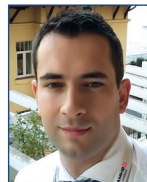


# Halogenirani salicilanilidi - spojevi s protumetiljnim djelovanjem



*Damir Pavliček\*, Marija Denžić Lugomer i Tiana Novosel*

## Sažetak

Klozantel, rafoksanid i oksiklozanid su antiparazitski lijekovi iz skupine salicilanilida sa specifičnim djelovanjem protiv metilja u preživača. Zbog velike sposobnosti vezanja ovih spojeva za albumine u krvnoj plazmi distribucija u tkiva je slaba, što rezultira i znatno manjom koncentracijom u bubrežima, jetri, masti i mišićima. Njihovo je djelovanje je stoga učinkovitije protiv odraslih metilja koji se uglavnom hrane krvlju dok je protiv mlađih stadija parazita, koji se više hrane stanicama jetre, njihova djelotvornost znatno manja. Prema mehanizmu djelovanja klozantel, rafoksanid i oksiklozanid spadaju u vodikove (protonske) ionofore. Narušavanjem gradijenta protona preko unutarnje mitohondrijske membrane selektivno sprečavaju sintezu ATP-a i djeluju kao blokatori procesa oksidativne fosforilacije u metiljima. Zbog nepravilne upotrebe antiparazitskih lijekova (nepoštivanje preporučenih doza ili karencije) dolazi do pojave njihovih rezidua u hrani životinjskog podrijetla i samim time s obzirom na dokazana toksična svojstva koja posjeduju

rizika po ljudsko zdravlje. Budući da klozantel, rafoksanid i oksiklozanid mogu biti dostupni u kombinaciji s drugim antiparaziticima, njihovo određivanje u tkivima uglavnom uključuje razvoj multikomponentnih metoda koje se temelje na selektivnim tehnikama pročišćavanja uzoraka (SPE, QuEChERS) uz osjetljivu detekciju spektrometrijom masa (MS/MS, TOF/MS). U sklopu nacionalnih monitoring programa zemalja Europske unije na rezidue antiparazitskih lijekova u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla, u razdoblju od 2009. do 2019. godine, ovi su spojevi prema Uredbi Komisije (EZ) br. 37/2010 detektirani u koncentracijama višim od dopuštenih. Najviše pozitivnih uzoraka sadržavalo je klozantel, a gledajući samo posljednjih pet godina klozantel, rafoksanid i oksiklozanid zajedno čine gotovo 50 % svih nesukladnih rezultata u uzorcima pretraženim na B2a podgrupu spojeva.

**Ključne riječi:** *salicilanilidi, klozantel, rafoksanid, oksiklozanid, metiljavost, rezidue*

## Uvod

Antiparazitici su jedna od najupotrebljavanijih skupina spojeva u veterinarskoj medicini diljem svijeta.

U prošlosti su se, u svrhu liječenja i suzbijanja parazita, primjenjivali različiti spojevi, čiji su glavni nedostaci bili

Damir PAVLIČEK\*, mag. chem. (dopisni autor, e-mail: pavlicek.vzk@veinst.hr), dr. sc. Marija DENŽIĆ LUGOMER, dipl. ing. kemije, Tiana NOVOSEL, mag. appl. chem., Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Hrvatska

ograničena učinkovitost i velik broj nuspojava. Ove spoznaje potaknule su brojna istraživanja i razvoj novih antiparazitika kao i značajne promjene u propisima o njihovoj primjeni. Istraživanjima se nastojalo razviti antiparazitske lijekove što šireg spektra djelovanja, jeftine, jednostavne primjene i doziranja; sa što manje nuspojava i što kraćom karencijom (Lanusse i Prichard, 1993.). Težilo se da antiparazitik bude i što manje toksičan za domaćina, za osobe koje ga primjenjuju i za okoliš (EC, 2010.a). Danas primjena antiparazitskih lijekova ima važnu ulogu u stočarstvu, no u slučaju njihove nepravilne primjene (nepoštivanja propisanih doza, karencije, načina primjene) može doći do pojave nedopuštene koncentracije rezidua tih lijekova u jestivim tkivima životinje (mišići, jetra, bubrezi, masti) i njezinim proizvodima (mlijeko, jaja). Nadzor nad primjenom antiparazitika u životinja za hranu osigurava kvalitetu i sigurnost njihovih proizvoda.

Prisutnost rezidua djelatnih tvari veterinarsko-medicinskih proizvoda (VMP) ili metabolita tih tvari kao i drugih kemijskih kontaminanata u hrani životinjskog podrijetla može predstavljati opasnost za zdravlje ljudi. Stoga su u Europskoj uniji pa tako i u Hrvatskoj, doneseni propisi o reziduama farmakološki djelatnih tvari u hrani podrijetlom od liječenih životinja. Ovi propisi uključuju i antiparazitske lijekove, njihovu klasifikaciju kao i najveće dopuštene količine (NDK) rezidua u jestivim tkivima, mlijeku i jajima. Europski propisi, koji se odnose na NDK vrijednosti ostataka VMP-a, primjenu VMP-a i karencije, preuzeti su u zakonodavstvo Republike Hrvatske - Uredba EU 37/2010 (EC, 2010b.), Uredba EU 2019/6 (EC, 2019.) i Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima (Zakon, 2008.).

Osim NDK, sukladno Uredbi EU 2019/6 i nacionalnim propisima,

prije stavljanja antiparazitika na tržište, obvezno se provjerava i njihova učinkovitost i neškodljivost uključujući i toksičnost (genotoksičnost, embriotoksičnost, mutagenost, utjecaj na okoliš).

