

# 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

Marilena Gili, Marino Prearo, Paola Stella, Federica Ostorero, Maria Cesarina Abete  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy

## Abstract

The use of veterinary drugs may cause the presence of residues in food of animal origin if appropriate withdrawal periods are not respected. A high-performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed for the simultaneous detection of 11 benzimidazole residues, including metabolites – albendazole, albendazole sulphoxide, albendazole sulphone, fenbendazole, fenbendazole sulphoxide (oxfendazole), fenbendazole sulphone, flubendazole, mebendazole, oxbendazole, thiabendazole, 5-hydroxythiabendazole – in bovine, ovine, equine, swine, rabbit and poultry liver and in bovine, swine and fish muscle. After extraction with a dichloromethane/acetonitrile solution (35/65 v/v) containing 5% ammonium hydroxide, the solvent was evaporated to dryness, the residue was dissolved in HCl 0.1 M, defatted with hexane, purified on a strong cation exchange solid-phase extraction cartridge and analysed in HPLC with diode array and fluorescence detectors. The method was validated as screening qualitative method evaluating, according to Commission Decision 2002/657/EC criteria, specificity, CC $\beta$  and  $\beta$  error at cut off level of 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and ruggedness.

## Introduzione

I benzimidazolici sono antielmintici ad ampio spettro molto usati in medicina veterinaria per la prevenzione ed il trattamento di parassitosi intestinali causate da varie specie di vermi (tra i quali ossiuri, ascaridi, tricocefali, anchilostomi, strongiloidi e tenie). Il loro utilizzo scorretto può determinare la presenza negli alimenti di origine animale di residui,

che rappresentano un potenziale rischio per i consumatori (Danaher *et al.*, 2007). Inoltre questi farmaci sono ampiamente metabolizzati e la quantità e la tipologia di metabolita varia con la struttura chimica del farmaco parente, la matrice e la specie: per la maggior parte dei benzimidazolici si ritrovano nei tessuti uno o più metaboliti (Delatour e Parish, 1986; McKellar e Scott, 1990; Dowling *et al.*, 2005). L'Unione Europea (UE) ha stabilito limiti massimi residuali (LMR) in tessuti e latte per i benzimidazolici e i loro metaboliti con valori tra 10 e 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Regolamento 37/2010/EC; Commissione Europea, 2010). Gli Stati Membri della UE, per svelare le somministrazioni illecite o abusive e per verificare la conformità dei residui agli LMR, programmano un costante monitoraggio attraverso il Piano Nazionale Residui (PNR), che prevede la ricerca di residui di benzimidazolici in muscolo, latte e fegato. I campioni ufficiali, prelevati dall'autorità competente, sono analizzati in laboratori autorizzati attraverso metodi di screening e, in caso di positività, analizzati nuovamente con metodi di conferma. I metodi di screening sono applicati nell'analisi preliminare di routine su un numero elevato di campioni con lo scopo di evidenziare quelli sospetti: per tale motivo, sono metodiche di facile impiego, basso impatto economico e che non richiedono l'utilizzo di apparecchiature sofisticate; essi devono però essere in grado di rilevare la presenza del maggior numero possibile di analiti della famiglia e avere una probabilità di errore falso negativo (errore  $\beta$ ) minore del 5%. La Decisione della Commissione 2002/657/CE (Commissione Europea, 2002) che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati definisce le caratteristiche dei metodi da utilizzare per le prove di screening e di conferma nell'ambito dei controlli ufficiali e i parametri da verificare durante la validazione dei metodi che ogni laboratorio deve effettuare prima di trasferirli in routine. Il Regolamento 2004/882/CE (Commissione Europea, 2004) relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere animale, richiede che i laboratori che partecipano all'analisi di campioni ufficiali utilizzino procedure analitiche accreditate in conformità alla norma ISO 17025:2005 (ISO, 2005).

In letteratura sono descritti diversi metodi per la ricerca di residui di benzimidazolici in tessuti e latte; la maggior parte degli autori utilizzano la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata con rivelatore a sequenza di diodi [diode array detector (DAD)] (Dowling *et al.*, 2005; Stubbings *et al.*, 2005; De Ruyck *et al.*, 2000; Rose, 1999; Moreno *et al.*, 2005; Takeba *et al.*, 2000; Msagati e Nindi, 2006; Baliz, 1999) o a spettrometria di massa [mass spectrometry (MS)] (De Ruyck *et al.*, 2001, 2002). Una panoramica dettagliata ed esaustiva sulle metodologie di analisi dei residui di benzimidazolici è stata redatta da Danaher (Danaher *et al.*, 2007).

