Δ, %
Фенобендазола сульфон	5 – 2500	0,3	1,1	3	14
Фенобендазола сульфоксид		0,3	1,1	6	34
Фенобендазол		0,3	0,9	8	7

Метрологическую аттестацию методики проводили в соответствии с рекомендациями по валидации методов количественного химического анализа [4,

7, 11, 16] по содержанию фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола в образцах молока коров. Для эксперимента были использованы несколько растворов экстрактов из молока фенбендазол сульфоксида, фенбендазол сульфона и фенбендазола с концентрациями 5, 25, 100, 500 и 2500 нг/мл в молоке. Характеристики прецизионности и точности методики приведены в таблице 4.

### Результаты и обсуждение

Полученные результаты изучения содержания фенбендазола и его метаболитов в коровьем молоке приведены в таблице 5.

Таблица 5

#### Содержание фенбендазола и его метаболитов в молоке коров после введения вигисокса в терапевтической дозе

Время после введения, ч	Среднее кол-во метаболитов, нг/мл		
	фенбендазол	Фенбендазола сульфон	Фенбендазола сульфоксид
24	19,7±9,2	22,6±9,9	34,0±26,1
48	7,6±1,9	12,1±2,9	5,0±1,3
96	5,6±0,8	1,7±0,6	9,0
120	5,8±0,5	1,4±0,2	1,8
240	7,1±3,6	1,7±0,8	2,6±2,4

При изучении остаточных количеств фенбендазола и его метаболитов (сульфоксида и сульфона) в молоке коров было установлено, что максимальные концентрации обнаружены через 24 ч после введения препарата вигисокс: 22,6 нг/мл – для фенбендазол сульфона, 34,0 нг/мл – для фенбендазол сульфоксида и 19,7 нг/мл – для фенбендазола.

Спустя 10 сут после применения вигисокса содержание фенбендазола и его метаболитов не превышало максимально допустимых значений [8].

### Литература

1. Архипов И. А., Радионов А. В., Белова Е. Е., Садов К. М., Архипова А. И. Антигельминтная эффективность вигисокса при гельминтозах овец // Рос. паразитол. журнал. – 2010. – № 4. – С. 89–93.
2. Архипов И. А., Варламова А. В., Данилевская Н. В., Белова Е.Е., Садов К.И. Эффективность вигисокса при гельминтозах молодняка крупного рогатого скота // Рос. паразитол. журнал. – 2011. – № 4. – С. 126–129.
3. Архипов И. А., Варламова А. И., Данилевская Н. В. Методика по применению вигисокса при гельминтозах жвачных животных // Рос. паразитол. журнал. – 2013. – № 2. – С. 112–113.
4. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.
5. Эпштейн Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 48–56.
6. Carroll R. J., Ruppert D. Transformation and Weighting in Regression, Chapman and Hall, New York. – 1988.
7. Chiap P., Boulanger B., Dewe W. et al. An Analysis of the SFSTP guide on Validation of Chromatographic bioanalytical Methods: Progress and Limitations. J. Pharm. Biomed. Anal., 2003, Vol. 32, pp. 753–765.



8. Committee for medicinal products for veterinary use. Fenbendazole (extrapolation to all ruminants). EMEA/MRL/866/03-FINAL/June 2004.
9. Ermer J., Miller J. H. McB. Method Validation in Pharmaceutical Analysis / John Wiley & Sons, 2006, P. 418.
10. Хамиде Др., Сеньюва З., Гилберт Дж. Простое руководство для пользователей по разработке и валидации методов / Пер. под ред. А. Галкин. – М: «ООО Торнус 77», 2011. – 43 с.
11. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., McDowall R. D. Validation on bioanalytical chromatographic methods. J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, Vol. 17, pp. 193–218.
12. Marriner S. E., Bogan J. A. Pharmacokinetics of fenbendazole in sheep. Am. J. Vet. Res. – 1981, Vol. 42, No 7, pp. 1146–1148.
13. Причард Э., Барвик В. Контроль качества в аналитической химии / Пер. с англ. под. ред. И. В. Болдырёва. – СПб: «Профессия», 2011. – 320 с.
14. Rew R. S., Fetterer R. H. Mode of action of Antinematodal Drugs. In «Chemotherapy of parasitic diseases» Ed. W. C. Campbell, R. S. Rew, 1986, pp. 321–334.
15. Van den Bossche H. Chemotherapy of parasitic infections. Nature (London), 1978, Vol. 273, P. 626–630.
16. US Food and Drug Administration. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville, MD. 1996.