U ovom radu prikazani su literaturni podatci o skupini halogeniranih salicilanilidnih spojeva (klozantel, rafoksanid i oksiklozanid) fasciolicidnog djelovanja. Infestacije prouzročene trematodima, ali i cestodima i nematodima mogu značajno utjecati na proizvodna svojstva ovaca i goveda, a jedna od najznačajnijih parazitoza u preživača je fascioza prouzročena velikim metiljem (*Fasciola hepatica*). Zbog velikog ekonomskog značenja, osim zoohigijenskih i zootehničkih mjera, uključujući i suzbijanje posrednika pužića *Limnea truncatula* (*Galba truncatula*), potrebno je redovito provoditi zdravstveni nadzor i liječenje oboljelih životinja. U svrhu liječenja upotrebljavaju se antiparaziti fasciolicidnog djelovanja. Klozantel, rafoksanid i oksiklozanid su na popisu tvari iz podgrupe B2a (antiparaziti) koje nacionalni referentni laboratoriji, u državama članicama Europske unije moraju uvrstiti u državni program monitoringa rezidua (DPMR) hrane životinjskog podrijetla. U Republici Hrvatskoj odobrena su četiri VMP-a koji sadržavaju klozantel (sam ili u kombinaciji s abamektinom ili ivermektinom) i dva VMP-a koji sadržavaju oksiklozanid. Međutim, na hrvatskom tržištu ovog trenutka nije odobren niti jedan VMP s rafoksanidom.

S obzirom da antiparazitski VMP-i u veterinarskoj medicini uključuju razne skupine kemijskih spojeva i njihove kombinacije (imidazotiazoli, benzimidazoli, makrociklički laktoni, sulfonamidi, salicilanilidi i dr.), koji imaju različite mehanizame djelovanja, razvoj multikomponentnih metoda određivanja njihovih rezidua u hrani predstavlja velik izazov.

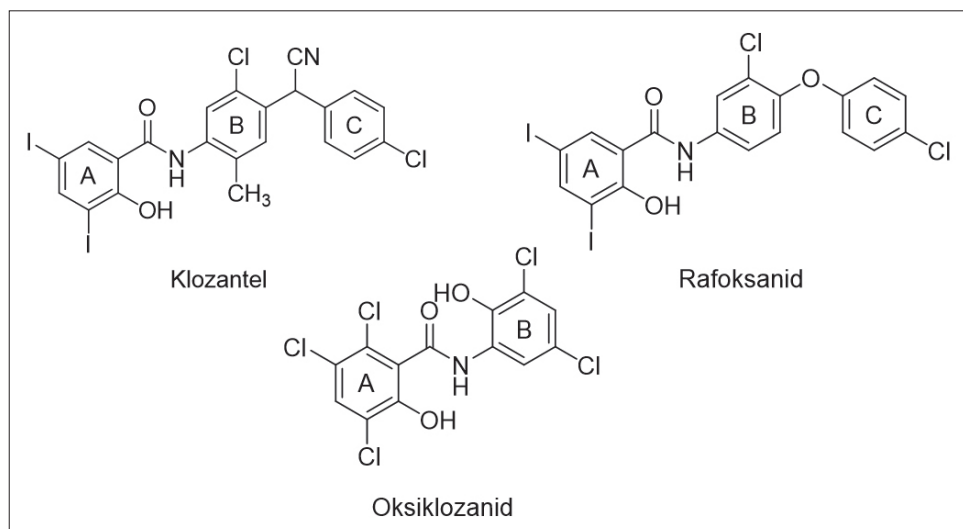
## Halogenirani salicilanilidi

### Fizikalno-kemijska svojstva

Klozantel, rafoksanid i oksiklozanid pripadaju grupi salicilanilida, slabo kiselih fenolnih spojeva čija se osnovna struktura sastoji od prstenova salicilne kiseline (A) i anilida (B) (slika 1.). Pokazalo se da je za protumetiljno djelovanje posjedovanje elektron-odvlačećih skupina na salicilnom i anilidnom prstenu zajedno s nekom lipofilnom molekulom poput *tert*-butila na poziciji 3 odgovoran strukturni kriterij (Lee, 1973.). Ta aktivnost je još veća ukoliko se na anilinskoj strani veže neki arilni lanac, kao što je to u slučajevima rafoksanida i klozantela. Ovisno o raznim supstituentima vezanim na osnovnu jezgru, salicilanilidi se mogu podijeliti na brojne načine, kao što su: halogenirani i nehalogenirani salicilanilidi, acetilsalicilanilidi, diklorosalicilanilidi i benzoilsalicilanilidi. Svi salicilanilidi koji se koriste kao antiparazitici u liječenju životinja su halogenirani pa tako i klozantel, rafoksanid i oksiklozanid.

Osim antiparazitskog, proučavano je i njihovo antibakterijsko (Delavenne i sur., 2016.) pa čak i antivirusno djelovanje protiv varijanti SARS-CoV-2 virusa (Blake i sur., 2021.). Pritom je uočeno da se efikasnost salicilanilida, za razliku od fasciolicidnog djelovanja, smanjuje dodavanjem elektron-odvlačećih skupina na anilidnom prstenu.

Dva aromatska prstena salicilanilidne skupine su, otprilike, koplanarna s plošnim kutom između njih. Međuatomske duljine veza unutar osnovne jezgre su konzistentne gledajući različite halogenirane salicilanilide, dok su razlike u konformaciji značajne što se tiče njihove kristalne forme, s time da kristalna forma klozantela nikad nije objavljena. Polimorfni oblici salicilanilida istraženi su na primjeru oksiklozanida difrakcijom X-zraka na prahu, pri čemu je uočeno promjenjivo ponašanje za topljivost u vodi i stabilnost u suspenziji, vrlo vjerojatno zbog apsorbiranih nečistoća (Pearson i Varney, 1973.).