Correspondence: Marilena Gili, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, via Bologna 148, 10154 Torino, Italy.  
Tel. +39.011.2686235 - Fax: +39.011.2686237.  
E-mail: marilena.gili@izsto.it

Key words: Benzimidazoles, Liver, Muscle, HPLC.

Received for publication: 12 August 2013.

Accepted for publication: 29 August 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright M. Gili *et al.*, 2014  
Licensee PAGEPress, Italy  
Italian Journal of Food Safety 2014; 3:1640  
doi:10.4081/ijfs.2014.1640

trometria di massa [mass spectrometry (MS)] (De Ruyck *et al.*, 2001, 2002). Una panoramica dettagliata ed esaustiva sulle metodologie di analisi dei residui di benzimidazolici è stata redatta da Danaher (Danaher *et al.*, 2007).

Purtroppo, se si considera che, tra i farmaci autorizzati e i loro metaboliti, le sostanze della famiglia sono circa 20, risulta molto difficile ricercarle simultaneamente: la messa a punto di un metodo multiresiduo e al contempo semplice ed applicabile nella maggior parte dei laboratori risulta una sfida per gli analisti, a causa delle differenti caratteristiche di lipofilia (coefficiente di partizione ottanolo-acqua) e pK<sub>a</sub> all'interno della famiglia; attualmente è disponibile un metodo di screening che rileva 19 benzimidazolici nel latte mediante LC-MS (Jedziniak *et al.*, 2009). Una esaustiva descrizione delle caratteristiche chimico-fisiche e farmacocinetiche di questa famiglia, con relative vie metaboliche e prodotti di biotrasformazione, è riportata nello studio di Danaher (Danaher *et al.*, 2007).

Scopo del presente lavoro è stato lo sviluppo di un semplice metodo di screening multiresiduale per la ricerca di residui di benzimidazolici e metaboliti in fegato e muscolo mediante HPLC con rivelatori DAD e a spettrofotometria in fluorescenza [fluorescence detector (FLD)] a livelli di concentrazione pari ad almeno la metà dei valori di LMR, ove fissati.

## Materiali e Metodi

### Reagenti

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analisi o HPLC (Sigma Aldrich, St. Louis, MD, USA). Gli standards degli analiti sono di purezza certificata non inferiore al 98% (Sigma Aldrich). Per la purificazione mediante estrazione in fase solida [solid phase extraction (SPE)] sono state utilizzate colonnine a fase

stazionaria polimerica con gruppo funzionale scambiatore cationico forte acido benzensolfonico STRATA XC (200 mg, 6 mL; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

## Soluzioni

Le soluzioni madri di ciascun analita, alle concentrazioni nominali di 200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  in N,N-dimetilformamide, sono stabili per un anno a 2÷8°C al buio. La soluzione intermedia MIX degli analiti in metanolo, alla concentrazione di 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , è stabile per 1 anno a 2÷8°C al buio. La soluzione di drogaggio MIX degli analiti in metanolo, alla concentrazione di 2.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , è stabile per 1 anno a 2÷8°C al buio. La soluzione di drogaggio di standard interno in metanolo, alla concentrazione di 2.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , è stabile per 1 anno a 2÷8°C al buio.

La miscela di estrazione è costituita da diclorometano/acetonitrile (35/65 v/v), stabile a 2÷8°C per 1 mese. La miscela di eluizione per le colonne SPE è costituita da ammonio idrossido 30% acquoso/metanolo (30/70 v/v), stabile a 2÷8°C per 1 mese. La fase mobile A per HPLC è ammonio fosfato monobasico 0.01 M acquoso a pH 4.8, stabile a 2÷8°C per 1 settimana. Gli estratti purificati sono ridisciolti in miscela di ripresa costituita da fase mobile A/metanolo (70/30 v/v), stabile a 2÷8°C per 1 mese.

## Caratteristiche dei campioni di prova

Le prove di sviluppo e validazione del metodo sono state condotte su campioni di fegato di bovino, ovicaprino, equino, suino, coniglio e

pollo e di muscolo di bovino, suino e prodotti ittici. I campioni sono stati prelevati dai Servizi Veterinari delle AA.SS.LL. e conferiti al laboratorio. Prima dell'utilizzo è stata verificata su ciascun campione l'assenza di residui dei farmaci ricercati.

