



Rapport

Dokumentationskrav til fødevarekvalitet, kemi og sensorik

Multimetode (LC-MS/MS) til screening for antiparasitære lægemidler til dyr i blod

Kirsten Jensen og Tina Frogne

6. april 2021
Proj.nr. 2007967
Version 1
KIJ/MT/TIF

Baggrund

Forsknings- og udviklingsarbejdet i projektet "Dokumentationskrav til fødevarekvalitet, kemi og sensorik" fokuseres på afprøvning og udvikling af LC-MS/MS-metoder (liquid chromatography-mass spectrometry) baseret på komplekse biologiske matricer, herunder velegnede oprensningsmetoder forud for analyse. I projektet tages udgangspunkt i tidligere opnåede erfaringer fra lignende metoder, fx analyse af androstenon og skatol i spækprøver (hangriseanalyser), allergifremkaldende ingredienser samt måling af antibiotika i blod.

Det vil være relevant at undersøge, om en LC-MS/MS-multimetode kan anvendes til screening af blod for veterinære lægemiddelrester til bekæmpelse af indvoldsparasitter (ormemidler). Der har været en forventning om, at LC-MS/MS-metoderne kan implementeres på LDTD-MS/MS (Laser Diode Thermal Desorption) som hurtigmetode, som det i dag praktiseres for hangriseanalyser. Dette kan åbne mulighed for analyse af et større prøveantal af de enkelte parametre.

Indvoldsorm i svin – forekomst og behandling

Forekomst af forskellige indvoldsorm i dansk svineproduktion, samt behandlingen (aktivt stof), kan inddeles efter:

Forekomst	Art	Behandling (aktivt stof)
Hyppig	Spoleorm	Fenbendazol, Ivermectin
	Knudeorm	Fenbendazol, Ivermectin, Flubendazol
Sporadisk	Piskeorm	Fenbendazol, Ivermectin, Flubendazol
	Trådorm	Ivermectin
Ikke påvist i de senere år	Rød maveorm	Fenbendazol
	Lungeorm	Fenbendazol, Ivermectin

<https://svineproduktion.dk> / <https://medicintil dyr>.

Se strukturformler m.m. for aktivstofferne i bilag 1.

DMRI har tidligere analyseret for ivermectin, ekstraheret fra lever [1]. I nærværende undersøgelse er der fokuseret på mulighederne for analyse af fenbendazol og flubendazol, samt metabolitter heraf, i blodplasma.

Fenbendazol

Behandlingen af grise med fenbendazol kan foretages via drikkevandet. Den nødvendige daglige mængde lægemiddel beregnes ud fra den estimerede samlede kropsvægt (kg) af hele gruppen af grise, der skal behandles. Den

anbefalede dosis er 2,5 mg fenbendazol/kg kropsvægt pr. dag i 2-3 på hinanden følgende dage. Efter indtagelsen absorberes fenbendazol kun delvist. Det absorberede fenbendazol metaboliseres hurtigt i leveren, hovedsageligt til dets sulfoxidmetabolit (oxfendazol) og derefter til dets sulfonmetabolit (oxfendazolsulfon – terminal metabolit).

Fenbendazol og dets metabolitter fordeles til hele kroppen, hvor de højeste koncentrationer opnås i leveren. Udskillelsen sker primært via fæces og i mindre grad via urinen. Tilbageholdelsestiden er sat til 4-5 dage [3].

Hos grise er oxfendazol hovedkomponenten i plasma, idet det udgør ca. 2/3 af det samlede AUC (areas under the plasma concentration-time curves), dvs. summen af AUC for fenbendazol, oxfendazol og oxfendazolsulfon [3, 7]. I et forsøg med grise blev fenbendazol og dets metabolitter detekteret i plasma op til 24 timer efter oral indtagelse. Efter 48 timer var koncentrationen af oxfendazol og oxfendazolsulfon under kvantificeringsgrænsen på 0,1 µg/mL [7]. Der er detekteret indhold af fenbendazolsulfon (oxfendazolsulfon) i plasma fra kyllinger i op til 96 timer efter behandling [8].

Flubendazol

Flubendazol er uopløselig i vandige systemer, fx mave-tarm-kanalen, hvilket resulterer i udskillelse af intakt lægemiddelstof i fæces. Den begrænsede mængde, der absorberes, bliver primært metaboliseret ved first-pass af leveren (carbamatydrolyse og ketonreduktion). Metabolitterne udskilles med galden og urinen. Hos grise er den højeste vævskoncentration målt i lever og nyrer. Halveringstiden af flubendazol i væv er 1-2 dage. I kyllinger er halveringstiden for flubendazol og dets metabolitter i plasma 1-4 dage [4].

I et forsøg med grise blev effekten af forskellige formuleringer af flubendazol undersøgt. Det blev fundet, at den hydrolyserede metabolit var det primære molekyle i plasma, hvor det udgjorde 97% af den totale mængde reststoffer i plasma [5]. Indholdet heraf i plasma blev efter 55 timer målt til 0,1 µ/mL. Reaktionsveje for nedbrydning af flubendazol er vist i [9].

Afprøvning

På grund af den hurtige metabolisering i kroppen er det hensigtsmæssigt at fokusere på metabolitter fra fenbendazol og flubendazol, henholdsvis oxfendazol og den hydrolyserede metabolit af flubendazol, foruden de oprindelige aktivstoffer. Analysemetodens kvantificeringsgrænse skal som minimum være 0,1 µ/mL.