**Slika 1.** Kemijska struktura halogeniranih salicilanilida koji se koriste kao antiparazitici protiv metiljavosti u životinja

## Farmakološka svojstva

Posljednjih godina učinjen je znatan napredak u razumijevanju farmakokinetičkih i metaboličkih pravila za antiparazitske lijekove koji se primjenjuju u veterinarskoj medicini. Zahvaljujući učinkovitim ekstrakcijama i suvremenim metodama analiza, koncentracije djelatnih tvari i njihovih metabolita mogu biti u različitim biološkim uzorcima precizno određene. Koncentracije rezidua djelatnih tvari i njihovih metabolita, osim o vrsti životinja, ovise o dozi lijeka i načinu primjene. Propisane doze antiparazitika mogu se preživačima aplicirati oralno, parenteralno ili epidermalno, odnosno intraruminalno pomoću naprave za kontrolirano otpuštanje lijeka (Lanusse i Prichard, 1993.). U nekim je slučajevima slaba topljivost djelatnih tvari u vodi bila glavno ograničenje u dizajnu stabilne, neiritirajuće formulacije lijeka za parenteralnu primjenu. Stoga se većina antiparazitika u obliku otopine ili suspenzije daje oralno (ulijevanjem kroz usta), u hrani (granule, prašak), vodi za piće za grupnu terapiju životinja na farmi. U slučajevima liječenja veće skupine životinja postoji mogućnost nejednakog konzumiranja hrane ili vode s lijekom što može prouzročiti subdoziranje i neučinkovitost lijeka, ali i pojavu rezistencije parazita na antiparazitik. Način primjene može, osim na učinkovitost, utjecati i na nastanak nuspojava.

## ADME

Halogenirani salicilanilidi, što se tiče načina djelovanja, farmakokinetike i toksičnosti, općenito dijele zajednička svojstva što je izravno povezano s njihovom antiparazitskom aktivnošću. Salicilanilidi klozantel, rafoksanid i oksiklozanid djelotvorni su u liječenju jetrenih i crijevnih trematoda u životinja. Farmakokinetika im je najviše istražena u preživača i to u ovaca i goveda.

Uočeno je da ovi lijekovi imaju velik afinitet vezanja za proteine u plazmi (> 99 %) i dugo poluvrijeme izlučivanja ( $T_{1/2}^{el}$ ) (Prichard i sur., 1985., Michiels i sur., 1987., Mohammed-Alli i Bogan, 1987.). Navedene tvari pokazuju veliku aktivnost protiv odraslih metilja, nešto slabiju učinkovitost za nezrele metilje starosti 6 do 8 tjedana, a protiv mlađih stadija su slabo učinkoviti (Boray i sur., 1997.). Oralnim unosom rafoksanida i klozantela u preživača maksimalna koncentracija u plazmi postignuta je nakon 24 do 48 h (Swan i Mülders, 1993., Swan i sur., 1995.), dok je za klozantel, apliciran intraruminalno, objavljeno postizanje maksimalne koncentracije u plazmi tek nakon 65 sati, što ukazuje na sporu apsorpciju lijeka unesenim na taj način (Hennessy i sur., 1993.). Brzina gastrointestinalne apsorpcije klozantela vjerojatno zbog sporije probave sporija je u koza nego ovaca. U preživača, bioraspoloživost klozantela i rafoksanida oralnim putem otprilike je 50 % manja u odnosu na intramuskularnu aplikaciju (Michiels i sur., 1987.). Brzina i opseg apsorpcije klozantela ne ovisi o primjenjenoj dozi lijeka, što je vidljivo iz istraživanja na govedima i ovcama aplikacijom 5 mg/kg intramuskularno, ili 10 mg/kg oralno. Halogenirani salicilanilidi imaju izniman afinitet vezanja za albumine u plazmi, no slabo se distribuiraju u tkiva. Michiels i sur. (1987.) su u svom istraživanju uočili da je koncentracija klozantela u plazmi 6 do 7 puta veća od one u plućima i bubrezima, 9 do 12 puta veća nego u srcu i jetri, 30 puta veća nego u mišiću i čak 100 puta veća nego u masti. U slučaju rafoksanida, koncentracija lijeka je oko 17 puta veća u plazmi nego u jetri. Promatrajući koncentracije klozantela i rafoksanida u žuči zabilježene su i manje količine aktivne tvari u odnosu na plazmu, 35 % za rafoksanid, odnosno 50 % u slučaju klozantela (Mohammed-Alli i Bogan, 1987.). Vezanje klozantela, rafoksanida i

oksiklozanida za albumin u plazmi (>97 %) karakteriziran je velikim afinitetom i kapacitetom, dok je znatno manje vezanje za eritrocite (4 %) i vodu (1 %). Upravo to iznimno vezanje za albumine u plazmi odgovorno je za dugo poluvrijeme izlučivanja ovih spojeva.  $T_{1/2el}$  za klozantel i rafoksanid je 2 do 3 tjedna, a za oksiklozanid 6 dana u ovaca neovisno o načinu aplikacije lijeka i dozi (Hennessy i sur., 1993.) Također, postoji korelacija  $T_{1/2el}$  salicilanilida sa smanjenjem razine albumina u plazmi na koji su vezani, a iznosi oko 16,6 dana (Mohammed-Alli i Bogan, 1987.). Ovo je isto tako moguć put kojim su paraziti izloženi lijeku s obzirom da su koncentracije klozantela i rafoksanida primjetno niže u žuči u odnosu na plazmu. Za odrasle metilje, na koje salicilanilidi imaju izrazito djelovanje, poznato je da se većinom hrane krvlju. S druge strane, slaba aktivnost oksiklozanida, koji se također najvećim dijelom veže za proteine krvi, protiv nezrelih stadija *F. hepatica* dolazi zbog toga što se nezreo metilj radije hrani stanicama jetre nego krvlju (McKellar i Kinabo, 1991.).