## Apparecchiature

L'analisi cromatografica è eseguita mediante Cromatografo liquido Agilent 1200 (Agilent Technologies, Atlanta, GA, USA), equipaggiato con pompa quaternaria, termostato per colonne, autocampionatore e rivelatori DAD e FLD. Il detector DAD è impostato a 300 nm. Il detector FLD è impostato a lunghezza d'onda di eccitazione ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) e lunghezza d'onda di emissione ( $\lambda_{\text{em}}$ ) riportate in Tabella 1. La separazione HPLC è condotta su colonna GEMINI NX C18 (250×3 mm ID, 5  $\mu\text{L}$ ), termostata a 35°C in un tempo totale di analisi di 40 min, con programma di eluizione a gradiente con fase mobile [A] ammonio fosfato monobasico 0,01 M pH 4.8, [B] acetonitrile, [C] metanolo a flusso di 0.5 mL/min secondo un programma di eluizione a gradiente. Il volume di iniezione è di 30  $\mu\text{L}$  (Tabella 1).

## Preparazione del campione

A 10 g di tessuto sono aggiunti 100 mL di soluzione di standard interno (nocodazolo) a 10 ng/ $\mu\text{L}$  in metanolo, 20 mL di miscela diclorometano/acetonitrile (35/65 v/v) e 1 mL di ammoniaca 30%; dopo omogeneizzazione mediante Ultra Turrax si aggiunge 10 g di sodio solfato anidro e si agita per 15 min su agitatore ad inversione e per 10 min in bagno

ad ultrasuoni. Dopo centrifugazione per 15 min a 4000 rpm, il surnatante è trasferito in provetta da 50 mL; il residuo è ripreso con 20 mL di miscela di estrazione e sottoposto ad agitazione per 15 min su agitatore ad inversione; dopo centrifugazione per 15 min a 4000 rpm, il surnatante è riunito al precedente e portato a secco in bagnomaria a 50±5°C in corrente d'azoto. Il residuo è ripreso con 10 mL di HCl 0,1 M e sgrassato con 5 mL di esano mediante agitazione su agitatore a vibrazione e successiva centrifugazione. Dopo eliminazione della fase esanica superiore, 8 mL di estratto sono sottoposti a purificazione su colonnine SPE a scambio cationico, precedentemente condizionate con 5 mL di metanolo e sequenzialmente con 5 mL di HCl 0,1 M acquoso; dopo caricamento del campione, le colonnine sono lavate con 4 mL di HCl 0,1 M acquoso e poi con 4 mL di metanolo; gli analiti sono eluiti con 7 mL di miscela ammonio idrossido 30%/metanolo (30/70 v/v); l'eluato è portato a secco in bagnomaria a 60°C in corrente di azoto; il residuo è disciolto in 400 mL di miscela ammonio fosfato monobasico 0,01 M/metanolo (70/30 v/v) e sottoposto ad analisi HPLC. Gli estratti sono stabili a 2-8°C per tre giorni.

## Studio di validazione

La validazione del metodo è stata condotta in accordo ai requisiti della Decisione 2002/657/EC (Commissione Europea, 2002) per i metodi di screening; per tutti gli analiti sono stati verificati i seguenti indici di prestazione: linearità della risposta strumentale, specificità, errore  $\beta$ , capacità di rivelazione

Tabella 1. Condizioni strumentali in cromatografia liquida ad alte prestazioni.

Rivelatore DAD	L=300 nm (width=4 nm); ref. IL=450 nm (width=100 nm)				
Rivelatore FLD	Tempo (min)	$\lambda$ eccitazione (nm)	$\lambda$ emissione (nm)	Range spettro emissione (nm)	Gain
	00.00	290	330	316-400	12
	10.99	290	330	316-400	12
	11.00	290	330	316-400	10
	20.99	290	330	316-400	10
	21.00	290	355	316-450	13
	24.00	290	355	316-450	17
	26.00	290	355	316-450	17
	26.01	290	330	316-400	12
Programma di eluizione a gradiente	Tempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)	
	00.00	80	18	2	
	12.00	70	27	3	
	15.00	60	35	5	
	18.00	47	45	8	
	30.00	20	72	8	
	35.00	80	18	2	
	40.00	80	18	2	

DAD, sequenza di diodi; FLD, spettrofotometria in fluorescenza.

