

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

VYUŽITÍ SPE V ANALÝZE BENZIMIDAZOLŮ I

Vedoucí diplomové práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2014

Jiří Janoušek

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně a všechna literatura a použité zdroje, z kterých jsem při zpracování této práce čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně ocitovány.“

V Hradci Králové, dne 14.5. 2014

.....

podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval panu Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za jeho odborné vedení, čas a rady při vypracování diplomové práce a panu Vítu Dostálovi za spolupráci. Díky patří i mé rodině, které mě po celou dobu studia podporovala.

Abstrakt:

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Jiří Janoušek
Vedoucí práce: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.
Název diplomové práce: Využití SPE v analýze benzimidazolů I

Rezistence parazitických červů k anthelmintikům je aktuální téma. Abychom dokázali proti této rezistenci bojovat, musíme najít vhodné analytické metody pro její sledování.

Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu pro extrakci benzimidazolů pomocí extrakce na pevné fázi. Během experimentů jsem používal kolonky Supelco DSC-C8 (1ml, 100mg).

V této práci jsem zkoušel vliv pH a složení elučních roztoků na výtěžek extrakce. Zkoušel jsem extrakci v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí. Eluční činidla byla tvořena směsí acetonitrilu a polární fáze o čtyřech různých směšovacích poměrech.

Nejlepších výsledků jsem dosáhl při extrakci v zásaditém prostředí. Pro kolonky DSC-C8 byla nejvhodnějším elučním činidlem směs 4 dílů acetonitrilu a 6 dílů 10% amoniaku.

Klíčová slova: benzimidazoly, flubendazol, mebendazol, extrakce na pevné fázi, rezistence, anthelmintika

Abstract:

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Jiří Janoušek

Supervisor: Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Title of diploma thesis: Use of SPE in analysis of benzimidazoles I

Anthelmintic resistance in parasitic worms is an up-to-date topic. In order to combat this resistance we need to find proper analytic methods of its monitoring.

The goal of this thesis is to find a suitable method of benzimidazole extraction, using a solid-phase extraction. During the experiments I used SPE tubes Supelco DSC-C8 (1ml, 100mg).

In my thesis I tested the influence of pH and composition of elution agents on recovery of extraction. I performed the extraction in acid, neutral and basic environment. Elution agents consisted of a mixture of acetonitrile and polar phase, with four different mixing ratios.

The best results were obtained during extraction in basic environment. For SPE tubes DSC-C8 the most suitable elution agent consisted of 4 parts of acetonitrile and 6 parts of 10% ammonia solution.

Keywords: benzimidazoles, flubendazole, mebendazole, solid-phase extraction, resistance, anthelmintics

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Původci helmintóz	11
3.1.1. Motolice	11
3.1.2. Tasemnice	12
3.1.3. Hlístice	13
3.2. Farmakoterapie helmintóz	15
3.3. Metabolismus léčiv a rezistence	16
3.3.1. Osud léčiv v organismu	16
3.3.2. Rezistence helmintů k farmakoterapii	17
3.4. Úprava biologických vzorků	19
3.4.1. Deproteinace	19
3.4.2. Extrakce kapalina-kapalina	19
3.4.3. Extrakce na pevné fázi	20
3.5. HPLC	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1. Použitý materiál	25
4.1.1. Laboratorní nádobí a pomůcky	25
4.1.2. Rozpouštědla a další chemikálie	25
4.1.3. Použité přístroje a sorbenty	26
4.2. HPLC metoda	27
4.3. Pracovní postupy	27
4.3.1. Příprava zásobních roztoků	27

4.3.2.	Příprava pracovních roztoků.....	27
4.3.3.	Příprava pufru.....	28
4.3.4.	Příprava elučních roztoků.....	28
4.3.5.	SPE	29
4.3.6.	Vlastnosti testovaných látek	29
5.	Výsledky.....	31
5.1.	Extrakce v neutrálním prostředí	31
5.1.1.	Flubendazol.....	32
5.1.2.	Mebendazol.....	35
5.1.3.	Shrnutí extrakce v neutrálním prostředí.....	37
5.2.	Extrakce v kyselém prostředí	39
5.2.1.	Flubendazol.....	39
5.2.2.	Mebendazol.....	42
5.2.3.	Shrnutí extrakce v kyselém prostředí	44
5.3.	Extrakce v zásaditém prostředí	46
5.3.1.	Flubendazol.....	46
5.3.2.	Mebendazol.....	50
5.3.3.	Shrnutí extrakce v zásaditém prostředí	54
5.4.	Správnost a opakovatelnost metody	56
6.	Diskuze	57
7.	Závěr.....	59
8.	Použité zdroje	60

Seznam použitých zkratek

ABZ	albendazol
ACN	acetonitril
AUC	<i>area under the curve</i> - plocha pod křivkou
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - deoxyribonukleová kyselina
FaF	Farmaceutická fakulta
FLU	flubendazol
FLU-R	redukovaný flubendazol
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MBZ	mebendazol
MF	mobilní fáze
M _R	relativní molekulová hmotnost
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
p.a.	<i>pro analysi</i> - k analytickým účelům
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyselin
RSD	relativní směrodatná odchylka
R _t	retenční čas
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> jednonukleotidový polymorfismus
SPE	<i>solid-phase extraction</i> - extrakce na pevné fázi

1. ÚVOD

Pod pojmem infekční onemocnění si většina populace představí převážně onemocnění způsobená viry a bakteriemi. Povědomí o těchto patogenech je na poměrně slušné úrovni. V prostředí lékáren probíhá každoročně akce "Antibiotický týden", která občany seznamuje s problematikou bakteriálních nemocí a užívání antibiotik. Rovněž každoroční mediální masáž točící se kolem virových epidemií poskytuje běžným lidem informace o virových původcích nemocí. Přesto je jedno z nejčastějších infekčních onemocnění vůbec poněkud přehlíženo.

Helmintózy, infekční onemocnění způsobené parazitickými červy, postihují téměř 3,5 miliardy lidí. To tvoří polovinu veškeré populace na Zemi. Nejohroženější jsou tropické oblasti s nízkými hygienickými standardy, proto se u nás o těchto nemocech příliš nemluví. Nejčastějším parazitickým onemocněním v moderním světě je infekce roupem dětským. [26]

Hlavním způsobem boje proti helmintózám je farmakoterapie, avšak spektrum používaných léčivých látek je relativně úzké. Tito parazité se poměrně často setkávají se stejnými nebo podobnými molekulami a stejně jako u jednobuněčných bakterií (např. MRSA) se u těchto mnohobuněčných organismů vyvíjí rezistence k léčbě.

Pokud chceme i nadále zachovat účinnost farmakoterapie helmintóz, je zapotřebí pochopit způsoby, jakými se tyto parazité vypořádávají s molekulami účinných látek a kvantifikovat míru této rezistence. K tomu je potřeba řada studií, které budou zpracovávat složité biologické vzorky. Ty jsou dostupné často v poměrně malém množství a obsahují celou řadu příměsí, které je nutné před vlastní analýzou odstranit.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro předextrakci léčivých látek ze skupiny benzimidazolů a jejich metabolitů z biologického vzorku pomocí extrakce na pevné fázi. Záměrem bylo určit vhodné složení a pH vymývacího roztoku pro dosažení co nejlepší výtěžnosti extrakce a její opakovatelnosti.

Získané vzorky byly analyzovány pomocí HPLC za užití detektoru diodového pole.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Původci helmintóz

Skupina parazitů, kterou souhrnně označujeme jako helminty, zahrnuje zástupce ze dvou živočišných kmenů, a to z kmene Ploštěnců (*Plathelminthes*) a kmene hlístů (*Nemathelminthes*). Ne všichni živočichové z těchto kmenů se ale diferencovali jako parazité. V kmeni Ploštěnců najdeme parazity ve třídách Motolice (*Trematoda*) a Tasemnice (*Cestoda*). Z kmene hlístů žije parazitickým způsobem života nejpočetnější třída Hlístic (*Nematoda*).

Helminty dělíme podle jejich orgánové nebo tkáňové distribuce na střevní parazity (např. tasemnice), kteří žijí v gastrointestinálním traktu hostitele, dále na krevní parazity žijící v krevním řečišti (např. larvy filárií) nebo trvale přichycené k cévní stěně (např. krevnička močová), a poslední skupinu tvoří parazité tkáňoví, kteří se vyskytují ve vnitřních orgánech (např. motolice jaterní, svalovec stočený).[8]

Infekce parazitickými červy ohrožují nejen zdraví a život lidí, ale způsobují řadu problémů při chovu hospodářských zvířat. Infikovaný dobytek neprospívá nebo dokonce hyne a může se stát zdrojem nemoci pro člověka.