Salicilanilidi se slabo metaboliziraju u organizmu, a izlučuju se uglavnom nepromijenjeni iz bioloških sustava. Halogenirani salicilanilidi ne metaboliziraju se konjugacijom s glutationom. Samo 1,0 do 2,5 % rafoksanida metabolizira se u jetri goveda, a oko 90 % klozantela izlučuje se u ovaca i goveda nepromijenjeno izmetom i urinom (Michiels i sur., 1987.). Reduktivna monodejodinacija je glavni metabolički put klozantela koji u ovaca rezultira stvaranjem 3- i 5-monojodklozantel izomera. Monodejodinacija nije prilikom metaboličke razgradnje rafoksanida promatrana, već se amidnom hidrolizom prevodi u 3,5-dijodsalicilnu kiselinu koja je pronađena u krvi, mlijeku i mišićju goveda (Dedek i sur., 1978.). Amidna hidroliza klozantela nije vjerojatna zbog steričkih smetnji od supstituenta

u *ortho* položaju prema amidnoj vezi. Metabolička dehalogenacija oba atoma joda kod dijodsalicilanilidnih derivata nije proučavana. Klozantel se uglavnom izlučuje putem fecesa. U osmotjednoj studiji u ovaca primjećeno je kako se više od 80 %  $^{14}C$ -klozantela izlučilo putem fecesa, a manje od 0,5 % putem urina (Michiels i sur., 1987.). Unutar 48 sati od primjene lijeka 43 % oralno i 10 % intramuskularno aplicirane doze izlučeno je fecesom, a nakon toga se izlučivanje usporilo i bilo oko 1 do 2 % aplicirane doze dnevno. Poluvrijeme izlučivanja klozantela fekalnim putem bilo je 15,9 do 23 dana, što je usporedivo s izlučivanjem oralno apliciranog rafoksanida urinom u ovaca, odnosno mlijekom u goveda (Dedek i sur., 1978.). Međutim, nema podataka o izlučivanju rafoksanida fecesom i žuči.

Salicilanilidi su relativno sigurni spojevi sa sigurnosnim faktorima otprilike 3 do 6 puta većim od preporučenih razina doziranja (Adams, 1995.). Nakon jednokratne primjene 58 mg/kg rafoksanida u goveda, odnosno 45 mg/kg u ovaca, nisu zabilježeni neželjeni učinci (Swan i Schröder, 1981.), ali je primjećena toksičnost u janjadi koja su navodno tretirana preporučenim dozama ove aktivne tvari (Pienaar, 1977.). Klozantel je primjenjen ovcama svakih 4 tjedna tijekom 40 tjedana primjenjujući doze 10 ili 40 mg/kg oralno, odnosno 5 ili 20 mg/kg intramuskularno te također nisu zabilježeni nikakvi štetni učinci (Adams, 1995.). Klasični znaci toksičnosti salicilanilidima uključuju: sljepoću, parezu i smrt. Prvi znaci trovanja pojavljuju se unutar 24 do 72 sata od liječenja (Prozesky i Pienaar, 1977.), no u ovaca kojima je oralno aplicirana 40 puta veća doza rafoksanida od preporučene, znaci su primjećeni isti dan (Odiawo i sur., 1991.). Iako se klozantel ne koristi u humanoj medicini (kontraindiciran je), Tabatabaei i sur. (2016.) opisali su slučaj trovanja osobe nakon nenamjerne

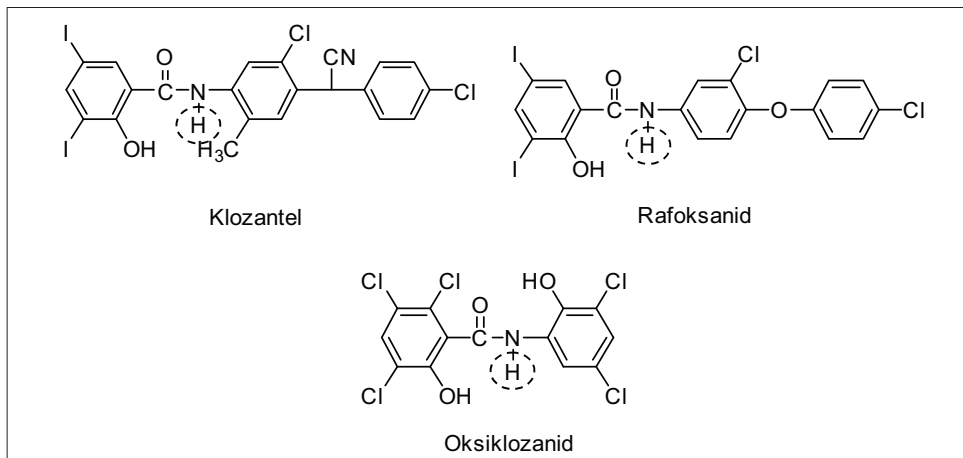
konzumacije 3 tablete klozantela od 500 mg. Posljedice trovanja bile su trajno oštećenje središnjeg živčanog sustava, očnog živca i mrežnice.

### Mehanizam djelovanja

Sve veća primjena sredstava za suzbijanje parazita dovela je do povećanja rezistencije na antiparazitike (Prichard, 1994.). Ukoliko je rezistencija dokazana na određeni antiparazitski lijek, velika je vjerojatnost da će drugi antiparazitik s istim mehanizmom djelovanja biti isto tako nedjelotvoran. Stoga je bitno razumjeti načine djelovanja antiparazitika kako bi se odabrali učinkoviti lijekovi protiv određenih parazita. Prema mehanizmu djelovanja ova skupina lijekova protiv metiljavosti spada u vodikove (protonske) ionofore. Primarno djelovanje salicilanilida općenito je objašnjeno kao inhibiranje transporta elektrona u procesu oksidativne fosforilacije, što je i dokazano praćenjem metaboličkih promjena u *in vitro* i *in vivo* studijama, kao što su potaknuta potrošnja kisika, povećan unos glukoze, smanjena količina glikogena, povećanje omjera oksaloacetat/malat i smanjena sinteza ATP-a (Fairweather i Boray,

1999.). Salicilanilidi su otprilike  $10^3$ - $10^4$  puta moćniji u inhibiranju oksidativne fosforilacije od dinitrofenola koji se ranije upotrebljavao u ove svrhe (Williamson i Metcalf, 1967.). Iz kemijske strukture salicilanilida vidljivo je da sve molekule imaju odvojiv proton (Slika 2.).