Blodfraktion

Analyserne blev foretaget i blodplasma hjemtaget fra Danish Crowns anlæg i Ringsted. Blodplasma blev tappet fra en stor samletank (temp. 2°C), centrifugeret ved 1550 x g ved 4°C i 20 min. og fordelt i centrifugerør, der blev opbevaret ved -80°C indtil anvendelse. Det skal bemærkes, at det på nuværende tidspunkt ikke er muligt at udtage blodprøver med fuld sporbarhed på enkeltdyrniveau. En løsning kunne være at udtage en blodprøve fra stiksåret, når slagtedyret forlader stødbordet, hvor grisen afbløder ½-1 dl. Her kan der imidlertid være risiko for forureninger eller fortynding af blodet fra skoldekarret. En anden mulighed er at udtage blod fra hjertet, umiddelbart før veterinærkontrollen. Ulempen kan

her være, at blodet er koaguleret, hvilket kan besværliggøre oprensningen forud for den kemiske analyse.

*Aktive stoffer/
metabolitter/
interne standarder*

Afprøvningen har omfattet flubendazol og fenbendazol, med flubendazol-D3 og fenbendazol-sulfon-D3 som interne standarder, foruden oxfendazol, med den tilhørende D3. Det var desværre ikke muligt at fremskaffe den hydrolyserede metabolit af flubendazol.

Ekstraktion

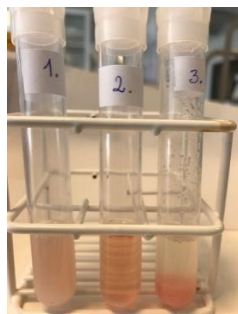
Indledningsvis blev ekstraktionsmetoden anført i [2] afprøvet, men den var uspecifik og ikke direkte brugbar i den pågældende sammenhæng. Metoden blev derfor efterfølgende kombineret med "Hangrisemetoden", SM 020 [6], hvor den basiske ekstraktion blev erstattet med en fosfatbuffer, pH 3.

Følgende forsøg med oprensning af serum blev gennemført:

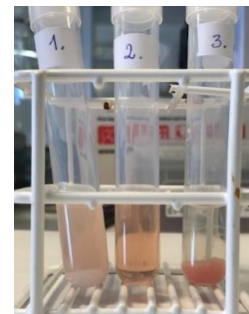
Rør	Serum, ml	Fosfatbuffer, pH 3,0 ml	Acetonitril (ACN), ml
1	1,0	1,0	1,0
2	1,5	1,5	0
3	1,5	0	1,5

Resultaterne fra de 3 oprensningsforsøg er vist i nedenstående figurer, hvor prøverne efter henstand i 30 min. blev centrifugeret i 10 min. ved 3500 rpm ved stuetemperatur.

Efter 30 min.
henstand, før
centrifugering



Efter centrifuge-
ring, 10 min, 3500
rpm v. 22°C



Figur 1. Oprensningsforsøg med serum med forskellige behandlinger.

Den bedste adskillelse og klarhed af ekstraktet ses i rør 3, hvor der er anvendt ren ACN. Vurderingen blev alene baseret på en visuel bedømmelse.

*Oprensning på fast-
fasekolonner*

Der er mulighed for at erstatte ekstraktionstrinnet med oprensning på separationskolonner, dvs. ren, spiket plasma sættes direkte på kolonnerne forud for LC-MS/MS-analysen.

Der er afprøvet følgende separationskolonner:

- Biotage (Isolute – SMP-918-0005-AG)
- Phenomenex Phree og HLB

Proceduren var følgende for Biotage:

- 300 µL ACN sættes på kolonnen
- 100 µL spiket plasma sættes på kolonnen
- Kolonnen mikses på Whirli-mikser ca. 30 sek.

Prøven suges igennem kolonnen med vakuum, ca. 5 min.

Der blev afprøvet en sur og en neutral version af standarddrækken på Biotage-kolonnerne. De opnåede koncentrationer var meget lave; det var således kun muligt at se det højeste niveau på 12,5 ng/ml. I de første forsøg blev det klart, at der skal tages højde for, at prøven fortyndes ved ekstraktion på kolonnen. Der er ikke arbejdet videre med Biotage-kolonnerne.

HBL- og Phree-kolonner er afprøvet med udgangspunkt i procedurer og applikationer fra Phenomenex [10]. Proceduren er den samme som beskrevet for Biotage, bortset fra at væsken presses igennem kolonnen.

Resultaterne viste, at begge kolonnetyper fra Phenomenex er velegnede, afhængigt af de kemiske egenskaber for de aktive stoffer. Flubendazol og fenbendazol, samt de tilhørende interne standarder, fungerede fint på Phree-kolonnen, men ikke på HBL-kolonnen. Modsat kunne oxfendazol ikke genfindes efter separation på Phree-kolonnerne, mens der blev fundet en mindre del i ekstraktet efter HLB-kolonnerne. Det kan afprøves, om methanol er mere velegnet til at eluere oxfendazol i stedet for ACN. Forslag til oprensning af stofferne kan fremover være følgende kolonner: Resprep SLE (Restek), Oasis MCX, HyperSep Retain-cx (Thermo). Disse vil sandsynligvis være velegnede til alle 3 stoffer.

Der kan således være behov for at anvende flere kolonnetyper ved oprensning af prøver forud for anvendelse af multimetoder til analyse af veterinære lægemiddelrester. Afprøvningen har givet en god indsigt i forskellig kolonnetypers kapacitet og kvalitet.