Parazité dráždí a rozrušují tkáň hostitele svými sekrety, které obsahují histolytické enzymy, i mechanicky. [29] Střevní parazité okrádají hostitele o živiny z potravy a mohou způsobit zneprůchodnění lumen střeva. Podobně vzniká onemocnění elefantiáza, která je způsobena ucpáním lymfatických cév a uzlin.

3.1.1. Motolice

Motolice jsou charakteristické nečlánkovaným, dorsoventrálně zploštělým tělem oválného nebo kopinatého tvaru. Většinou se jedná o helminty s velikostí od několika desetin milimetru do několika centimetrů. Některé motolice mohou dosahovat délky 10 cm. Motolice jsou převážně hermafrodité. Napadají prakticky všechny orgánové soustavy, hlavně trávicí trakt, ale i dýchací cesty, krevní řečiště, nervovou soustavu, urogenitální trakt, atd. [29]

Životní cyklus motolic:

Motolice zahrnují skupiny parazitů s přímým vývojem, kde celý vývoj probíhá pouze v jednom hostiteli. Mnohem častější je ale nepřímý vývoj, který může zahrnovat i 2 a více mezihostitelů. Prvními mezihostiteli jsou zpravidla měkkýši.[29] Jako příklad zde uvedu vývojový cyklus Motolice jaterní.

Motolice jaterní žije až 3 roky a každý den je schopna vyprodukovat 10 000 vajíček. Tato vajíčka odchází přes žlučovody do trávicího traktu a jsou vyloučena z těla hostitele se stolicí. Další vývoj závisí na množství vody v okolí a na teplotě prostředí. Při ideální teplotě okolo 26°C se za 10 dní vyvine obrvená larva zvaná miracidium. Larvy jsou ve vodě velice mobilní a do 24 hodin musí nalézt svého mezihostitele, sladkovodního měkkýše z čeledi Lymnaeidae. V tomto měkkýši probíhá vývoj přes řadu mezifází až do vzniku tzv. cercarií, které opouštějí tělo měkkýše, přichytí se na vegetaci a encystují se do podoby infekčních metacercarií. Ty po pozření projdou stěnou trávicího traktu a migrují do jater.[5]

3.1.2. Tasemnice

Dospělé tasemnice nejčastěji parazitují ve střevech hostitele, obratlovce ale mohou napadat i larvy (např. Echinococcus). Jsou charakteristické zploštělým tělem, které může dorůstat délky až 30 metrů. Existují ale i druhy s velikostí kolem 1 cm. Tělo může být tvořeno jedním nebo více články. Většina tasemnic jsou hermafrodité a každý článek těla představuje samostatnou reprodukční jednotku. K oplození dochází buďto mezi dvěma tasemnicemi nebo mezi články na stejném těle.[29]

Životní cyklus tasemnic:

Oplodněné články se na konci těla tasemnice oddělují a odchází se stolicí hostitele. Nové články se neustále tvoří za hlavičkou parazita. Tasemnice mají obvykle dva hostitele, definitivního a jednoho mezihostitele. Jako mezihostitelé slouží bezobratlí nebo obratlovci. Existují ale i výjimky, kdy tasemnice využívá více mezihostitelů, paratenického hostitele nebo naopak mezihostitele nevyužívá vůbec. Jako příklad uvádím vývojový cyklus Tasemnice bezbranné.[29]

Definitivní hostitel vylučuje ve své stolici oplodněná vajíčka obsahující embryonální fázi vývoje tasemnice, tzv. onkosféru. Mezihostitel, v tomto případě skot, se nakazí pozřením vajíček. Ve střevě skotu dochází k uvolnění onkosféry z vajíčka a penetraci skrz střevní stěnu do krevního oběhu. Krev následně roznese onkosféry do celého těla, nejčastěji do svaloviny. Ve svalech dobytka vzniká z onkosfér cysticerkus, který je infekční pro definitivního hostitele. Ten se nakazí pozřením nedokonale tepelně zpracovaného masa.[29]

3.1.3. Hlístice

Hlístice patří mezi nejrozšířenější a nejpočetnější skupinu živočichů. Dosud bylo popsáno 20 tisíc druhů parazitujících v obratlovcích.[29]

Dospělci nejčastěji parazitují v trávicím traktu, ale i v dalších orgánových soustavách - nejčastěji v krevním a lymfatickém systému, nervové soustavě, urogenitálním traktu, dýchacích cestách, kůži, atd. [29]

Tělo hlístic není článkované, na řezu je kruhové a má niťovitý, válcovitý případně vřetenovitý tvar. Velikost hlístic je různorodá, od mikroskopických rozměrů až po několik decimetrů.

Hlístice mají oddělené pohlaví a často charakteristický pohlavní dimorfismus, kdy samička je větší. [29]

Životní cyklus hlístic

Hlístice jsou gonochoristi s typickým sexuálním rozmnožováním, ale u některých druhů se mohou vyskytnout i jiné způsoby rozmnožování, například partenogeneze, hermofroditismus, heterogonie.

Vývoj hlístic může být přímý, bez účasti mezihostitele. V takovém případě dochází k infekci buďto pozřením infekční larvy anebo proniknutím tzv. larvy migrans cutanea skrz kůži hostitele.

Část hlístic má ale vývoj nepřímý. V takovém případě larva zraje do infekčního stádie v mezihostiteli, nejčastěji bezobratlých živočiších. V takovém případě může k infekci docházet pozřením mezihostitele. U filárií, které jako mezihostitele využívají krevsajcí členovce, dochází k infekci kousnutím. [29]

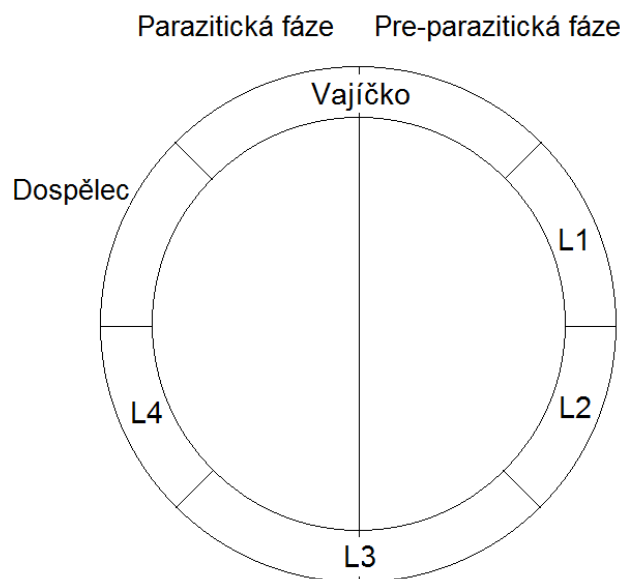
I přes obrovský počet druhů hlístic probíhá jejich vývoj podle poměrně jednoduchého schématu. Vývoj můžeme rozdělit na dvě fáze: pre-parazitickou a parazitickou. Schéma vývoje je uvedeno na obrázku 3.1.

Pre-parazitická fáze probíhá volně v prostředí nebo v meziphostiteli. V této fázi není vyvíjející se hlístice infekční pro konečného hostitele.

V oplodněném vajíčku se vyvíjí larva L1, která se vylíhne pouze v případě ideální vlhkosti a teploty okolí. Larva se živí bakteriemi a zvětšuje se, dokud jí v růstu nezastaví kutikula. Aby mohla nadále růst, musí si vytvořit novou, flexibilnější kutikulu a tu starou svléct. Larva se svléká celkem dvakrát až do fáze L3, kdy se stává infekční pro definitivního hostitele.

Následuje parazitická část vývojového cyklu, která probíhá v konečném hostiteli. Larva dále roste a ještě dvakrát se svléká, než se vyvine do dospělce.

[14]



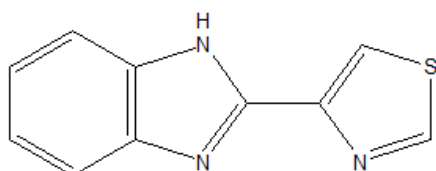
Obrázek 3.1: Schéma vývoje hlístic [14]

3.2. Farmakoterapie helmintóz

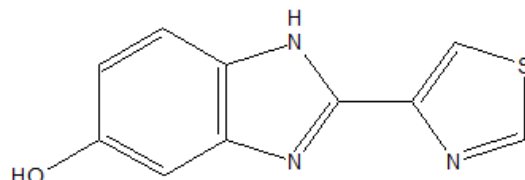
Podobně jako v jiných farmakoterapeutických skupinách se jako anthelmintika nejprve používaly rostlinné extrakty, například silice merlíku vonného nebo hořčice. Účinek těchto extraktů byl značně nespolehlivý. Ve 20. století proto byla věnována značná pozornost izolaci účinných látek, například terpenický endoperoxid askaridol z merlíku vonného.