Tosu vrlo lipofilne molekule koje mogu premještati protone preko membrana, a posebice unutarnje mitohondrijske membrane (Martin, 1997.). Dodatkom molekula koje narušavaju gradijent protona selektivno se sprječava uporaba kemijske energije dobivene prijenosom elektrona za čistu fosforilaciju ADP-a u ATP, što u konačnici oslobađa stanicu njezinog normalnog izvora energije (Skuce i Fairweather, 1990.). U studijama klozantela, rafoksanida i oksiklozanida primjećeno je kako djeluju na pokretljivost i strukturu *F. hepatica* pri čemu dolazi do ubrzane spastične paralize metilja, otpadanja tegumenta (pokrovno tijelo metilja) i deformacije mitohondrija (Fairweather i sur., 1984.). Iako se ove promjene pripisuju prekidanju oksidativne fosforilacije, razlog povećanom tonusu mišića mogao bi biti povećani broj kalcijevih iona u mišićnim stanicama metilja. Klozantel ubrzano



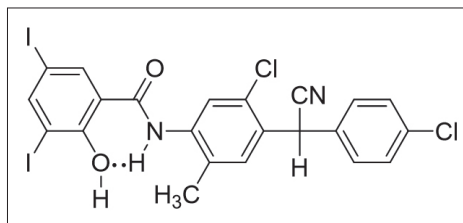
Slika 2. Kemijske strukture klozantela, rafoksanida i oksiklozanida s obilježenim odvojivim protonom

smanjuje pH vrijednost tegumenta u *F. hepatica* pri nižim koncentracijama od onih koji utječu na koncentraciju ATP-a, što smanjuje pokretljivost parazita (Pax i Bennett, 1989.). Zaključeno je da je klozantel membranski aktivna molekula koja može djelovati na brojne biokemijske i fiziološke procese, osjetljive na promjene pH unutar tegumenta, a mjesto djelovanja proton-ionofora je tegument, a ne mitohondriji kako se pretpostavljalo.

## Metode određivanja rezidua salicilanilida u hrani životinjskog podrijetla

Pročišćavanje uzoraka zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava raznih spojeva te složenosti bioloških matrica iz kojih ih je potrebno ekstrahirati predstavlja glavni izazov u razvijanju analitičkih postupaka za određivanje rezidua veterinarsko-medicinskih proizvoda u hrani životinjskog podrijetla. Ekstrakcija rezidua veterinarskih lijekova iz životinjskog tkiva se provodi (uglavnom) organskim otapalom uz pročišćavanje razdjeljenjem u sustavu tekućina-tekućina i/ili ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE). Takav način pripreme uzoraka koristio je i Stoev (1998.) za određivanje klozantela u plazmi i tkivima. Nakon ekstrakcije acetonitrilom provedeno je dodatno uklanjanje interferencija matrice ekstrakcijom na čvrstom nosaču kolonama punjenim česticama polarnog anorganskog materijala silikagela na kojeg su vezani lanci *n*-oktadodecila (C18). U svrhu razvoja osjetljivije i selektivnije HPLC metode za određivanje klozantela od onih u kojima se koristi UV detektor, primjenjen je fluorescentni detektor (FLD) s obzirom da su primjećena fluorescentna svojstva ovog spoja bez derivatizacije pri nižim pH vrijednostima. Pritom se formira šesteročlani prsten intramolekulskim vodikovim vezama

između kisika hidroksilne skupine i vodika amidne skupine (Slika 3.). Fluorescencija klozantela ovisi o pH i formiranju ovog šesteročlanog prstena, a to je rezultiralo postizanjem znatno niže granice detekcije fluorescentnim detektorom u odnosu na UV detektor.



Slika 3. Šesteročlani prsten formiran vodikovom vezom

UV i FLD detektori, u početku najčešće korišteni za detekciju antiparazitika, kao nedostatak imaju opsežno pročišćavanje ekstrakata, detekciju ograničenog broja analita te sklonost sadržavanju interferencija. Fluorescentna detekcija često zahtijeva i derivatizaciju analita, stoga se u posljednjih nekoliko godina, s razvojem novih tehnologija, kvalitativno i kvantitativno određivanje rezidua veterinarskih lijekova gotovo u potpunosti izvodi korištenjem tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (UHPLC-MS/MS) ili tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz masenu detekciju analizatorom vremena leta (UHPLC-TOF/MS). U velikom broju objavljenih radova koristi se i disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi (dSPE) ili QuEChERS (engl. *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) metoda umjesto tradicionalne SPE verzije. Ovaj pristup osim što pojednostavljuje analizu i smanjuje njezino vrijeme, vrlo je fleksibilan pa su moguće razne modifikacije ovisno o analitima i matricama koje se obrađuju.

Kinsella i sur. (2009.) objavili su prvi rad određivanja rezidua u biološkim uzorcima koji je obuhvatio većinu antiparazitskih lijekova ( $n=38$ ) u jednoj multikomponentnoj metodi. Metoda je razvijena na uzorcima kravljeg mlijeka i jetre koristeći LC-MS/MS tehniku uz pripremu uzoraka modificiranom QuEChERS metodom. Da bi se postiglo osjetljivo određivanje svih analita koji ioniziraju u pozitivnom načinu ionizacije elektroraspršenjem (ESI+) odnosno negativnom načinu ionizacije elektroraspršenjem (ESI-) bilo je potrebno dvostruko injektiranje svakog ekstrakta što je dovelo do ukupnog vremena snimanja jednog uzorka od čak 30 min ( $2 \times 15$  min). Optimizacijom metode, za pokretnu fazu je odabrana kombinacija amonijevih soli, amonijev acetat (A) i amonijev formijat (B), kojom je porastao intenzitet signala negativno ioniziranih analita, među koje pripadaju i klorantel, rafoksanid i oksiklozanid. Ustanovljeno je i kako u dSPE koraku pročišćavanja uzoraka, uporaba C18 sorbensa daje više analitičke povrate za ESI- analite od onih dobivenih sa sorbensom s primarnom i sekundarnom amino skupinom (PSA) ili kombinacijom PSA i C18. U slučaju pozitivne ionizacije PSA je najbolji izbor. Ubrzo nakon toga objavljena je nova metoda određivanja rezidua antiparazitika u mlijeku koristeći UHPLC-MS/MS s brzom izmjenom polarosti da bi se jednim injektiranjem detektirali svi analiti (pozitivan i negativan mod) u vremenu snimanja od 13 minuta (Whelan i sur., 2010.). Metoda je dodatno optimizirana na matriksu jetre goveda, gdje su odlučili razdvojiti dSPE korak pročišćavanja uzoraka ovisno o analitima koji se određuju pri višim (NDK), odnosno nižim koncentracijama (vrlo niski ili bez propisane NDK) (Kinsella i sur., 2010.). Detekcija analita u tragovima i postizanje što bolje linearnosti kod kalibracijskih krivulja negativno ionizirajućih spojeva zahtijevalo je razvijanje ovakve