Indkøring LC-MS/MS

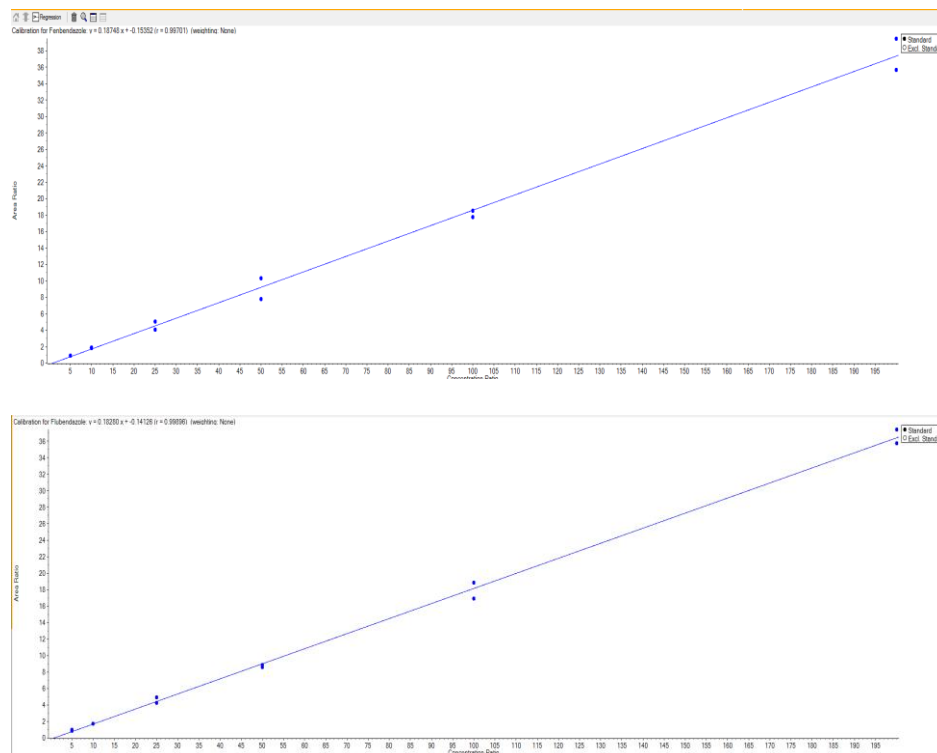
Analysemetoden er indkørt på LC-MS/MS-udstyret, hvor overgange er identificeret, og de rene opløsninger er analyseret i standarddrækker. Resultaterne fra arbejdet med identifikation af overgange er vist i bilag 2.

Der er desuden fremstillet standardkurve (1-punktskalibrering) for henholdsvis flubendazol og fenbendazol i en koncentration på 200 ng/ml (bilag 3). Standardkurverne blev anvendt til at måle effektiviteten af SPE-oprensningsmetoderne.

Standard- addition/kalibreringskurve

Ekstraktionsbetingelserne fra forsøg med Biotage-kolonner blev videreført med afprøvning af standardaddition til plasma. En mere koncentreret standarddrække på 5 niveauer, i koncentrationsområdet 200-5 ng/ml, blev oprenset med sur ACN på Phree-kolonner.

Resultaterne er vist i nedenstående figurer for fenbendazol og flubendazol.



Figur 2. Fenbendazol (øverst) og flubendazol (nederst) ekstraheret fra plasma efter oprensning på Phree-kolonner.

Begge standarddrækker viser en tilfredsstillende lineær sammenhæng. Den anvendte HPLC-metode tager udgangspunkt i [2].

I bilag 4 ses der eksempler på kromatogrammer på fenbendazol og flubendazol og de tilhørende D3 i plasma fra de spiked standardkurver.

Det var ikke muligt at opnå tilsvarende tilfredsstillende standardkurver for oxfendazol inden for den afsatte tidsramme. Som tidligere nævnt blev de bedste resultater opnået med HLB-kolonner, hvor der i bilag 5 er vist kromatogrammer fra en spiket standardkurve for to elueringer på samme kolonne. Figureerne viser, at det er muligt at se oxfendazol i en høj koncentration (200 ng/mL), men tophøjden er relativ lav. Anden eluering viser, at der er en væsentlig rest af oxfendazol tilbage på fastfasekolonnen efter første eluering.

LDTD-MS/MS

Der var en forventning om, at LC-MS/MS-metoderne kunne implementeres på LDTD-MS/MS (Laser Diode Thermal Desorption) som hurtigmetode, som det i dag praktiseres for hangriseanalyser.

Resultaterne viste, at flubendazol, fenbendazol og oxfendazol kunne kvantificeres i et passende koncentrationsniveau i rene opløsninger, hvorimod kvantificering af tilsvarende lave koncentrationer i plasma var vanskelig, pga. interferens fra matricen. Der vil derfor være behov for yderligere test af flere velegnede separationskolonner mhp. at fjerne fedt, før implementering af en LDTD-MS/MS-metode er realistisk. Viser der sig udfordringer i forhold til stoffernes stabilitet i laseren, kan der alternativt ses efter nedbrydningsprodukter.

Konklusion

På baggrund af analyser af aktivstofferne flubendazol og fenbendazol til bekæmpelse af indvoldsparasitter, samt metabolitten oxfendazol, er det vurderet, at der kan være et potentiale i at videreudvikle en LC-MS/MS-multimetode til screening af blod for veterinære lægemiddelrester. De rene stoffer kan kvantificeres på LC-MS/MS i et passende koncentrationsniveau, hvorimod kvantificering af tilsvarende lave koncentrationer i plasma er vanskelig, pga. interferens fra matricen. Der er tale om en kompleks matrice, som erfaringsmæssigt giver udfordringer, og test af forskellige separationskolonner, mhp. at fjerne fedt og protein, er derfor gennemført. Resultaterne herfra har givet en værdifuld viden om forskellige kolonnetypers kapacitet og kvalitet. Det vil kræve mere arbejde at implementere en LC-MS/MS-hurtigmetode på LDTD-MS/MS. Viser der sig udfordringer i forhold til stoffernes stabilitet i laseren, kan alternativet være at se efter nedbrydningsprodukter.