Kromě značně omezeného počtu anthelmintik přírodního původu vznikala celá řada syntetických sloučenin. Deriváty piperazinu účinkují na neuromuskulární ploténce a způsobují paralýzu parazita, který je poté vyloučen z hostitelského organismu. Spektrum účinku těchto derivátů je však úzké a léčebná kúra trvala několik dní. [12]

Jako první skutečně širokospektrální anthelmintika byly objeveny benzimidazoly. Základní strukturou pro celou skupinu je tiabendazol objevený v roce 1961 (obr. 3.2). Účinek této látky byl ale velice krátkodobý. V organismu dochází k rychlé metabolizaci na 5-hydroxytiabendazol (obr. 3.3), který se konjuguje s kyselinou glukuronovou a vylučuje z organismu. Aby se hydroxylaci zabránilo, byly připraveny 5-substituované deriváty benzimidazolu, například mebendazol, flubendazol, albendazol a další.[10,12]



Obrázek 3.2: tiabendazol



Obrázek 3.3: 5-hydroxytiabendazol

Mechanismus účinku benzimidazolů spočívá v interakci s mikrotubuly v buňkách parazita. Mikrotubuly jsou součástí cytoskeletu buňky, který je zodpovědný za transport organel a látek v buňce a účastní se dělení buňky. U parazita dochází mimo jiné k zastavení absorpce glukózy, vyhladovění a odumření. [6]

Benzimidazoly jsou určeny primárně k terapii střevních infekcí, ale účinkují i na systémová onemocnění. Při terapii systémové nákazy je vhodné kombinovat anthelmintikum s kortikoidy a antihistaminiky, aby se předešlo nežádoucím reakcím na látky uvolněné z uhynulých červů. [12]

3.3. Metabolismus léčiv a rezistence

3.3.1. Osud léčiv v organismu

V rámci sledování jejich metabolismu řadíme léčiva do větší skupiny xenobiotik, látek pocházejících z vnějšího prostředí. Všechny živé organismy se s nimi setkávají, ale tyto látky neslouží ani jako zdroj energie ani pro syntézu biomolekul. Přesto živé organismy ovlivňují a představují pro ně potencionální zátěž. Proto mají organismy vyvinuté systémy metabolizující xenobiotika.

Obrany organismu před potencionálně nebezpečnými látkami se účastní dva mechanismy, a to transportní proteiny a biotransformační enzymy.

Transportní proteiny se nacházejí v cytoplasmatických membránách buněk a významně regulují pronikání xenobiotik do těla, případně usnadňují jejich eliminaci. Například ve střešní stěně se nacházejí proteiny, které aktivním transportem vrací lipofilní látky, které pronikly do buněk, zpět do lumen střeva. Prvním identifikovaným, nejlépe prostudovaným a zdá se, že i nejvýznamnějším, efluxním transportérem léčiv je P-glykoprotein z rodiny ABC transportérů. V dnešní době už známe celou řadu transportních proteinů a víme, že například u nádorových buněk vede nadměrná exprese genů pro tyto transportéry k selhání terapie.

Druhým mechanismem obrany organismu proti xenobiotikům jsou biotransformační enzymy, které se účastní procesu zvaného biotransformace. V průběhu tohoto procesu enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika s cílem omezit jeho pronikání do tkání a urychlit jeho eliminaci. Nově vzniklá molekula má často nižší biologickou aktivitu, je hydrofilnější a je snáze rozpoznatelná pro transportní a exkreční systémy.

Biotransformační reakce bývají rozčleňovány do dvou fází.

První fáze biotransformace, tzv. konverze, zahrnuje především oxidační, redukční a hydrolytické reakce. V průběhu těchto reakcí se do molekuly léčiva vnáší nebo je odkryta funkční skupina.

Druhá fáze biotransformace, tzv. konjugace, zahrnuje reakce, při nichž léčivo nebo metabolit vzniklý konverzí reaguje s endogenní sloučeninou. Mezi tyto reakce patří glukuronidace, sulfonace, acetylace, metylace, konjugace s glutathionem a aminokyselinami. [25]

3.3.2. Rezistence helmintů k farmakoterapii

Mechanismy popsané v předcházejících odstavcích slouží lidskému organismu k obraně před cizorodými látkami. Obdobné mechanismy ale využívají i parazité. Zvýšením aktivity genů kódujících biotransformační enzymy dochází ke stavu označovanému jako farmakokinetická rezistence, který doprovází změny na úrovni farmakokinetiky léčiva. Absorpce léčiva může být omezena pomocí aktivního efluxu ven z buněk. Dochází ke zrychlené enzymatické inaktivaci molekuly léčiva a její následné eliminaci. Tyto procesy mohou ve finále způsobit, že parazit přežívá anthelmintickou terapii.

Studium rezistence helmintů k farmakoterapii je znesnadněno řadou problémů. Sledování rezistence červů parazitujících na lidech je značně obtížné. Neexistuje dostatečné množství vhodných in vitro kultur a provádění experimentů in vivo s lidskými hostiteli je nepřijatelné.

V kontrastu s tím je ale relativně jednoduché udržet experimentální infekci u laboratorních zvířat. Jako modelový organismus pro studium rezistence byla vybrána hlístice Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*), kterou můžeme snadno sledovat v jejím přirozeném hostiteli, ovci. *H. contortus* byla vybrána jako modelový organismus vzhledem ke své schopnosti adaptace a vyvinutí rezistence vůči všem léčivům používaným k její eradikaci. Roli hraje i snadnost práce s ní a její ekonomický dopad na chov ovcí.

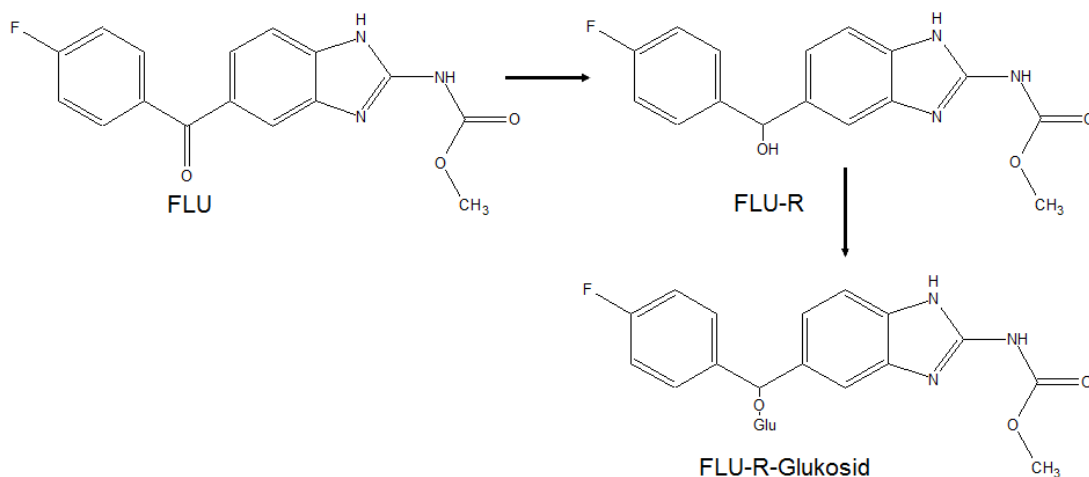
Intenzivní studium tohoto parazita vedlo k celé řadě objevů. Mimo řady nových poznatků týkajících se rezistence bylo v rámci těchto výzkumů objeveno zcela nové anthelmintikum monepantel a byl vysvětlen jeho mechanismus účinku.

Vědci se pomocí genetických a genomických přístupů snaží identifikovat potenciální geny a mutace zodpovědné za rezistenci. Tyto sekvence DNA jsou následně přeneseny do Hádátka obecného (*C. elegans*) a ověřuje se, zda skutečně způsobují rezistenci. Příkladem může být objev jednonukleotidového polymorfismu (SNP), který vede k záměně aminokyselin v β -tubulinu. Fenylalanin v pozici 200 je nahrazen za tyrosin, což je jednou z významných příčin rezistence k benzimidazolům. SNP v jednom genu ale zdaleka nevysvětluje obrovskou variabilitu jakou má rezistence k farmakoterapii. [11]

H. contortus nevyužívá jako obranný mechanismus aktivní eflux benzimidazolů pomocí P-glykoproteinu. Léčivo se přes membránu parazita dostává díky své vysoké lipofilitě pasivní difuzí. [2]

Další studie byly zaměřeny na identifikaci metabolitů benzimidazolů. Po inkubaci *H. contortus* v médiu s léčivou látkou byly metabolity identifikovány pomocí kombinace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Jako metabolit první fáze byl u albendazolu (ABZ) identifikován albendazol sulfoxid. U léčivé látky flubendazolu (FLU) dochází k redukci karbonylové skupiny za vzniku redukovaného flubendazolu (FLU-R). Z metabolitů druhé fáze biotransformace byly detekovány konjugáty ABZ, FLU i FLU-R s glukózou. [7]

Jako hlavní metabolity flubendazolu lze označit redukovaný flubendazol a jeho konjugát s glukózou (obr. 3.4). Další studie se zaměřila na porovnávání aktivity enzymů zodpovědných za vznik těchto metabolitů mezi citlivými a rezistentními kmeny. Ve všech testovaných kmenech byly dokázány stejné metabolity. Aktivita karbonylreduktás se mezi citlivými a rezistentními kmeny lišila jen velmi málo. Aktivita UDP-glucosyltransferázy, enzymu zodpovědného za vznik konjugátů s glukózou, byla ale u rezistentních kmenů zvýšená. [28]



Obrázek 3.4: Schéma biotransformace flubendazolu u *H. contortus*

3.4. Úprava biologických vzorků

Před vlastní analýzou biologického vzorku je nezbytné provést jeho úpravu. Biologické vzorky obsahují řadu vysoko- a nízkomolekulárních složek, které by způsobovaly nežádoucí interference. Zároveň tak chráníme analytické přístroje, kupříkladu kolonu a kapiláry v HPLC systému před zanesením. V praxi se používá několik metod.