(CC $\beta$ ), robustezza e stabilità degli analiti in solvente e negli estratti. La linearità della risposta strumentale è stata valutata approntando una curva di taratura in solvente, costruita iniettando 3 volte 4 punti di concentrazione degli standards (0,25, 0,5, 1,00 e 2,00 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). La retta area del picco vs concentrazione di analita è stata calcolata mediante l'algoritmo dei minimi quadrati non pesati; mediante la funzione Excel *Reglin* sono stati calcolati i parametri della retta, utilizzati per la valutazione del coefficiente di determinazione ( $R^2$ ), del limite di rilevabilità  $X_a$  (minima concentrazione significativamente diversa da zero) e della significatività dell'intercetta.

La specificità è stata studiata analizzando 24 diversi campioni di fegato e 24 diversi campioni di muscolo delle specie previste dal PNR e verificando l'assenza di interferenti significativi nel range  $\Delta R_t = R_t$  medio dello standard nella curva in solvente  $\pm 2.5\%$   $R_t$ . Le prove di specificità sono state effettuate in diverse sedute analitiche. Le prove per la valutazione dell'errore  $\beta$  sono state effettuate sugli stessi campioni, analizzando, in ciascuna seduta analitica i bianchi campioni e parallelamente i corrispondenti fortificati a 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con tutti gli analiti e con lo SI a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La stabilità delle soluzioni madri è stata valutata per un anno, confrontando i valori ottenuti dalla determinazione eseguita sulla soluzione conservata con i valori ottenuti per soluzioni preparate al momento della determinazione, allo scopo di verificare l'assenza di variazioni significative (-10%) nella risposta strumentale. La robustezza del metodo ai cambiamenti minori è stata valutata applicando l'approccio di Youden (fractional factorial design): una volta individuati i fattori che possono teoricamente influenzare i risultati delle prove, questi vengono variati di un massimo di  $\pm 10\%$  del loro valore nominale. Le variabili considerate nella valutazione della robustezza sono state:

composizione della miscela di estrazione, volume solvente 1° estrazione, concentrazione ammonio idrossido, tempo estrazione in agitatore ad inversione, temperatura evaporazione estratti grezzi, volume di n-esano e temperatura di evaporazione eluato.

## Risultati

### Sviluppo del metodo

Il metodo è stato sviluppato a partire da quello descritto da Caprioli (Caprioli *et al.*, 2010), con alcune modifiche volte a migliorare la specificità, la ripetibilità e il recupero. Il metodo di analisi sviluppato dal laboratorio consente, attraverso una procedura relativamente semplice, di ottenere un efficace grado di purificazione del campione. Partendo da 10 g di tessuto anziché 5 g non si hanno problemi durante la purificazione SPE e si aumenta la sensibilità del metodo. La miscela diclorometano/acetonitrile (35/65 v/v) in ambiente basico e in presenza di sodio solfato anidro ha miglior potere estraente rispetto all'etile acetato o all'acetonitrile. La fase di estrazione non è critica per nessuno degli analiti. La scelta di evaporare il solvente organico di estrazione e riprendere il residuo con una soluzione acquosa acida prima del caricamento in colonne SPE garantisce un miglior controllo del pH e quindi una miglior riproducibilità: il volume ottimale di HCl 0,1 M è 10 mL. L'introduzione di una fase di sgrassatura dell'estratto grezzo con 5 mL di esano produce significativi vantaggi in termini di eliminazione di interferenti di matrice e di aumento del recupero, anche se è penalizzante per il triclabendazolo che, a causa della elevata lipofilia, si ripartisce nell'esano, e, in misura minore, per albendazolo e fenbendazolo. L'utilizzo del petroletere in alternativa all'esano non migliora i recuperi. La fase stazionaria ottimale per la purificazione SPE

risulta essere quella a scambio cationico (SCX). La miscela di ripresa finale ammonio fosfato monobasico 0,01 M a pH 4.8/metanolo (70/30 v/v) consente il miglior recupero degli analiti più lipofili.