Henvisning

- [1] Bestemmelse af ivermectin og doramectin. 66009-ANF-201 – udgave 05. DMRI, 2008.
- [2] Schneier, M.L. et. al. Evaluation of serum as a potential matrix for multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in chicken using liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry. Journal of AOAC international vol 90, No 6, 2007.
- [3] Panacur AquaSol, INN-Fenbendazole – Europa EU
https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160826135429/anx_135429_da.pdf
- [4] Produktresumé for Flubenol Vet. oralt pulver. Lægemiddelstyrelsen. 2017.
<https://vetisearch.dk/storage/epars/Flubenol%20Vet.,%20oralt%20pulver%2050%20mg-g.pdf>
- [5] Ceballos, L. et al. Pharmacokinetic comparison of different flubendazole formulations in pigs: A further contribution to its development as a macrofilaricide molecule. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. 5, 178-184, 2015.
- [6] SM 020-03. Bestemmelse af skatol og androstenon med LDTD-MS/MS i nakkespæk fra hangrise (in-house-metode). 2020.
- [7] Bjelke Petersen, M. & Friis, C. Pharmacokinetics of fenbendazole following intravenous and oral administration to pigs. American Journal of Veterinary Research 61(5):573-6. 2000.
- [8] Taylor, S.M. et al. Plasma concentrations of fenbendazole and its metabolites in poultry after a single oral administration. J. Vet. Pharmacol. Therap. 16(3):377-9. 1993.
- [9] Elkhoudary, M.M. et al. Stability-Indicating Methods for Determination of Flubendazole and Its Degradants. Journal of Chromatographic Science, Volume 53, Issue 6, 2015.
- [10] Technical note: Phenomenex TN-0065.

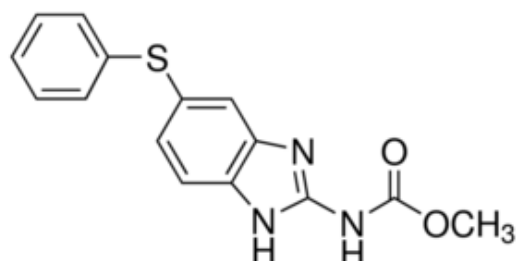
Strukturformler m.m. for aktive stoffer til behandling af indvoldsorm i svin

Fenbendazol

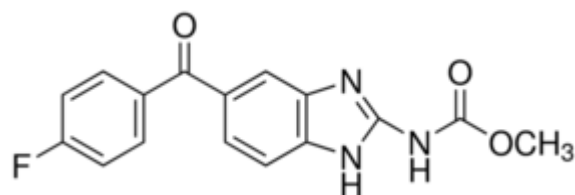
Synonym: Methyl 5-(phenylthio)-2-benzimidazolecarbamate

CAS Number: [43210-67-9](#)Empirical Formula (Hill Notation): $C_{15}H_{13}N_3O_2S$

Molecular Weight: 299.35

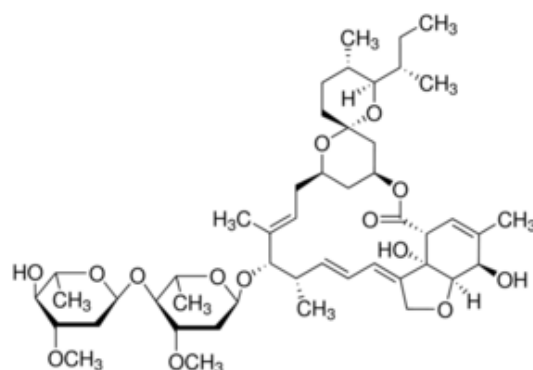
Boiling point: $541.4 \pm 42^\circ\text{C}$ **Flubendazol**Synonym: Flumoxanal, Methyl [5-(4-fluorobenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]carbamateCAS Number: [31430-15-6](#)Empirical Formula (Hill Notation): $C_{16}H_{12}FN_3O_3$

Molecular Weight: 313.28

Boiling point: $313.2 \pm 52^\circ\text{C}$ **Ivermectin**Synonym: 22,23-Dihydroavermectin B₁, MK-933CAS Number: [70288-86-7](#)

Molecular Weight: 875.1

Empirical Formula:

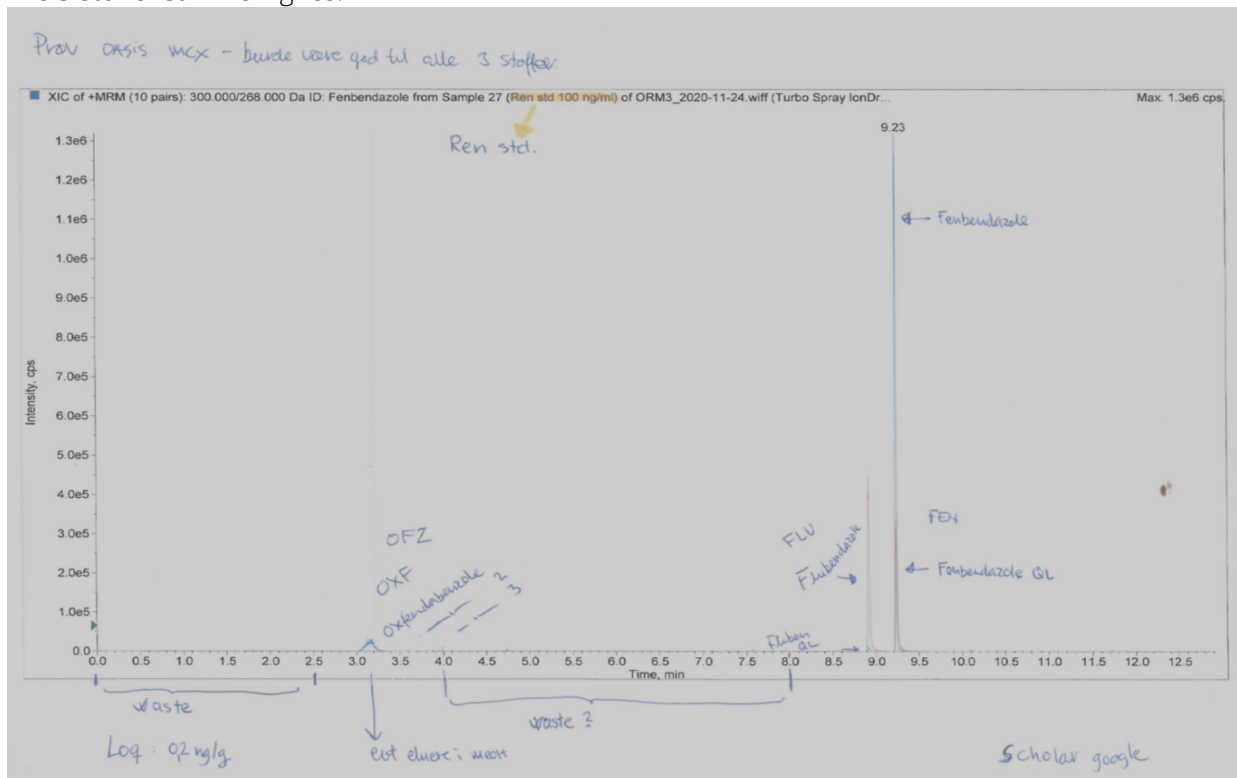
 $C_{48}H_{74}O_{14}$ (22,23-dihydroavermectin B_{1a}) $C_{47}H_{72}O_{14}$ (22,23-dihydroavermectin B_{1b})Boiling point: $940.4 \pm 52^\circ\text{C}$ 