3.4.1. Deproteinace

Za pomoci precipitačních činidel (např. organická rozpouštědla, silné kyseliny) dochází k vysrážení bílkovin. Vzorek se centrifuguje a k další analýze se používá roztok nad sraženinou. Nevýhodou této metody je možnost vazby analytu na sraženinu a neodstranění řady balastních látek.

Druhem deproteinace je ultrafiltrace. Do zkumavek se vkládají kuželovité membránové filtry, do jejichž středu se nanese vzorek. Zkumavka následně prochází centrifugací, analyzuje se filtrát. Metoda se využívá ke stanovení volné frakce léčiva, molekuly navázané na bílkoviny neprojdou póry filtru.

3.4.2. Extrakce kapalina-kapalina

Metoda využívá rozdílné rozpustnosti sledovaného analytu v různých kapalinách. Biologický vzorek je zpravidla na začátku extrakce ve vodné fázi. K němu se následně přidá organické rozpouštědlo, které je s vodou nemísitelné. Při třepání přechází analyt do organické fáze, ve které je rozpustnější. Efektivnější než jedno vytřepání velkým objemem je postupné vytřepání tímto objemem rozděleným do více částí.

pH vodné fáze se musí upravit takovým způsobem, aby sledovaná látka nebyla ionizována. V takovém případě by do organického rozpouštědla nepřecházela.

Výhodou této metody je její univerzálnost a možnost zakoncentrování analytu po extrakci. Provádí se odpařením organického rozpouštědla. Sledovaná látka zůstane na stěnách zkumavky, ze kterých se smyje malým množstvím mobilní fáze.

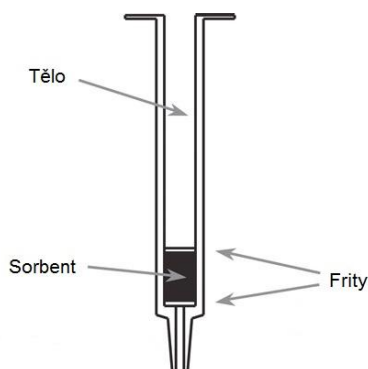
Nevýhodou je velká spotřeba organických rozpouštědel vzhledem k jejich ceně a dopadu na životní prostředí.

3.4.3. Extrakce na pevné fázi

Název pochází z anglického solid-phase extraction (SPE). V dnešní době se jedná o jednu z nejpoužívanějších metod pro přípravu vzorku. [13]

Extrakce se provádí na speciálních kolonkách. Ty se skládají z těla, vlastního sorbentu a dvou frit. Frity slouží jako ochrana sorbentu před mechanickými nečistotami a zároveň zabraňují úniku sorbentu z kolonky. Schéma kolonky je na obrázku 3.5. Kolonky se vyrábějí v různých velikostech a s různým množstvím sorbentu.

Při průchodu vzorku kolonkou dochází k rozdělení vzorku na základě rozdílných fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných sloučenin.[24] Jak vzorek prochází kolonkou, jednotlivé látky se rozdělují na základě své afinity mezi stacionární fází, kterou tvoří sorbent kolonky, a mobilní fází, kterou tvoří rozpouštědlo vzorku.



Obrázek 3.5: Schéma SPE kolonky [4]

3.4.3.1. Sorbenty používané v SPE kolonkách

Existují sorbenty s normální nebo reverzní fází, případně sorbenty s obsahem iontoměničů. Jako nosič pro jednotlivé sorbenty slouží silikagel. Pro provedení extrakce je důležité vědět, že silikagel je stabilní v rozmezí pH 2-8. [16] Jednotlivé fáze se vytváří různými substitucemi na -OH skupině silikagelu.

Normální fáze obsahují různé polární funkční skupiny, například aminopropylové, kyanopropylové nebo diolové. Nejpolarnější fází je nesubstituovaný silikagel.

Reverzní fáze jsou nepolární. Jako substituenty obsahují například oktadecyl, oktyl, ethyl, fenyl nebo cyklohexyl.

Iontově-výměnné sorbenty obsahují jako substituent molekuly s nábojem. Nejčastěji se používají kvartérní amoniové soli nebo soli sulfonových kyselin. Iontoměničem je za určitých podmínek i aminopropyllová skupina. [23]

Sorbenty používané v SPE mají větší velikost i distribuci velikosti částic než sorbenty v HPLC. Díky tomu je možno pracovat při nižších tlacích. [22]

3.4.3.2. Interakce mezi analytem a sorbentem

Při použití normální fáze dochází ke vzniku polárních interakcí mezi stacionární fází a polárními funkčními skupinami analytu. Vznikají tak například vodíkové můstky, interakce π - π nebo dipól-dipól. Aby došlo ke vzniku těchto interakcí, musí být stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. [27]

V případě reverzní fáze vznikají mezi analytem a stacionární fází například hydrofobní interakce nebo van der Waalsovy síly. Opět platí, že aby ke vzniku takových vazeb došlo, musí být stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. [27]

U iontově-výměnných sorbentů dochází k separaci na základě elektrostatických interakcí založených na výměně iontů. Pro úspěch extrakce je nezbytné, aby se prováděla při pH, kdy je sorbent i požadovaný analyt ionizovaný. [23]

3.4.3.3. Výběr správného sorbentu

Pro úspěšnou extrakci analytu ze vzorku je nezbytné zvolit správný sorbent. Výběr sorbentu úzce souvisí s fyzikálně-chemickými vlastnostmi sledovaného analytu. Zvolíme takovou stacionární fází, aby docházelo ke vzniku interakcí mezi analytem a touto fází. Aby došlo k adsorpci, musí být tyto interakce silnější než interakce mezi analytem a mobilní fází. V ideálním případě by nemělo docházet k interakcím mezi nečistotami ve vzorku a sorbentem.

Neméně významný je i výběr správné velikosti kolonky a množství sorbentu. Velikost kolonky se řídí objemem vzorku a rychlostí jeho zpracování. Množství sorbentu se určuje podle obsahu analytu, který má být zachycen. Udává se, že u normální a reverzní fáze by obsah analytu, který má být

zachycen, neměl překročit 5% hmotnosti sorbentu. U iontově-výměnných sorbentů je navíc potřeba počítat s kapacitou iontoměniče.

3.4.3.4. Provedení extrakce

Hybnou silou, která se stará o průchod mobilní fáze skrz kolonku, může být mírný přetlak nebo podtlak. Vlastní extrakce se skládá z několika kroků: [21]

1. Kondicionace kolonky

Kondicionace je první krok, který se provádí ještě před vlastním nanesením analyzovaného vzorku na kolonu. Dochází k aktivaci kolonky, která se tak připravuje na adsorpci analytu. Můžeme si ji představit jako "načechrání" funkčních skupin, které jsou poté přístupnější ke vzniku interakcí. Aktivačním činidlem je nejčastěji acetonitril nebo metanol. Následovat může promytí puftrem, kterým se nastaví vhodné pH kolonky.

2. Nanesení vzorku

V dalším kroku dochází k nanesení vlastního vzorku na kolonku. Dochází k zachycení sledovaného analytu na částice sorbentu. Spolu s ním se ale zachycují i jiné látky, kterých se chceme zbavit.

3. Promývání kolonky

Kolonku promýváme vhodně vybraným roztokem, který má afinitu k balastním látkám, ale neovlivní adsorpci sledované látky. Promytí můžeme opakovat případně použít různé roztoky. Cílem je odstranit z kolonky balasty, které by kontaminovaly finální produkt extrakce.