La miscela di eluizione HPLC e il gradiente descritti in letteratura consentono un'ottima separazione di tutti gli analiti in un'unica corsa cromatografica (Figura 1). Per ottimizzare la separazione HPLC sono state testate diverse colonne cromatografiche a fase inversa: i risultati migliori sono stati ottenuti con la colonna Phenomenex Gemini NX. L'utilizzo di una colonna HPLC a diametro interno di 3 mm permette un considerevole risparmio di solventi e determina un aumento della risposta strumentale in termini di intensità del segnale, per cui gli analiti possono essere quantificati a livelli di concentrazione molto minori del valore di LMR, ove fissati, in modo da evidenziare anche fenomeni di trattamento non dichiarato nel registro aziendale dei farmaci.

Nella fase di sviluppo metodo sono stati ottimizzati i valori di lunghezza d'onda di assorbimento UV e di eccitazione ed emissione in fluorimetria per ciascun analita: dall'analisi degli spettri di assorbimento UV si evidenzia che il DAD impostato a 300 nm è ottimale per tutti gli analiti e non sono necessari canali di lettura addizionali. Tuttavia la risposta strumentale al rivelatore DAD varia a seconda della molecola: in particolare è molto bassa per albendazolo solfossido, albendazolo solfone, albendazolo e fenbendazolo, che invece rispondono molto bene in fluorimetria in particolari condizioni di eccitazione ed emissione; pertanto l'eluato della corsa cromatografica passa in entrambi i rivelatori e sono registrati i cromatogrammi DAD e FLD; poiché gli strumenti moderni consentono la registrazione dello spettro di assorbimento UV-VIS o di emissione in fluorimetria, tali spettri costituiscono un importante strumento per la conferma del-

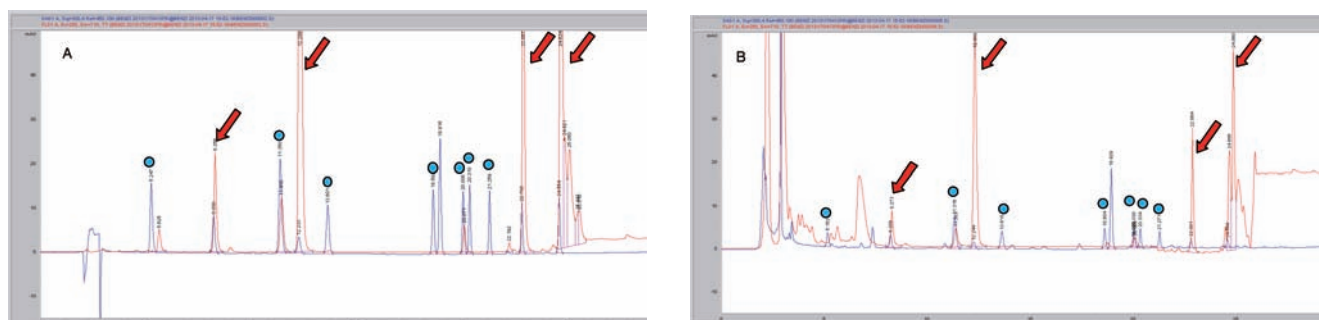


Figura 1. A) Cromatogramma di una soluzione di tutti gli analiti e dello standard interno in solvente. L'ordine di eluizione degli analiti è il seguente: 5-idrossitiabendazolo, albendazolo solfossido, tiabendazolo, albendazolo solfone, fenbendazolo solfossido, fenbendazolo solfone, nocodazolo (standard interno), ossibendazolo, mebendazolo, flubendazolo, albendazolo, fenbendazolo. B) Cromatogramma di un estratto di fegato fortificato con tutti gli analiti a 25 mg/kg e lo standard interno. A, B) I segnali contraddistinti da cerchio blu sono gli analiti da leggere in sequenza di diodi, mentre i segnali indicati con freccia rossa evidenziano gli analiti con miglior risposta in spettrofotometria in fluorescenza.

l'identità della molecola. L'introduzione in ogni seduta analitica di routine di un campione di controllo (fegato o muscolo) fortificato con tutti gli analiti al livello di interesse e l'utilizzo in ogni campione di uno standard interno (SI) di processo costituiscono dei validi strumenti per l'assicurazione della qualità dei risultati quando il metodo è applicato ai controlli ufficiali. Come standard interno è stato scelto il nocodazolo, in quanto questo antineoplastico ha struttura (nucleo benzimidazol-2-carbamato sostituito in 5 con un gruppo tienilcarbonile) e caratteristiche di lipofilia e basicità correlabili a quelle degli analiti. Lo SI è aggiunto al campione prima dell'estrazione per monitorare l'intero processo analitico.