Indkøring af overgange og optimering på LC-MS/MS

Indkøring af overgange for oxfendazol

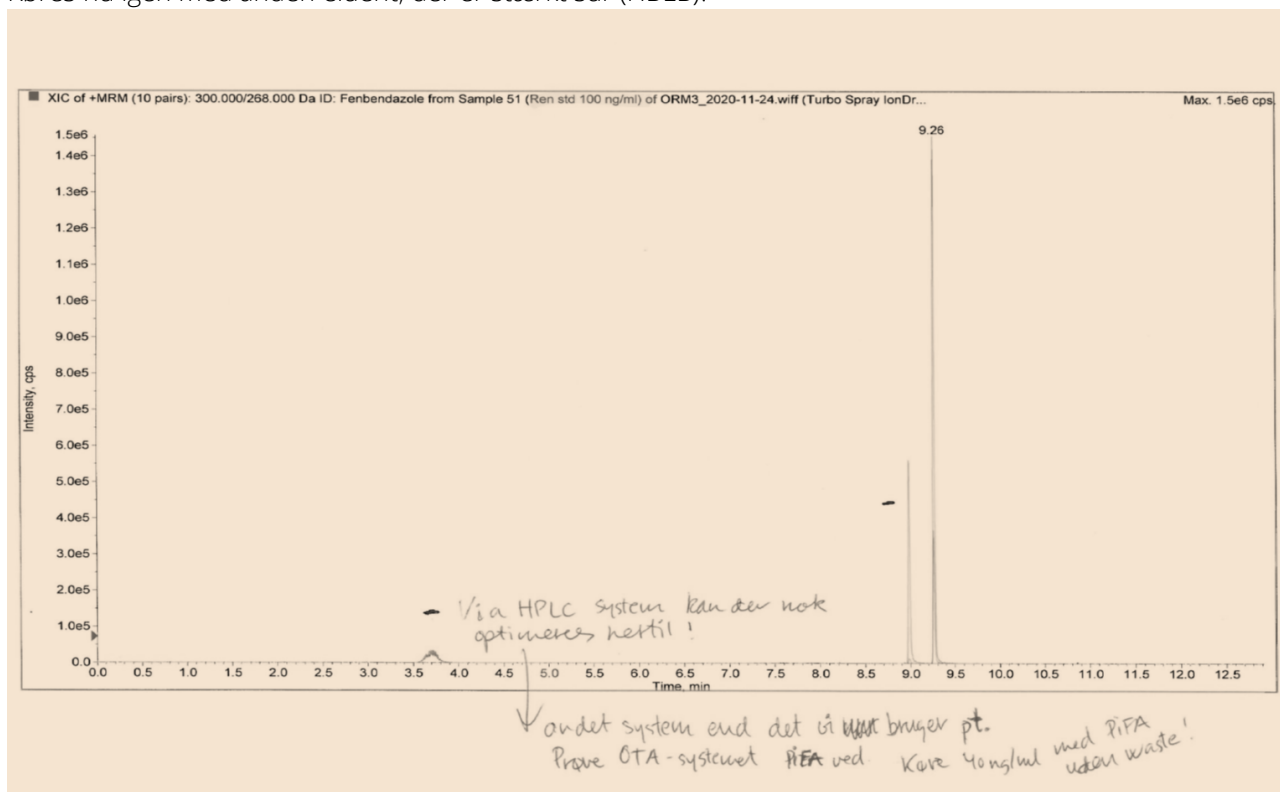


Alle 3 stoffer sammenlignes:



Her ses det, hvor lille et signal oxfendazol har i forhold til flu- og fenbendazol.