4. Eluce analytu

Po odstranění balastních látek následuje vymytí analytu z kolonky vhodným elučním činidlem, které je pro analyt selektivní.

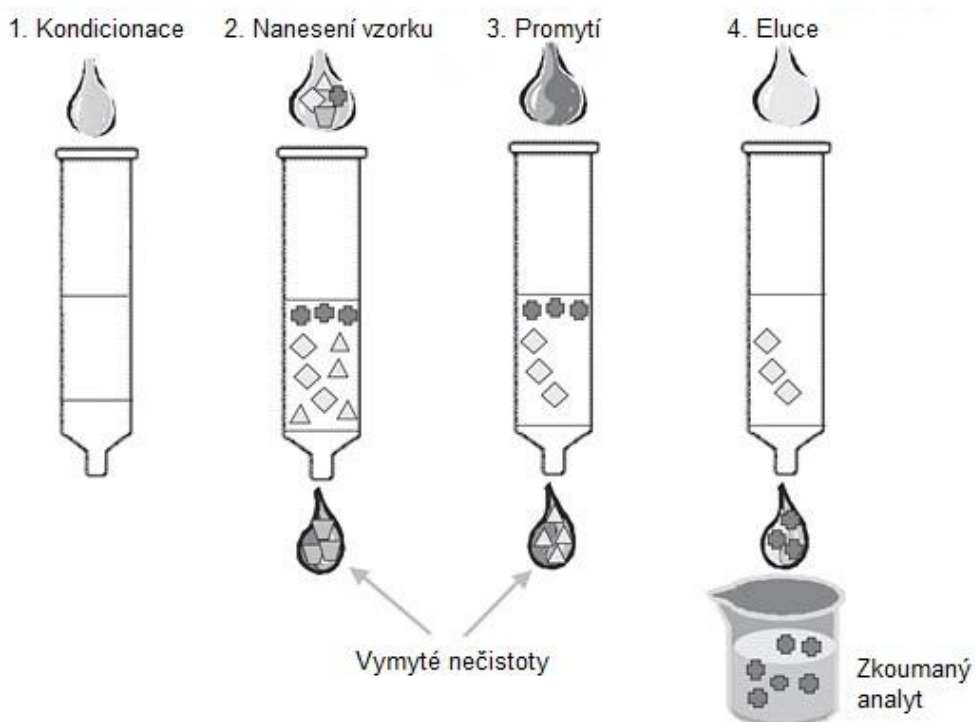
Jednotlivé kroky extrakce jsou popsány na obrázku 3.6.

3.4.3.5. Výhody a nevýhody SPE

Nespornou výhodou je možnost automatizace SPE nebo přímého spojení s HPLC. Široká škála sorbentů navíc umožňuje široké využití SPE. [16] Přestože je SPE hojně využívaná, má i své nevýhody. Je poměrně zdlouhavá,

vyžaduje relativně velké množství organických rozpouštědel a je drahá, protože kolonky jsou pouze na jedno použití.

Při provádění ručně je zapotřebí dbát na rychlost průtoku mobilní fáze skrz kolonku. Mobilní fáze by měla protékat přiměřenou rychlostí a plynule. Musí dojít k rovnoměrnému zvlhčení celého objemu stacionární fáze. Při příliš rychlém průtoku mohou ve stacionární fázi vzniknout kanály, kterými mobilní fáze proteče. Není tak využita celá kapacita sorbentu a může dojít ke ztrátě analytu.



Obrázek 3.6: Schéma postupu při SPE [3]

3.5. HPLC

Zkratka pochází z anglického High Performance Liquid Chromatography, česky vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Jedná se o široce používanou analytickou metodu, která umožňuje současně provádět kvalitativní i kvantitativní hodnocení vzorku, a to s vysokou citlivostí a selektivitou.

HPLC je ve své podstatě separační metodou. V průběhu analýzy dochází na základě rozdílné afinity jednotlivých složek vzorku k mobilní a stacionární fázi k jejich rozdělení. Retenční čas píků je kvalitativní charakteristikou látky, plocha pod píkem odpovídá množství látky ve vzorku.

Vlastní separace probíhá na HPLC kolonách. Ty jsou nejčastěji vyrobené z nerezové oceli a jsou naplněny obdobnými sorbenty jako u SPE, částice jsou ale menší.

HPLC na rozdíl od plynové chromatografie nevyžaduje, aby byl analyt těkavý. Umožňuje proto analýzu většího množství látek. [15]

Na poli HPLC probíhá neustále vývoj nových metod a aplikací. Rozsah používání HPLC nejen ve farmacii dává tušit, že tato analytická metoda je dnes již nepostradatelná.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál

4.1.1. Laboratorní nádobí a pomůcky

Odměrné baňky, kádinky, odměrné válce, skleněné tyčinky, nálevky, pipety, šroubovací vialky z průhledného skla, magnetické míchadlo, mikropipety a špičky.

Membránový filtr Nylon 66, 0,45 µm x 47 mm, SUPELCO

4.1.2. Rozpouštědla a další chemikálie

K přípravě mobilní fáze a elučních roztoků byly použity následující látky:

Ultračistá voda

V čas potřeby byla vždy připravena čerstvá pomocí reverzní osmózy na FaF

Acetonitril

Acetonitrile CHROMASOLV® for HPLC, Sigma-Aldrich

Kyselina fosforečná

Kyselina o-fosforečná 85%, p.a., Lachema

Dihydrogenfosforečnan draselný

Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., Penta

Amoniak

Amoniak - vodný roztok 25%, Lachema

Octan amonný

Octan amonný, p.a., Lach-Ner, s.r.o.

Technické pufrы pro kalibraci pH metru

Technický pufr TEP o pH 4,01, WTW

Technický pufr TEP o pH 7,00, WTW

Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid, Fluka

Flubendazol

Flubendazole, Janssen Pharmaceutica

Mebendazol

Mebendazole, Janssen Pharmaceutica

4.1.3. Použité přístroje a sorbenty

Supelco Visiprep™ Vacuum Manifold

Systém pro provádění SPE podtlakem pro 12 kolonek

SPE kolonky Discovery DSC-C8

1 ml, 100mg, reverzní fáze, Supelco

Vaková pumpa

Siemens

HPLC chromatografický systém

Kapalinový chromatograf Shimadzu; sestava: degaser DGU-20A5, vysokotlaké čerpadlo LC-10ADvp, autosampler SIL-10ADvp, kolonový termostat CTO-10Avp, diode-array detektor SPD-M10Avp, fluorescenční detektor RF-10AXL a řídicí jednotka SCL-10Avp.

Chromatograf byl ovládán z počítače pomocí chromatografického software CLASS-VP.

Předkolona ASCENTIS® C18 Supelguard™

2 cm x 4,0 mm x 3 μm

Analytická kolona Supelco ASCENTIS® Express C18

10 cm x 3,0 mm x 2,7 μm

Analytické váhy

Sartorius analytic

pH metr

WTW inoLab pH 720 s kombinovanou pH elektrodou SenTix 61

Magnetická míchačka

Heidolph MR Hei-Mix S

Zařízení pro přípravu ultračisté vody

Millipore Milli-Q RG

4.2. HPLC metoda

Při analýze vzorku jsem využíval metodu publikovanou v článku [1]:

- izokratická mobilní fáze byla tvořena 0,025M KH_2PO_4 puforem o $\text{pH}=3,0$ a acetonitrilem v poměru 7:3
- průtok mobilní fáze nastaven na 0,7 ml/min
- chromatografický záznam byl pořizován při 246 a 300 nm
- nastříkováno bylo 50 μl vzorku

4.3. Pracovní postupy

4.3.1. Příprava zásobních roztoků

Připravovaly se 1 mmol/l zásobní roztoky flubendazolu (FLU) a mebendazolu (MBZ). Jedná se o bílé nebo téměř bílé prášky prakticky nerozpustné ve vodě, ethanolu 96% a dichlormethanu [9].

Navážené množství FLU a MBZ jsem v kádince rozpustil v malém množství dimethylsulfoxidu (DMSO), který výrazně usnadnil rozpouštění. Roztok jsem přelil do odměrné baňky a kádinku několikrát vypláchnul mobilní fází (MF); tím jsem dosáhnul kvantitativního převedení do odměrné baňky. Obsah odměrné baňky jsem doplnil po rysku MF.

4.3.2. Příprava pracovních roztoků

Se zásobními roztoky se nedá pracovat přímo. Jsou příliš koncentrované a výška píku by přesáhla rozsah detektoru. Navíc to neodpovídá koncentraci v reálných vzorcích. Proto se vzorky před vlastními experimenty ředí.

Zásobní vzorky jsem naředil mobilní fází v poměru 1 díl zásobního roztoku a 99 dílů mobilní fáze. Výsledkem byly vzorky zředěné 100x.