metode s dvojnou validacijom. Važan utjecaj na povećanje osjetljivosti, tj. omjera signala i šuma (S/N) analita u niskim koncentracijama ima i uporaba dimetilsulfoksida (DMSO), u kojem je analit zadržan prilikom uparavanja acetonitrila, a rezultira mnogo oštrijim kromatografskim pikovima. LC-MS/MS metodu za određivanje rezidua čak 128 antiparazitskih lijekova u mesu objavili su Wei i sur. (2015.). Odabравši matrice kokošnjeg, svinjskog i govedjeg mesa, razvili su i validirali metodu koja se temelji na QuEChERS pročišćavanju uzoraka pri čemu je bilo potrebno optimizirati nekoliko parametara kako bi se postigli odgovarajući uvjeti za pouzdanu detekciju širokog spektra ciljanih analita koji posjeduju različita kemijska svojstva (lipofilnost, hidrofilnost, bazična ili kiselinska svojstva i dr.). Anumol i sur. (2016.) su u svom radu uspoređivali dvije različite metode pročišćavanja uzoraka, koji su potom analizirani UHPLC instrumentima uz masenu detekciju s trostrukim kvadrupolom (QQQ), odnosno kombinacijom kvadrupola i analizatora vremena leta (Q-TOF). Radom je obuhvaćeno više od 120 veterinarskih lijekova kojima su obogaćena tkiva goveda (bubrezi, jetra i mišićje) na koncentracijske razine od interesa. Metode pročišćavanja uzoraka temeljile su se na ekstrakcijama QuEChERS tipa uz dodatno pročišćavanje EMR-L kitom za uklanjanje lipida u prvom slučaju, odnosno dSPE i C18 u drugom slučaju. Usporedbom ovih dvaju načina pripreme uzoraka, srednje vrijednosti povrata kretale su se između 70 i 120 % u tkivima goveda za 80 % ciljanih analita. Svaka je metoda, ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima određivanih tvari pokazala određene prednosti. Analize provedene QQQ i Q-TOF detekcijom dale su vrlo slične rezultate. Pri optimalnim uvjetima QQQ-a postižu se niže granice kvantifikacije za ciljane analite, dok Q-TOF tehnika visoke rezolucije ima



veću selektivnost i omogućuje praćenje velikog broja tvari, uključujući i one neciljane.

## Kontrola rezidua halogeniranih salicilanilida u hrani životinjskog podrijetla

Nacionalni programi monitoringa rezidua veterinarsko-medicinskih lijekova i ostalih kontaminanata u životinjama i njihovim proizvodima provode se na godišnjoj razini u svim zemljama članicama Europske unije (EU). Takve kontrole uključuju multikomponentne metode pretraživanja uporabom najsuvremenijih i vrlo osjetljivih analitičkih tehnika sa svrhom nedvojbene detekcije i kvantifikacije ovih tvari i u vrlo niskim koncentracijama (*ppb* područje).

Za brojne antiparazitike pa tako i halogenirane salicilanilide u mlijeku i jestivim tkivima (mišićju, jetri, bubregi, masti) koja se smatraju hranom, propisane su najveće dopuštene koncentracije rezidua (NDK) s ciljem smanjenja rizika za ljudsko zdravlje. Sukladnost analiziranih uzoraka provjerava se usporedbom rezultata s propisanim NDK vrijednostima za svaku tvar navedenu u Tabeli 1. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*) prikuplja i obrađuje rezultate nacionalnih monitoringa svih država EU te iste objavljuje u svojim godišnjim izvješćima. Tako je u razdoblju od 2009. do 2019. godine klozantel najviše puta detektiran u analiziranim uzorcima, uglavnom u tkivima ovaca i koza (EFSA, 2011. do EFSA, 2021.). U posljednjih pet godina klozantel, rafoksanid i

**Tabela 1.** Propisane NDK vrijednosti za klozantel, oksiklozanid i rafoksanid (EC, 2010.b)

Farmakološki djelatna tvar	Marker	Vrsta životinje	NDK $\mu\text{g}/\text{kg}$	Ciljno tkivo	Napomene
Klozantel	Klozantel	Govedo	1000	Mišić	Ne primjenjuje se u životinja čije se mlijeko koristi za hranu
			3000	Mast	
			1000	Jetra	
			3000	Bubreg	
		Ovca	1500	Mišić	
			2000	Mast	
Oksiklozanid	Oksiklozanid	Svi preživači	1500	Jetra	
			5000	Bubreg	
			20	Mišić	
			20	Mast	
			100	Bubreg	
Rafoksanid	Rafoksanid	Govedo	10	Mlijeko	Ne primjenjuje se u životinja čije se mlijeko koristi za hranu
			30	Mišić	
			30	Mast	
			40	Bubreg	
		Ovca	100	Mišić	
			250	Mast	
			150	Jetra	
			150	Bubreg	
			150	Bubreg	

oksiklozanid zajedno čine gotovo 50 % svih nesukladnih rezultata u uzorcima pretraženim na B2a podgrupu spojeva.