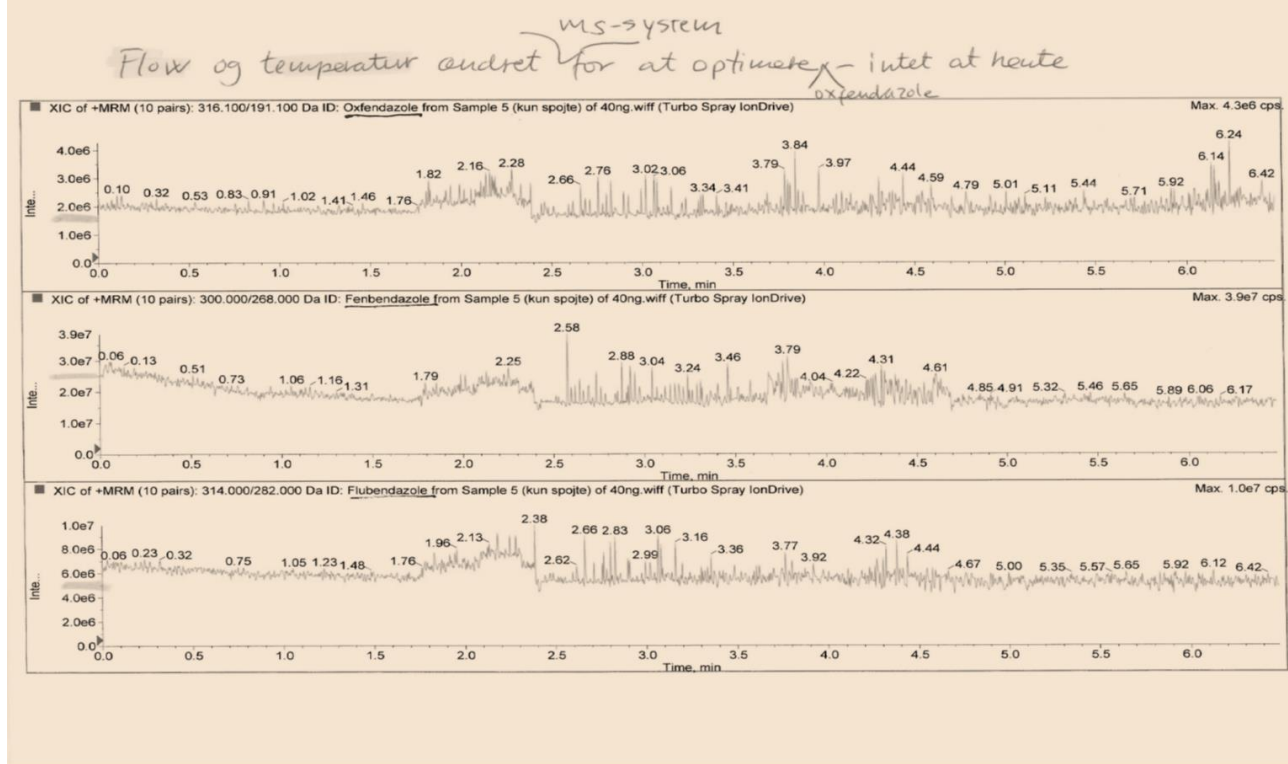
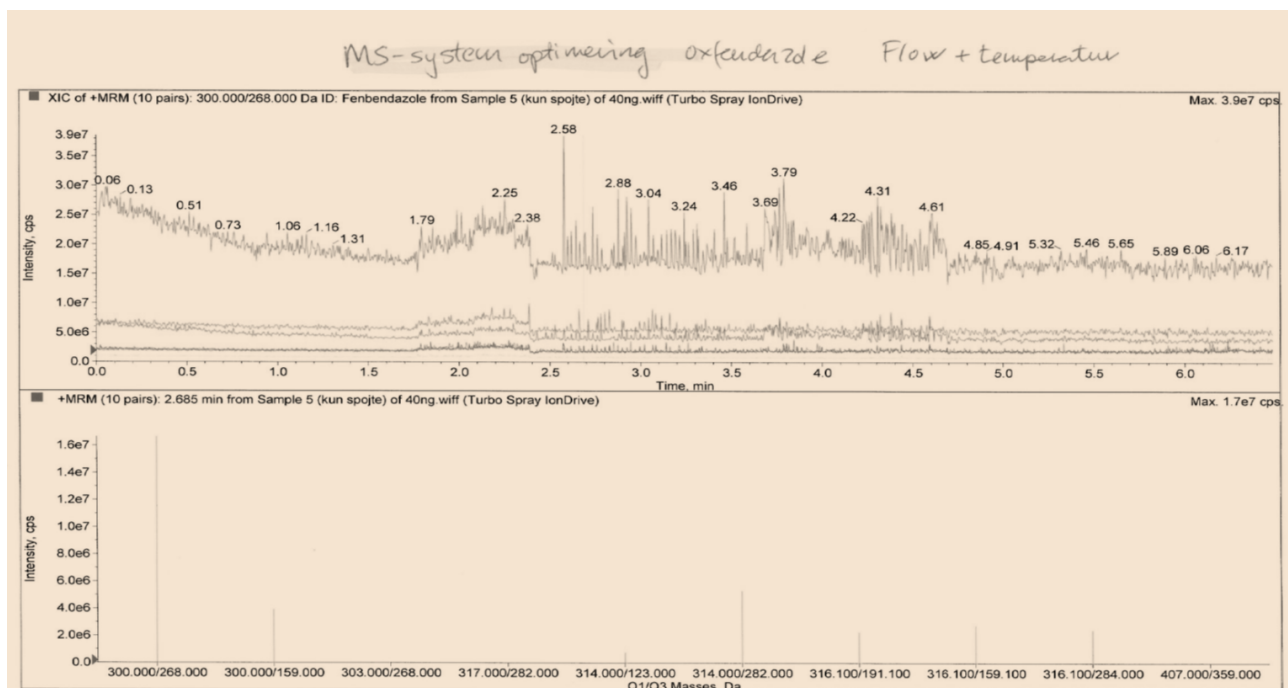
Køres nu igen med anden eluent, der er stærkt sur (HBLB).



Dette HPLC-system (Diamin-metoden) giver en lille forbedring. Vil nok kunne optimere top til 1/3 af flubendazol.