Non sono stati inseriti tra gli analiti ricercati i farmaci della famiglia che in realtà sono prodrugs e per le quali quindi la UE ha stabilito come residui marcatori i loro metaboliti: la netobimina, metabolizzata a albendazolo, e il febantel, che dalla microflora è convertito a fenbendazolo (Barker *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1991; Marti *et al.*, 1990). In riferimento alla via metabolica tipica per albendazolo, flubendazolo e mebendazolo (Danaher *et al.*, 2007), nel residuo marcatore sono compresi i metaboliti finali 2-amino-albendazolo solfene, amino-flubendazolo e idrossi-mebendazolo; purtroppo non è stato possibile includerli nel set analiti in quanto risultavano difficili da reperire in commercio in tempi compatibili con le esigenze di sviluppo metodo del laboratorio.

Non è stato possibile invece inserire nel set analiti triclabendazolo, triclabendazolo solfosido, triclabendazolo solfene e 5-idrossimebendazolo, in quanto, a causa della elevata lipofilia, essi passano in quantità significativa nella fase esanica durante la sgrassatura.

### Studio di validazione

Secondo la normativa comunitaria vigente (Decisione 2002/657/CE; Commissione Europea, 2002) per una prova di screening di tipo qualitativo devono essere obbligatoriamente valutate tre caratteristiche: specificità, capacità di rivelazione (CC $\beta$ ) e robustezza. La capacità di rivelazione (CC $\beta$ ) rappresenta la più bassa concentrazione di analita in un campione realmente contaminato che un metodo è capace di rilevare con una certezza statistica di 1- $\beta$ . L'errore  $\beta$  o errore del II tipo, quantifica la probabilità che il campione sia realmente non conforme anche se risulta conforme alla determinazione analitica (probabilità di prendere una decisione *falsa negativa*). La Decisione 2002/657/CE impone come massima percentuale accettabile di falsi negativi il 5%. Si comprende quindi perché la valutazione del CC $\beta$  sia fondamentale proprio per le analisi di screening, poiché se da un lato il campione *falso positivo* può essere poi correttamente riclassificato dal metodo di conferma, il *falso negativo* porta alla commercializzazione di prodotti contenenti

residui di sostanze che rappresentano un pericolo per la salute pubblica. In questo studio validativo, dei tre possibili approcci indicati nella Decisione 2002/657/CE (Commissione Europea, 2002), è stato adottato quello di analizzare almeno 20 campioni bianchi fortificati a un *livello di interesse*. Questo approccio, adatto per i metodi qualitativi, non consente di definire un valore esatto di CC $\beta$ , ma permette di verificare che il limite per l'errore  $\beta$  al livello di interesse sia rispettato. Il *livello di interesse* sulla base delle prove preliminari è stato fissato alla concentrazione di 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ : questo valore è pari alla metà del valore di LMR più basso fissato in fegato e muscolo.

Per entrambe le matrici considerate l'errore  $\beta$  risulta inferiore al 5% in accordo ai requisiti della Dec. 2002/657/EC (Commissione Europea, 2002). Da queste prove risulta inoltre che il valore del CC $\beta$  è inferiore a 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , per cui il metodo discrimina gli analiti al livello di interesse e quindi è idoneo all'esecuzione di prove di screening su campioni ufficiali. Relativamente alla specificità, non sono stati rilevati interferenti significativi nel range di tempo di ritenzione degli analiti. Il test di Youden ha evidenziato che il metodo risulta robusto, in quanto nessuna delle variabili considerate influenza in modo significativo il risultato. La linearità della risposta strumentale è stata verificata nel range tra 0,25 e 2,00  $\mu\text{L}^{-1}$  per tutti gli analiti. In tutti i casi il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) risulta superiore a 0,999, la dispersione dei fattori di risposta è compresa nel range (Y/X) medio  $\pm 10\%$ , il punto più basso di concentrazione è maggiore del limite di rilevabilità e l'intercetta non è significativamente diversa da zero. Le soluzioni madri risultano stabili per almeno un anno conservate a 2-8°C e gli estratti conservati a 4°C risultano stabili per almeno 3 giorni.