4.3.3. Příprava pufru

Jako pufr jsem používal 0,025M roztok KH_2PO_4 o $\text{pH}=3,0$. Při delším stání se v pufru vytváří krystaly. Z tohoto důvodu se každý den práce v laboratoři připravoval čerstvý pufr.

Jedna dávka pufru měla 1 litr. Navážka 3,4 g dihydrogenfosforečnanu draselného se pomocí magnetického míchadla rozpustila v ultračisté vodě. Po rozpuštění bylo nutné upravit pH několika kapkami kyseliny fosforečné na požadovanou hodnotu $\text{pH}=3,0$.

Hotový pufr se za pomoci podtlaku přefiltroval přes membránový filtr Supelco Nylon 66 o velikosti pórů 0,45 μm .

4.3.4. Příprava elučních roztoků

V rámci této práce jsem hledal vhodný eluční roztok pro SPE benzimidazolů. Testované eluční roztoky byly tvořeny směsí acetonitrilu a vodné fáze v poměrech 8:2, 6:4, 4:6 a 2:8.

Používal jsem tři různé vodné fáze, které se lišily hodnotou pH . Záměrem bylo sledovat výsledky extrakce v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí.

4.3.4.1. Kyselé prostředí

Jako kyselá vodná fáze byl použit KH_2PO_4 pufr o $\text{pH}=3,0$.

4.3.4.2. Neutrální prostředí

Jako neutrální prostředí byl použit 25 mmol/l roztok octanu amonného. Potřebná navážka octanu byla rozpuštěna v příslušném množství ultračisté vody.

4.3.4.3. Zásadité prostředí

Jako zásadité prostředí byl použit 10% vodný roztok amoniaku. Byl připraven naředěním 25% zásobního roztoku ultračistou vodou.

4.3.5. SPE

Testované kolonky obsahovaly 100 mg C-8 reverzní fáze a měly objem 1ml. Jako hybnou sílu extrakce jsem používal podtlak vytvářený vakuovou pumpou. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonkou byla cca 2ml/min.

Vlastní extrakce se skládala z několika kroků:

1. Kondicionace kolonky

Kolonka byla aktivována 1 ml acetonitrilu a následně promyta 1 ml elučního činidla určeného pro extrakci.

2. Nanesení vzorku

Na kolonku byl nanesen 1 ml pracovního roztoku benzimidazolu. Proteklá mobilní fáze byla zachycena do vialky a analyzována pomocí HPLC, aby se ověřilo zachycení benzimidazolu v kolonce.

3. Promytí kolonky

Jako promývací roztok byl použit 1 ml ultračisté vody. Po průchodu kolonkou byla voda zachycena do vialky a za pomoci HPLC se sledovalo, zda nedošlo k vymytí benzimidazolu z kolonky.

4. Eluce

Vymytí benzimidazolu z kolonky se provádělo 1 ml příslušného elučního činidla. Extrakci jsem prováděl dvakrát, abych ověřil, že došlo k vymytí už prvním mililitrem elučního činidla. Výsledek extrakce byl ověřen pomocí HPLC.

4.3.6. Vlastnosti testovaných látek

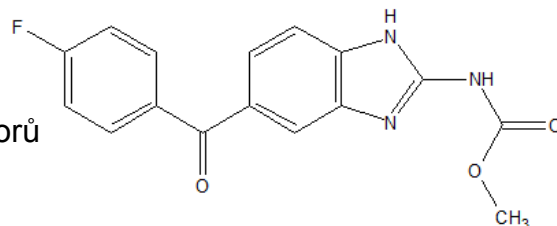
Následující odstavce neobsahují kompletní výčet fyzikálních a chemických vlastností. Uvádím zde charakteristiky sledovaných látek, které mohou ovlivnit průběh extrakce.

4.3.6.1. Flubendazol

$M_r = 313,28$ Lipofilita $\log P = 3,052$

$pK_a = 10,66$

Molekula obsahuje 2 donory a 5 akceptorů
vodíkových vazeb. [17, 19]

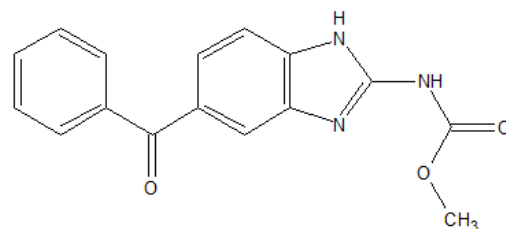


4.3.6.2. Mebendazol

$M_r = 295,29$ Lipofilita $\log P = 2,888$

$pK_a = 10,52$

Molekula obsahuje 2 donory a 4 akceptory
vodíkových vazeb. [18, 20]

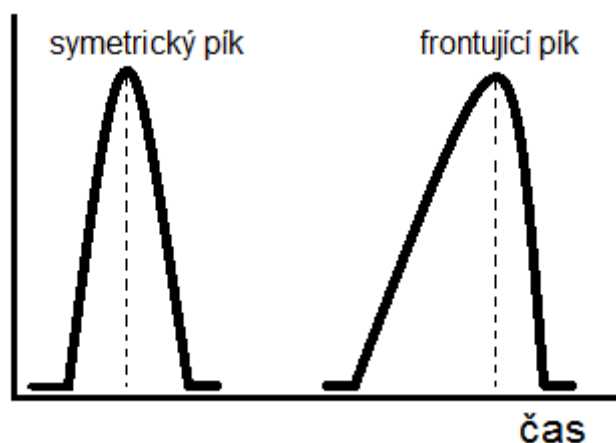


Mebendazol se používá při SPE a HPLC jako vnitřní standard pro flubendazol. Vnitřní standard musí být stálá látka, která nereaguje s testovanou látkou a na chromatogramu má samostatný pík poblíž píku testované látky.

5. Výsledky

Ve své práci jsem testoval vliv různého složení elučního činidla na průběh extrakce. Část vzorků proto obsahovala vyšší koncentraci ACN než mobilní fáze v HPLC. Rozpouštědlo těchto vzorků by tak mělo větší eluční sílu než mobilní fáze a docházelo by k rozmytí píku, který by nebyl symetrický. Příklad rozmytého, tzv. frontujícího, píku je na obrázku 5.1.

Proto jsem před nástřikem vzorku na chromatograf provedl úpravu složení rozpouštědla všech vzorků tak, aby odpovídalo složení mobilní fáze. Tím došlo k naředění vzorku, se kterým se při výpočtu výtěžku extrakce počítá.



Obrázek 5.1: Frontující pík

5.1. Extrakce v neutrálním prostředí

Jako první jsem provedl extrakci v neutrálním prostředí. Jednotlivá eluční činidla se lišila poměrem ACN a 25 mmol/l roztoku octanu amonného. Seznam použitých elučních činidel je uveden v tabulce 1.

Eluční činidlo	N1	N2	N3	N4
ACN (díly)	8	6	4	2
⊖ CH ₃ COONH ₄ (díly)	2	4	6	8

Tabulka 1: Složení použitých elučních činidel

5.1.1. Flubendazol

Na kolonky byly nanášeny 100x zředěné pracovní roztoky. Extrakci jsem prováděl s každým elučním roztokem dvakrát.

Eluční činidlo N1:

Výsledky extrakce při použití elučního činidla N1 shrnuje tabulka 2.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N1 [%]	Druhá eluce N1 [%]	Σ N1 [%]
1.	100	0	215	0	215
2.	100	0	221	0	221

Tabulka 2: Extrakce činidlem N1

Po nanesení vzorků na kolonky došlo k úplnému zachycení FLU a při promývání kolonky vodou nedošlo k uvolnění navázaného FLU. Výsledky eluce jsou ale neuspokojivé.

Eluční činidlo N2:

Výsledky extrakce elučním činidlem N2 shrnuje tabulka 3.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N2 [%]	Druhá eluce N2 [%]	Σ N2 [%]
1.	100	0	102	0	102
2.	100	0	120	0	120

Tabulka 3: Extrakce činidlem N2

U elučního činidla N2 opět proběhly fáze zachycení a promývání bez problémů. Výtěžky elucí byly lepší, ale výsledky mají poměrně velký rozptyl.