Godišnja izvješća monitoringa EFSA-e pružaju informacije o određenom broju rezidua antiparazitskih lijekova u hrani koji su prisutni u koncentracijama iznad NDK. Međutim, malo je dostupnih podataka o dugotrajnom izlaganju potrošača velikom broju antiparazitika u koncentracijama ispod NDK. Jedno takvo istraživanje (Cooper i sur., 2012.) provedeno je u sklopu projekta *ProSafeBeef*, kojim su prikupljeni podatci o izloženosti Europljana na potencijalno štetne rezidue lijekova u uzorcima govedeg mesa prikupljenog iz mjesnih trgovina u sedam europskih zemalja (Francuska, Španjolska, Slovenija, Irska, Italija, Belgija i Portugal). Od 1061 analiziranog uzorka, 26 (2,45 %) ih je sadržavalo rezidue antiparazitika u koncentracijama 0,2-171 µg/kg, no niti jedan od njih nije bio iznad NDK razine. Među detektiranim bili su i klozantel i rafoksamid, koji je zabilježen u najvišoj koncentraciji, u odnosu na propisanu NDK vrijednost (28,6 µg/kg; NDK=30 µg/kg).

## Literatura

- ADAMS, H. R. (1995): Veterinary pharmacology and therapeutics. Iowa State University Press: Ames.
- ANUMOL, T., S. J. LEHOTAY, J. STEVENS and J. ZWEIGENBAUM (2016): Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 2639-2653. 10.1007/s00216-017-0208-y
- BLAKE, S., N. SHAABANI, L. M. EUBANKS, J. MARUYAMA, J. T. MANNING, N. BEUTLER, S. PAESSLER, H. JI, J. R. TEIJARO and K. D. JANDA (2021): Salicylanilides Reduce SARS-CoV-2 Replication and Suppress Induction of Inflammatory Cytokines in a Rodent Model. *ACS Infect. Dis.* 7, 2229-2237. 10.1021/acsinfectdis.1c00253
- BORAY, J. C., V. SLUYTER, N. J. CAMPBELL and A. MCKINNON (1997): Resistance of immature and adult *Fasciola hepaticata* to triclabendazole in the field. Proceedings of the 16th International Conference of the WAAVP, Sun City, 10.
- COOPER, K. M., M. WHELAN, D. G. KENNEDY, G. TRIGUEROS, A. CANNAPAN, P. E. BOON, D. WAPPEROM and M. DANAHER (2012): Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. *Food. Addit. Contam. Part A.* 29, 746-760. 10.1080/19440049.2011.653696
- DEDEK, W., R. GRAHL, H. SCHWARZ and P. LUDWIG (1978): Metabolism, residue and excretion of the anthelmintic 131I-rafoxanide in blood, milk, meat and urine of lactating cows. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 32, 951-955.
- DELAVENNE, E. F. A., D. J. J. SIMON, M. O. A. SOMMER and R. V. TOFT-KEHLER (2016): Antibacterial use of halogenated salicylanilides. WO/2016/038035.
- EC (2010a): Directive 2010/84/EU of the European Parliament and of the Council of 15 December 2010 amending, as regards pharmacovigilance, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. *Off. J. Eur. Union.* L348, 74-99.
- EC (2010b): Council Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Union.* L15, 1-72.
- EC (2019): Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. *Off. J. Eur. Union.* L4, 43-167.
- EFSA (2011): Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 158, 1-70.
- EFSA (2012): Report for 2010 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications EN-212, 1-65.
- EFSA (2013): Report for 2011 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 158, 1-70.
- EFSA (2014): Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications EN-540, 1-65.
- EFSA (2015): Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications EN-723, 1-69
- EFSA (2016): Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications EN-923, 1-70.
- EFSA (2017): Report for 2015 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product

- residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 14(11):EN-1150, 1-69. 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1150
18. EFSA (2018): Report for 2016 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications EN-1358, 1-75.
  19. EFSA (2019): Report for 2017 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting publication EN-1578, 1-88.
  20. EFSA (2020): Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting publication EN-1775, 1-74.
  21. EFSA (2021): Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting publication EN-1997, 1-82.
  22. FAIRWEATHER, I., S. D. HOLMES and L. T. TREADGOLD (1984): Fasciola hepatica: motility response to fasciolicides in vitro. *Exp. Parasitol.* 57, 209-224. 10.1016/0014-4894(84)90094-8
  23. FAIRWEATHER, I. and J. C. BORAY (1999): Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *Vet. J.* 158, 81-112. 10.1053/tvjl.1999.0377
  24. HENNESSY, D. R., N. C. SANGSTER, J. W. STEEL and G. H. COLLINS (1993): Comparative pharmacokinetic disposition of closantel in sheep and goats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 16, 254-260. 10.1111/j.1365-2885.1993.tb00172.x
  25. KINSELLA, B., S. J. LEHOTAY, K. MASTOVSKA, A. R. LIGHTFIELD, A. FUREY and M. DANAHER (2009): New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 637, 196-207. 10.1016/j.aca.2008.10.072
  26. KINSELLA, B., M. WHELAN, H. CANTWELL, M. MCCORMACK, A. FUREY, S. J. LEHOTAY and M. DANAHER (2010): A dual approach to detect anthelmintic residues in bovine liver over an extended concentration range. *Talanta* 83, 14-24. 10.1016/j.talanta.2010.08.025
  27. LANUSSE, C. E. and R. K. PRICHARD (1993): Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123-158. 10.1016/0304-4017(93)90115-4
  28. LEE, R. M. (1973): The relationship between biological action and structure of some fasciolicidal salicylanilides. *Parasitol.* 67, 13-14.
  29. MARTIN, R. J. (1997): Modes of Action of Anthelmintic Drugs. *Vet. J.* 154, 11-34. 10.1016/S1090-0233(05)80005-X
  30. MCKELLAR, Q. A. and L. B. KINABO (1991): The pharmacology of flukicidal drugs, *Br. Vet. J.* 147, 306-321. 10.1016/0007-1935(91)90003-6
  31. MICHIELS, M., W. MEULDERMANS and J. HEYKANS (1987): The metabolism and fate of closantel (Flukiver) in sheep and cattle. *Drug Metab. Rev.* 18, 235-251. 10.3109/03602538708998307
  32. MOHAMMED-ALI, N. A. K. and J. A. BOGAN (1987): The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxcyclosanide. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 10, 127-133. 10.1111/j.1365-2885.1987.tb00089.x
  33. ODIAWO, G. O., J. S. OGAA, J. NDIKUWERA and J. E. MOULTON (1991): Acute amaurosis in sheep due to rafoxanide neurotoxicity. *Zimbabwe Vet. J.* 22, 64-99.
  34. PAX, R. A. and J. L. BENNETT (1989): Effect of closantel on intrategumental pH in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 5, 169-171. 10.2307/3282962
  35. PEARSON, J. T. and G. VARNEY (1973): The anomalous behaviour of some oxyclozanide polymorphs. *J. Pharm. Pharm.* 25, 62-70.
  36. PIENAAR, J. G. (1977): Newer veterinary neuropathological conditions in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 48, 13-18.
  37. PRICHARD, R. K. (1994): Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 54, 259-268. 10.1016/0304-4017(94)90094-9
  38. PRICHARD, R. K., D. R. HENNESSY, J. W. STEEL and W. LACEY (1985): Metabolite concentrations in plasma following treatment of cattle with five anthelmintics. *Res. Vet. Sci.* 39, 173-178. 10.1016/S0034-5288(18)31741-7
  39. PROZESKY, L. and J. G. PIENAAR (1977): Amaurosis in sheep resulting from treatment with rafoxanide. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 44, 257-260.
  40. SKUCE, P. J. and I. FAIRWEATHER (1990): The effect of the hydrogen ionophore closantel upon the pharmacology and ultrastructure of the adult liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* Res. 76, 241-250. 10.1007/BF00930821
  41. STOEV, G. (1998): Determination of closantel residues in plasma and tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 710, 234-238. 10.1016/S0378-4347(98)00114-5
  42. SWAN, G. E. and J. SCHRÖDER (1981): A safety trial with rafoxanide in sheep. *J. S. Af. Vet. Ass.* 2, 123-125.
  43. SWAN, G. E. and M. S. G. MÜLDERS (1993): Pharmacokinetics of rafoxanide in suckling and weaned lambs following oral administration. *J. S. Af. Vet. Ass.* 64, 67-70.
  44. SWAN, G. E., C. J. BOTHA, J. H. TAYLOR, M. S. G. MÜLDERS, P. P. MINNAAR and A. KLOECK (1995): Differences in the oral bioavailability of three rafoxanide formulations in sheep. *J. S. Af. Vet. Ass.* 66, 197-201.
  45. TABATABAEI, S. A., M. SOLEIMANI, M. R. MANSOURI, A. MIRSHAHI, B. INANLOU, M. ABRISHAMI, A. R. PAHRAH and H. MASARAT (2016): Closantel; a veterinary drug with potential severe morbidity in humans. *BMC Ophthalmol.* 16, 207-211. 10.1186/s12886-016-0387-x
  46. WEI, H., Y. TAO, D. CHEN, S. XIE, Y. PAN, Z. LIU, L. HUANG and Z. YUAN (2015): Development and validation of a multi-residue screening method for

- veterinary drugs, their metabolites and pesticides in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A*. 32, 686-701. 10.1080/19440049.2015.1008588
47. WHELAN, M., B. KINSELLA, A. FUREY, M. MOLONEY, H. CANTWELL, S. J. LEHOTAY and M. DANAHER (2010): Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching. *J. Chromatogr. A*. 1217, 4612-4622. 10.1016/j.chroma.2010.05.007
48. WILLIAMSON, R. L. and R. L. METCALF (1967): Salicylanilides: A new group of active uncouplers of oxidative phosphorylation. *Science* 58, 1694-1695. 10.1126/science.158.3809.1694
49. Zakon (2008): Zakon o veterinarsko-medicinskim proizvodima. Narodne novine br. 84.

## Halogenated salicylanilides - flukicide drugs

Damir PAVLIČEK, M. Chem., Marija DENŽIĆ LUGOMER, Grad. Eng. Chem., PhD, Tiana NOVOSEL, MS, Applied Chemistry, Croatian Veterinary Institute, Veterinary Institute Križevci, Križevci, Croatia

Closantel, rafoxanide and oxcyclozanide are anthelmintic agents, classified as salicylanilides, with fasciolicidal activity in ruminants. Due to their extensive plasma protein binding, they are poorly distributed to tissues, resulting in several-fold lower concentrations detected in kidney, liver, fat and muscle. They are much more effective against adult liver flukes, which are known to feed mainly on blood, than against immature stages of flukes, which are thought to feed on liver cells rather than blood. In terms of their mode of action, closantel, rafoxanide and oxcyclozanide can be considered proton ionophores. They prevent the production of the proton gradient across the inner mitochondrial membrane, selectively inhibiting ATP synthesis and therefore acting as an uncoupler of oxidative phosphorylation in flukes. If anthelmintic drugs are not administered properly (in the recommended doses or not adhering to withdrawal periods), their residues can be detected in foods of animal origin, which poses a human health

threat due to their toxicological properties. Since closantel, rafoxanide and oxcyclozanide are mostly available in combination with other anthelmintics, their determination requires the development of multiresidue methods that unite selective sample preparation techniques (SPE, QuEChERS) with sensitive mass spectrometry detection (MS/MS, TOF/MS). These substances were reported in concentrations above the MRL values stipulated in Commission Regulation (EU) No 37/2010, in the EFSA reports for the period 2009–2019 for monitoring veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products in EU Member States. In non-compliant samples, closantel was the most commonly detected substance, while in the last five years alone, closantel, rafoxanide, and oxcyclozanide together account for nearly 50% of all non-compliant results in samples screened for the B2a subgroup of compounds.

**Key words:** *salicylanilides; closantel; rafoxanide; oxcyclozanide; fascioliasis; residues*