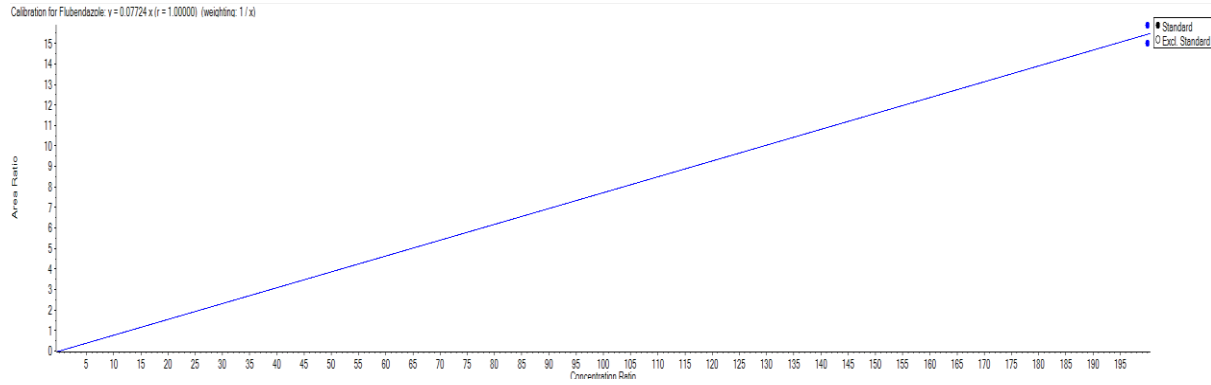
Der ses muligheder for at kunne optimere yderligere på oxfendazol ved andre HPLC-systemer, fx OTM-metoden (ochratoxin).

På MS-systemet (der sprøjtes standard direkte ind i MS'en) optimeres på flow og temperatur mht. oxfendazol. Her er der intet af hente, hvilket ses nedenfor:

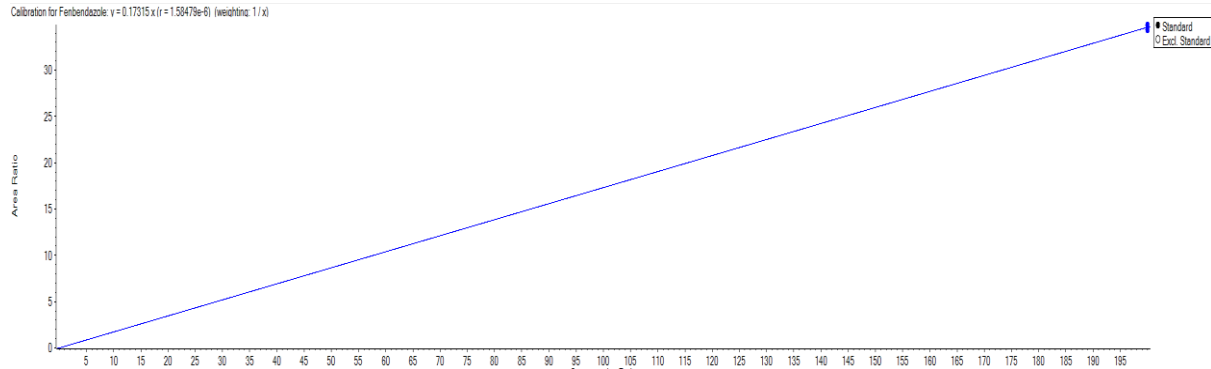


Standard 200 ng/mL i plasma, ekstraheret med ACN

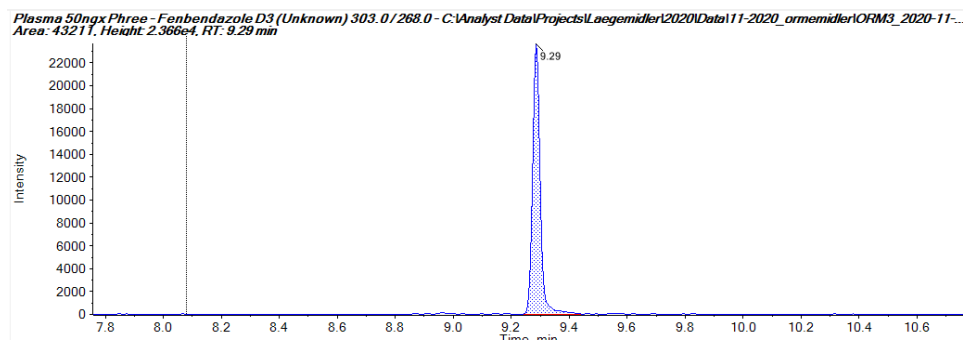
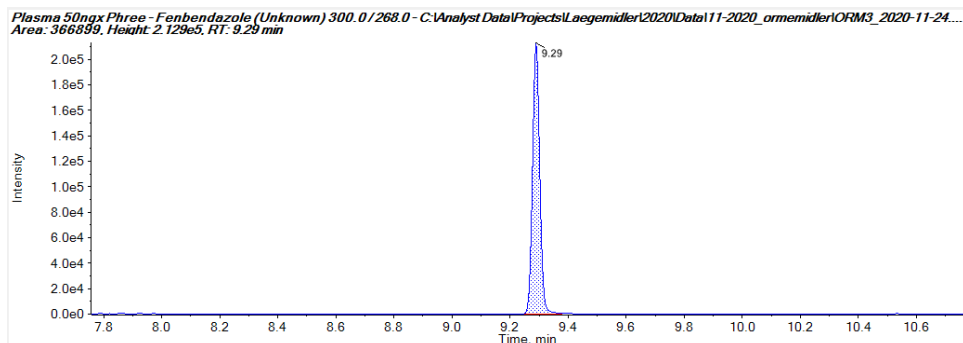
Flubendazol