### References

1. Arkhipov I. A., Radionov A. V., Belova E. E., Sadov K. M., Arhipova A. I. Anthelmintic efficacy of vigisox at helminthiasis in sheep. *Ros. parazitol. zhurnal* [Russian Journal of Parasitology], 2010, no. 4, pp. 89–93.
2. Arkhipov I. A., Varlamova A. V., Danilevskaya N. V., Belova E.E., Sadov K.I. Efficacy of vigisox at helminthiasis in young cattle. *Ros. parazitol. zhurnal* [Russian Journal of Parasitology], 2011, no. 4, pp. 126–129.
3. Arkhipov I. A., Varlamova A. I., Danilevskaya N. V. Methods for the use of vigisox at helminthiasis in ruminants. *Ros. parazitol. Zhurnal* [Russian Journal of Parasitology], 2013, no. 2, pp. 112–113.
4. Carroll R. J., Ruppert D. Transformation and Weighting in Regression, Chapman and Hall, New York. 1988.
5. Chiap P., Boulanger B., Dewe W. et al. An Analysis of the SFSTP guide on Validation of Chromatographic bioanalytical Methods: Progress and Limitations. J. Pharm. Biomed. Anal., 2003, vol. 32, pp. 753–765.
6. Committee for medicinal products for veterinary use. Fenbendazole (extrapolation to all ruminants). EMEA/MRL/866/03-FINAL/June 2004.
7. Epshtein N. A. Validation of HPLC techniques in pharmaceutical analysis (review). *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal], 2004, vol. 38, no. 4, pp. 48–56.
9. Ermer J., Miller J. H. McB. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. 2006, John Wiley & Sons, p. 418.
10. GOST R ISO 5725-6-2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Место/год/издательство???
10. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., McDowall R. D. Validation on bioanalytical chromatographic methods. J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, vol. 17, pp. 193–218.
11. Marriner S. E., Bogan J. A. Pharmacokinetics of fenbendazole in sheep. Am. J. Vet. Res. – 1981, mol. 42, No 7, pp. 1146–1148.

12. Prichard E., Barwick V. Quality assurance in analytical chemistry. Spb., Publ. «Professiya», 2011. 320 p. (Russ. ed.: *Kontrol' kachestva v analiticheskoy himii*)
13. Rew R. S., Fetterer R. H. Mode of action of Antinematodal Drugs. Chemotherapy of parasitic diseases, 1986, pp. 321–334.
14. Senyuva H.Z., Gilbert J. A simple users' guide to methods of development and validation. (Russ. ed.: *Prostoe rukovodstvo dlya pol'zovateley po razrabotke i validatsii metodov*). M., Torius 77 Ltd., 2011. 43 p.
15. Van den Bossche H. Chemotherapy of parasitic infections. Nature (London), 1978, vol. 273, pp. 626–630.
16. US Food and Drug Administration. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville, MD. 1996.

**Russian Journal of Parasitology, 2016, V.38, Iss.4**

Received 15.03.2016

Accepted 28.11.2016

### **DETERMINATION OF FENBENDAZOLE AND ITS METABOLITES IN MILK BY THE METHOD OF LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY**

**Kochetkov P. P.<sup>1,2</sup>, Varlamova A. I.<sup>1</sup>, Abramov V. E.<sup>1</sup>, Misura N. S.<sup>2</sup>, Abramova E. V.<sup>1,2</sup>, Abramov S. B.<sup>1,2</sup>, Koshevarov N. I.<sup>2</sup>, Arkhipov I. A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K. I. Skryabin, 117218, Russia, Moscow, 28 B.

Cheremushkinskaya St., e-mail: [varlamova@vniigis.ru](mailto:varlamova@vniigis.ru)

<sup>2</sup> International Research Center for protection of human health, animals and environment., 117218, Russia, Moscow, 28 B. Cheremushkinskaya St., e-mail: [cozos@mail.ru](mailto:cozos@mail.ru)

#### **Abstract**

**Objective of research:** Development of methods for the determination of fenbendazole and its metabolites in milk by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

**Materials and methods:** Fenbendazole was administered orally to five cows. Samples of milk were taken on 1, 3, 5 and 10 days of drug application. The research method includes a description of reagents, plates and equipment; mass-spectrometric conditions for analysis of fenbendazole and its metabolites; preparation of the equipment to operation; preparation of eluent solution; preparation of the chromatograph to analysis; determination of chromatographic parameters of standard drug samples; preparation of milk samples to analysis; establishment of parameters of extracts' chromatography; procedure of calibration of fenbendazole and its metabolites in eluent.

**Results and discussion:** When studying the pharmacokinetics of fenbendazole and its metabolites (sulfone and sulfoxide) in milk, it was found that the maximal concentrations were determined 24 h after drug administration and were 22,6 ng/ml for fenbendazole sulfone, 34,0 ng/ml for fenbendazole sulfoxide and 19,7 ng/ml for fenbendazole. 10 days after treatment, the concentrations of fenbendazole and its metabolites in milk did not exceed permitted values.

**Keywords:** milk, fenbendazole, metabolite, sulfoxide, sulfone, pharmacokinetics, liquid chromatography, mass-spectrometry.

(RSCI)[http://elibrary.ru/projects/citation/cit\\_index.asp](http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp)) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org/Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)