Eluční činidlo N3:

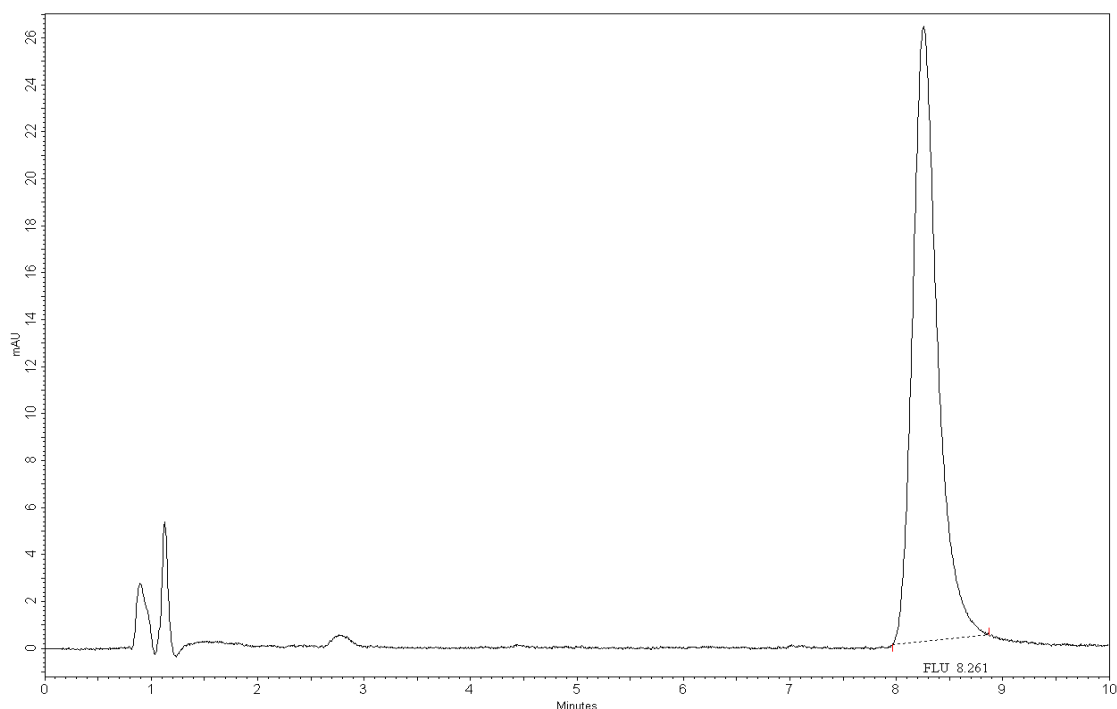
Výsledky extrakce elučním činidlem N3 shrnuje tabulka 4.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N3 [%]	Druhá eluce N3 [%]	Σ N3 [%]
1.	100	0	105	85	190
2.	100	0	22	99	121

Tabulka 4: Extrakce činidlem N3

Fáze zachycení a promývání opět proběhly bez problémů. Poměrně problematická je ale eluce. Nestáčí 1 ml elučního činidla pro vymytí FLU a navíc jsou výsledky neuspokojivé.

Chromatografické záznamy obou elučních kroků při první extrakci jsou uvedeny na obrázcích 5.2 a 5.3.

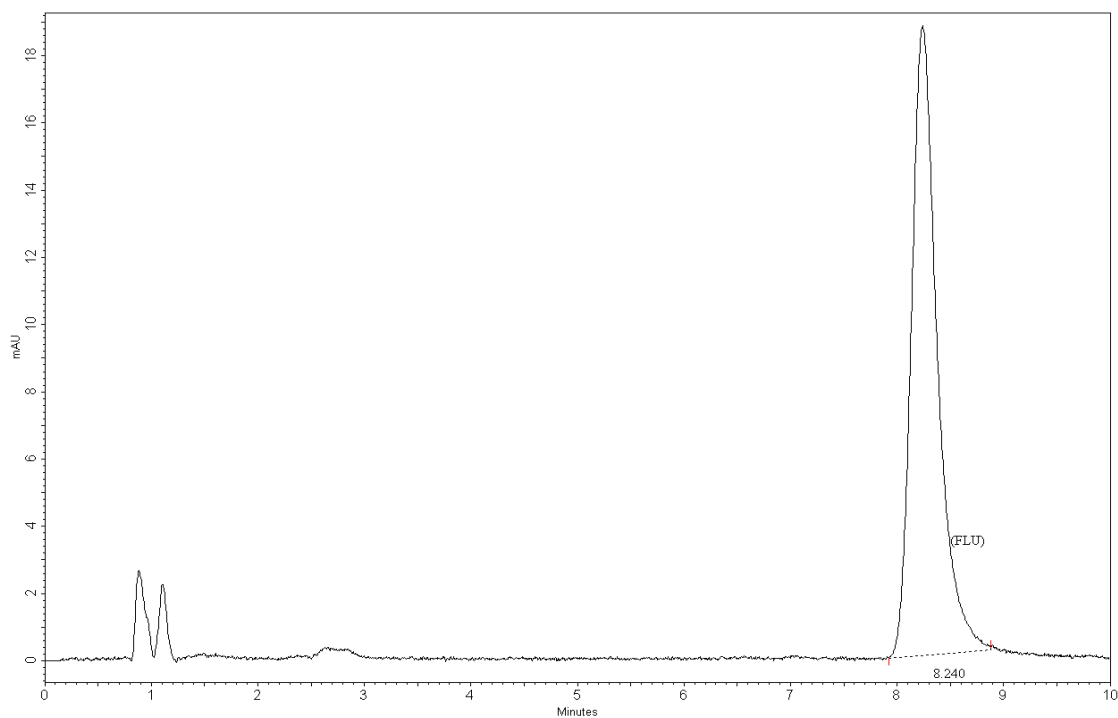


Obrázek 5.2: První eluce FLU činidlem N3

Chromatogram byl pořízen při 246nm.

Retenční čas (R_t) FLU byl 8,26 min.

Plocha pod píkem (AUC) byla 441 072.



Obrázek 5.3: Druhá eluce FLU čidlem N3

Chromatogram byl pořízen při 246nm.

$R_t = 8,24 \text{ min}$ $AUC = 357\,058$

Eluční čidlo N4:

Výsledky extrakce jsou shrnuty v tabulce 5.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N4 [%]	Druhá eluce N4 [%]	Σ N4 [%]
1.	100	0	0	0	0
2.	100	0	0	0	0

Tabulka 5: Extrakce čidlem N4

Eluční čidlo N4 nedokáže z kolonky vymýt FLU.

5.1.2. Mebendazol

Pro následující vzorky jsem se rozhodl vyzkoušet extrakci při nižších koncentracích. Pracovní roztoky jsou naředěny 600x. Extrakce každým činidlem proběhla dvakrát.

Eluční činidlo N1:

Výsledky extrakce jsou shrnuty v tabulce 6.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N1 [%]	Druhá eluce N1 [%]	Σ N1 [%]
1.	100	0	187	0	187
2.	100	0	148	0	148

Tabulka 6: Extrakce činidlem N1

Podobně jako u FLU probíhaly fáze zachycení a promývání bez problémů a stejně byly při použití činidla N1 pro eluci MBZ výtěžky vysoko nad 100%.

Eluční činidlo N2:

Výsledky extrakce jsou shrnuty v tabulce 7.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N2 [%]	Druhá eluce N2 [%]	Σ N2 [%]
1.	100	0	21	0	21
2.	100	0	9	18	27

Tabulka 7: Extrakce činidlem N2

Fáze zachycení a promývání proběhla bez problémů. Výtěžky eluce jsou ale příliš nízké. Činidlo N2 není pro MBZ vhodné.

Eluční činidlo N3:

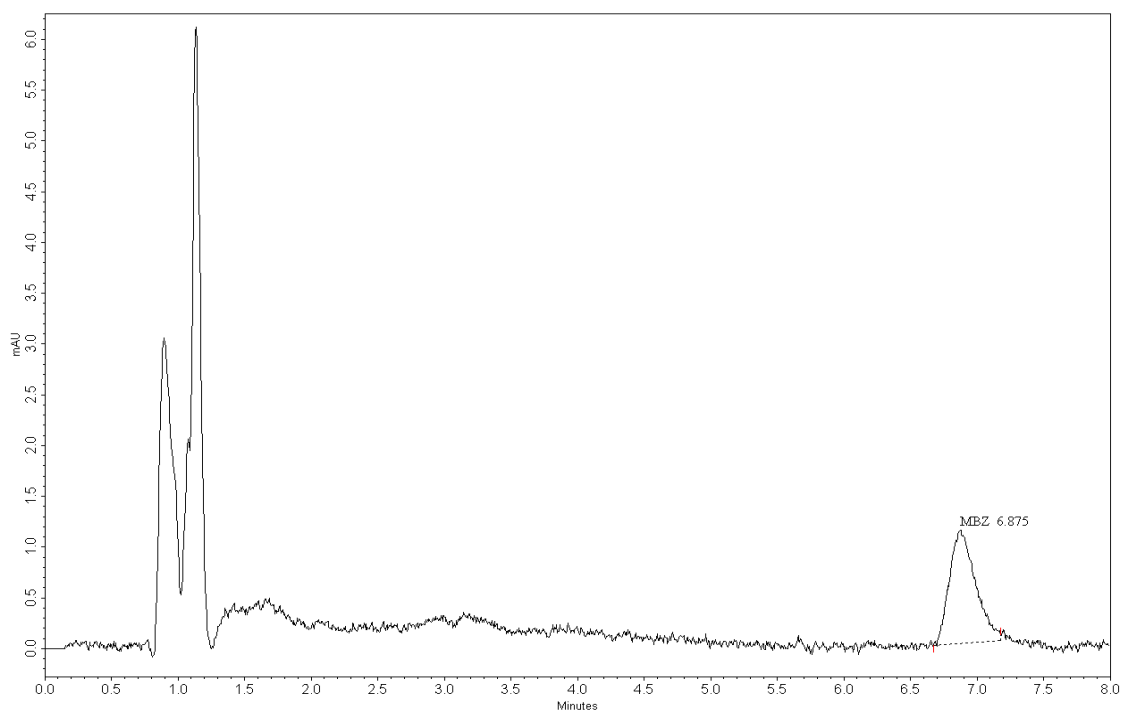
Výsledky extrakce jsou shrnuty v tabulce 8.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N3 [%]	Druhá eluce N3 [%]	Σ N3 [%]
1.	100	0	35	0	35
2.	100	0	52	0	52

Tabulka 8: Extrakce činidlem N3

Výsledky při použití elučního činidla N3 byly lepší než u činidla N2, ale stále příliš nízké.