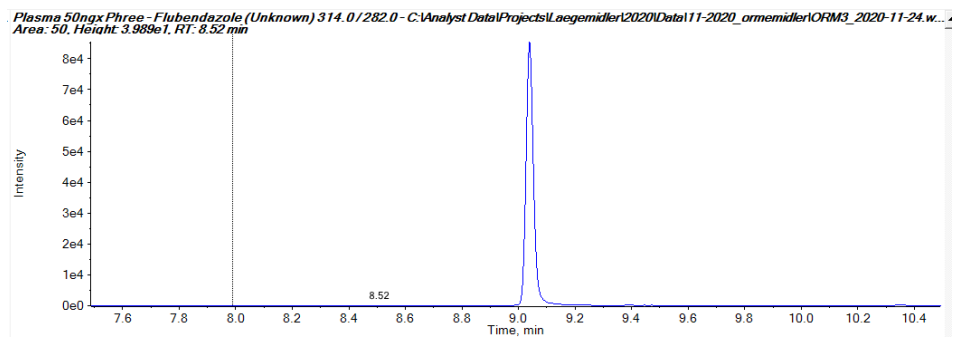
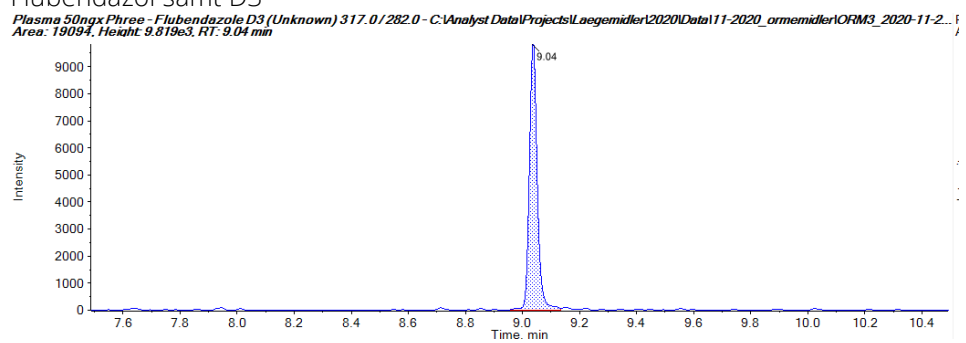
Fenbendazol



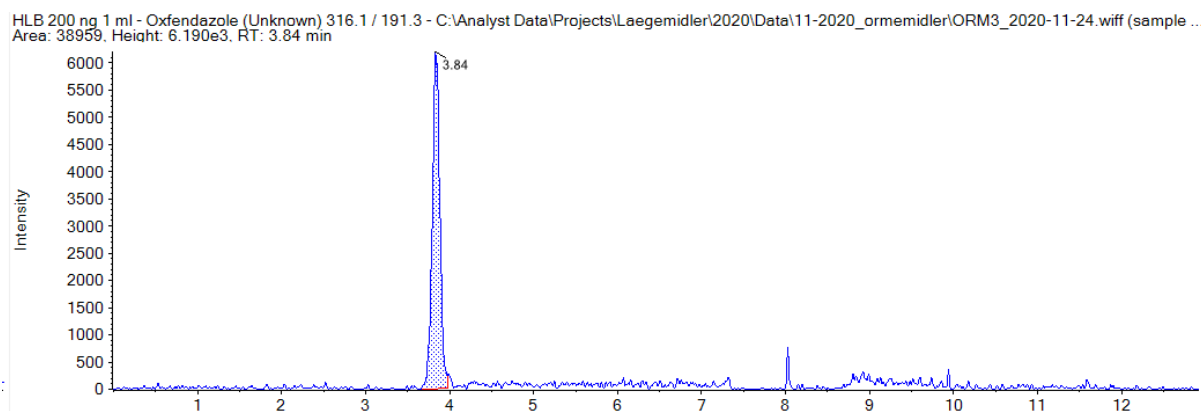
Eksempler på fenbendazol og D3 i plasma på Phree-kolonner = spikede standardkurver



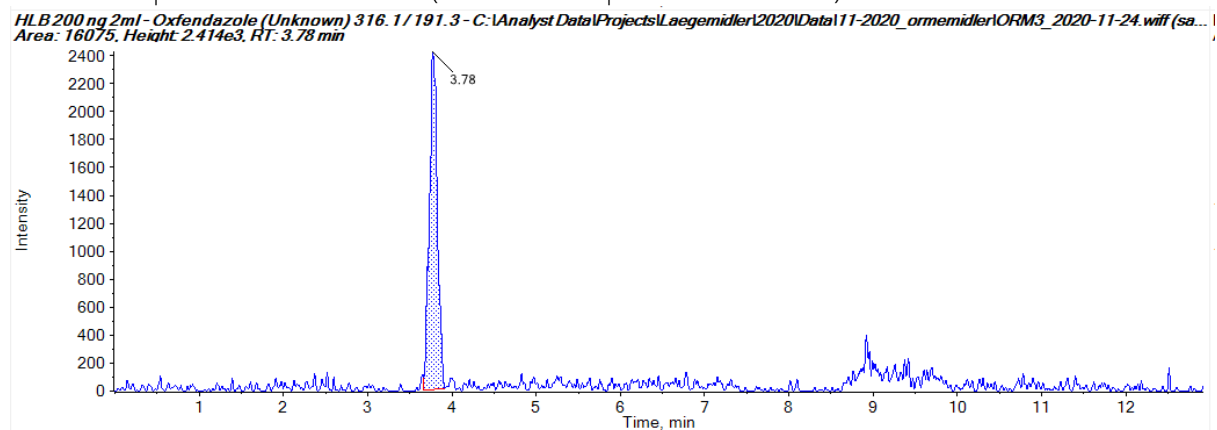
Flubendazol samt D3



Oxfendazol på HBL-kolonne – 1 ml (1. ekstraktion)



Oxfendazol på HBL-kolonne – 2 ml (2. ekstraktion på samme kolonne)



Trods små værdier ses der her toppe for oxfendazol. Bemærk koncentration på 200 ng/ml sammenlignet med topøjde.