### Discussione e Conclusioni

Il metodo sviluppato permette l'identificazione di residui di benzimidazolici di interesse veterinario e loro metaboliti in fegato e muscolo mediante HPLC con rivelatore DAD e FLD. La procedura definita consente la ricerca degli analiti attraverso tecniche adatte a processare in parallelo più campioni e sufficientemente sensibili da soddisfare i requisiti richiesti dalle norme europee vigenti. Inoltre la strumentazione richiesta, rappresentata da un HPLC con rivelatore DAD e FLD, rientra nella normale dotazione dei laboratori chimici. La semplicità del metodo, i tempi contenuti di esecuzione della prova e i ridotti costi lo rendono utilizzabile per le normali analisi di routine; la validazione rende il metodo idoneo nell'ambito dei controlli ufficiali.

### Bibliografia

- Balitz G, 1999. Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 727:167-77.
- Barker SA, McDowell T, Charkhian B, Hsieh LC, Short CR, 1990. Methodology for the analysis of benzimidazole anthelmintics as drug residues in animal tissues. *J Assoc Off Ana Chem* 73:22-5.
- Caprioli G, Cristalli G, Galarini R, Giacobbe D, Ricciutelli M, Vittori S, Zuo Y, Sagratini G, 2010. Comparison of two different isolation methods of benzimidazoles and their metabolites in the bovine liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–diode array detection. *J Chromatogr A* 1217:1779-85.
- Commissione Europea, 2002. Decisione della Commissione che attua la direttiva n. 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, 2002/657/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 221, 17/08/2002.
- Commissione Europea, 2004. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali, 882/2004/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 165, 30/04/2004.
- Commissione Europea, 2010. Regolamento della Commissione del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale, 37/2010/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 15/1, 20/01/2010.
- Danaher M, De Ruyck H, Crooks SRH, Dowling G, O'Keeffe M, 2007. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J Chromatogr B* 845:1-37.
- Delatour P, Parish R, 1986. Benzimidazole anthelmintics and related compounds: toxicity and evaluation of residues. In: Rico AG, ed. *Drug residues in animals*. Academic Press, Orlando, FL, USA, pp 175-303.
- De Ruyck H, Daeseleire E, De Ridder H, 2001. Development and validation of a liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for mebendazole and its metabolites hydroxymebendazole and aminomebendazole in sheep liver. *Analyst* 126:2144-8.
- De Ruyck H, Daeseleire E, De Ridder H, Van Renterghem R, 2002. Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric

- multiresidue method for anthelmintics in milk. *J Chromatogr A* 976:181-94.
- De Ruyck H, Van Renterghem R, De Ridder H, De Brabander D, 2000. Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. *Food Control* 11:165-73.
- Dowling G, Cantwell H, O'Keeffe M, Smyth MR, 2005. Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver. *Anal Chim Acta* 529:285-92.
- ISO, 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Norma ISO 17025:2005. Organizzazione Internazionale di Standardizzazione, Ginevra, Svizzera.
- Jedziniak P, Szprengier-Juskiewicz T, Olejnik M, 2009. Determination of benzimidazoles and levamisole residues in milk by liquid chromatography-mass spectrometry: screening method development and validation. *J Chromatogr A* 1216:8165-72.
- Marti AM, Mooser AE, Koch H, 1990. Determination of benzimidazole anthelmintics in meat samples. *J Chromatogr* 498:145-57.
- McKellar QA, Scott EW, 1990. The benzimidazole anthelmintic agents: a review. *J Vet Pharmacol Ther* 13:223-47.
- Moreno L, Imperiale F, Alvarez L, Lanusse C, 2005. Comparison of milk residue profiles after oral and subcutaneous administration of benzimidazole anthelmintics to dairy cows. *Anal Chim Acta* 536:91-9.
- Msagati TAM, Nindi MM, 2006. A comparative study of supported liquid membrane and solid phase extraction in the determination of benzimidazole anthelmintics. *Talanta* 69:243-50.
- Rose MD, 1999. A method for the separation of residues of nine compounds in cattle liver related to treatment with oxfendazole. *Analyst* 124:1023-6.
- Stubbings G, Tarbin J, Cooper A, Sharman M, Bigwood T, Robb P, 2005. A multi-residue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. *Anal Chim Acta* 547:262-8.
- Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, Miyazaki T, Oka H, Itoh Y, Nakazawa H, 2000. Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 882:99.
- Wilson RT, Groneck JS, Henry AC, Rowe LR, 1991. Multiresidue assay for benzimidazole anthelmintics by liquid chromatography and confirmation by gas chromatography/selected-ion monitoring electron impact mass spectrometry. *J Assoc Off Ana Chem* 74:56-67.

Non-commercial use only