Chromatogram eluce při první extrakci je uveden na obrázku 5.4.



Obrázek 5.4: První eluce MBZ činidlem N3

Chromatogram byl pořízen při 246nm.

$R_t = 6,86 \text{ min}$ $AUC = 18\,928$

Eluční činidlo N4:

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 9.

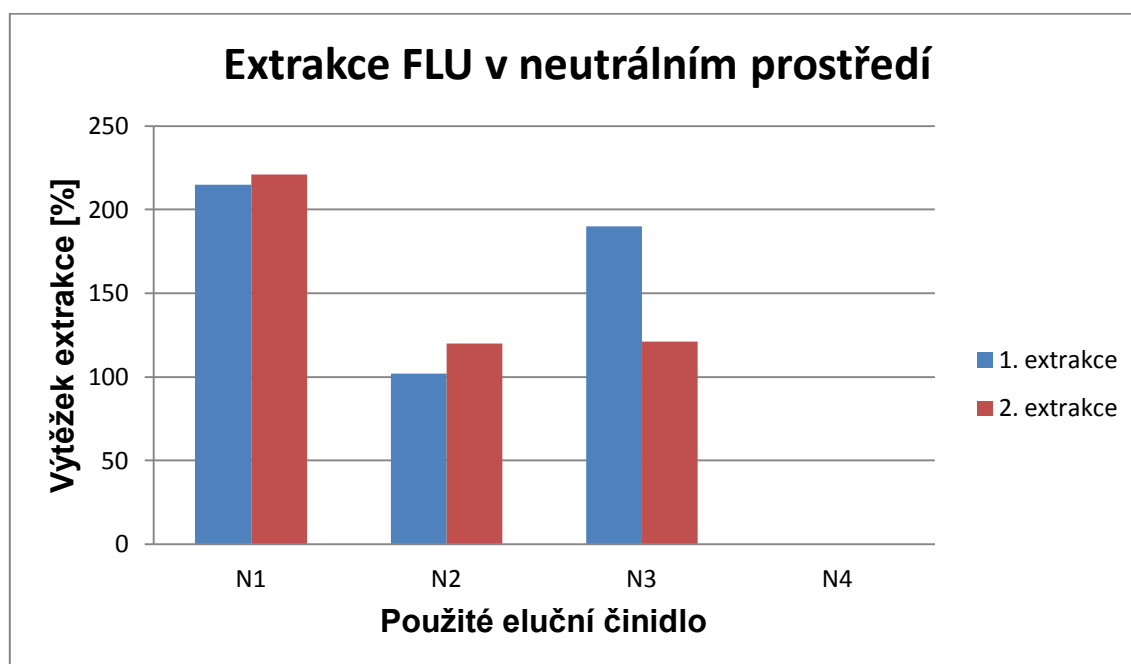
Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce N4 [%]	Druhá eluce N4 [%]	Σ N4 [%]
1.	100	0	0	0	0
2.	100	0	0	0	0

Tabulka 9: Extrakce činidlem N4

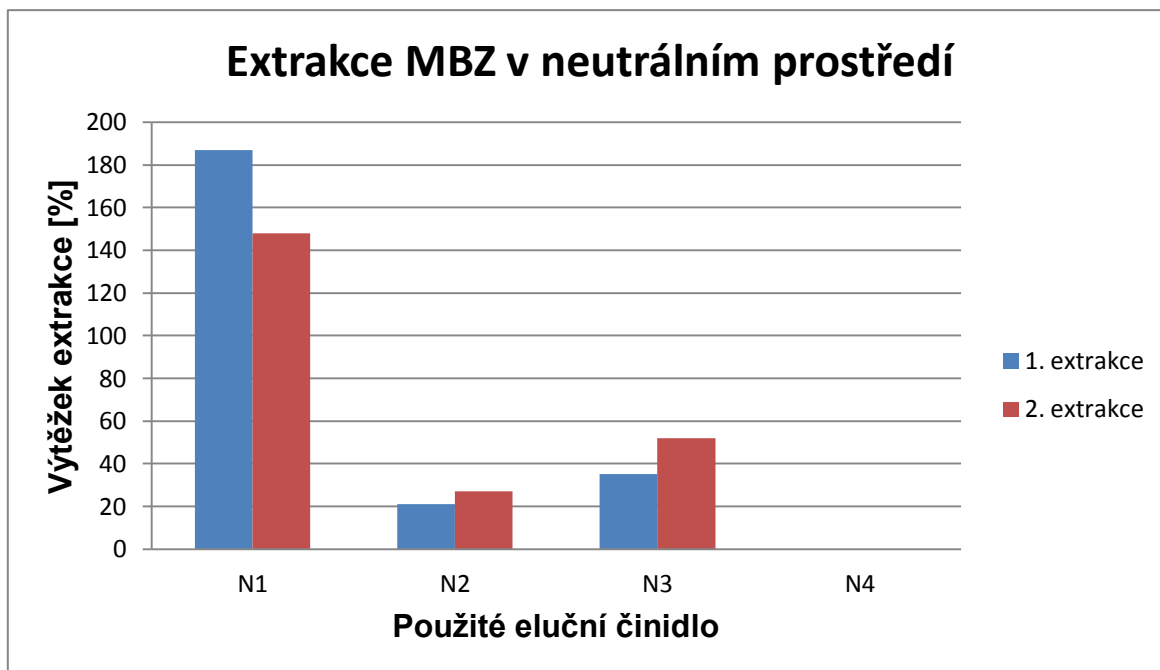
Stejně jako u FLU ani zde nedošlo při použití elučního činidla N4 k eluci MBZ z kolonky.

5.1.3. Shrnutí extrakce v neutrálním prostředí

Výsledky jednotlivých extrakcí v neutrálním prostředí shrnují grafy I a II.



Graf I: Výsledky extrakce FLU v neutrálním prostředí



Graf II: Výsledky extrakce MBZ v neutrálním prostředí

Žádné z doposud použitých elučňích činidel neposkytovalo dostatečně kvalitní výsledky. Proto jsem se rozhodl pokračovat dále extrakcí v kyselém prostředí.

5.2. Extrakce v kyselém prostředí

Eluční činidla byla tvořena ACN a 0,025M KH_2PO_4 pufrům o $\text{pH} = 3,0$ v různých poměrech. Seznam elučních činidel je uveden v tabulce 10.

Eluční činidlo	K1	K2	K3	K4
ACN (díly)	8	6	4	2
Pufr (díly)	2	4	6	8

Tabulka 10: Složení použitých elučních činidel

5.2.1. Flubendazol

Pro extrakci FLU v kyselém prostředí jsem opět použil zředění vzorků 100x.

Eluční činidlo K1:

Výsledky extrakce shrnuje tabulka 11.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K1 [%]	Druhá eluce K1 [%]	Σ K1 [%]
1.	100	0	102	0	102
2.	100	0	48	0	48

Tabulka 11: Extrakce činidlem K1

I v kyselém prostředí docházelo k úplnému zachycení FLU po nanesení na kolonku. Vodou se FLU nevymýval. K1 se ale jako eluční roztok neosvědčil. Rozptyl výtěžků byl příliš velký.

Eluční činidlo K2:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K2 [%]	Druhá eluce K2 [%]	Σ K2 [%]
1.	100	0	74	0	74
2.	100	0	29	0	29

Tabulka 12: Extrakce činidlem K2

Při použití K2 jako elučního činidla jsem opět nedosáhl kvalitních výsledků. Výtěžky byly příliš nízké a navíc s velkým rozptylem.

Eluční činidlo K3:

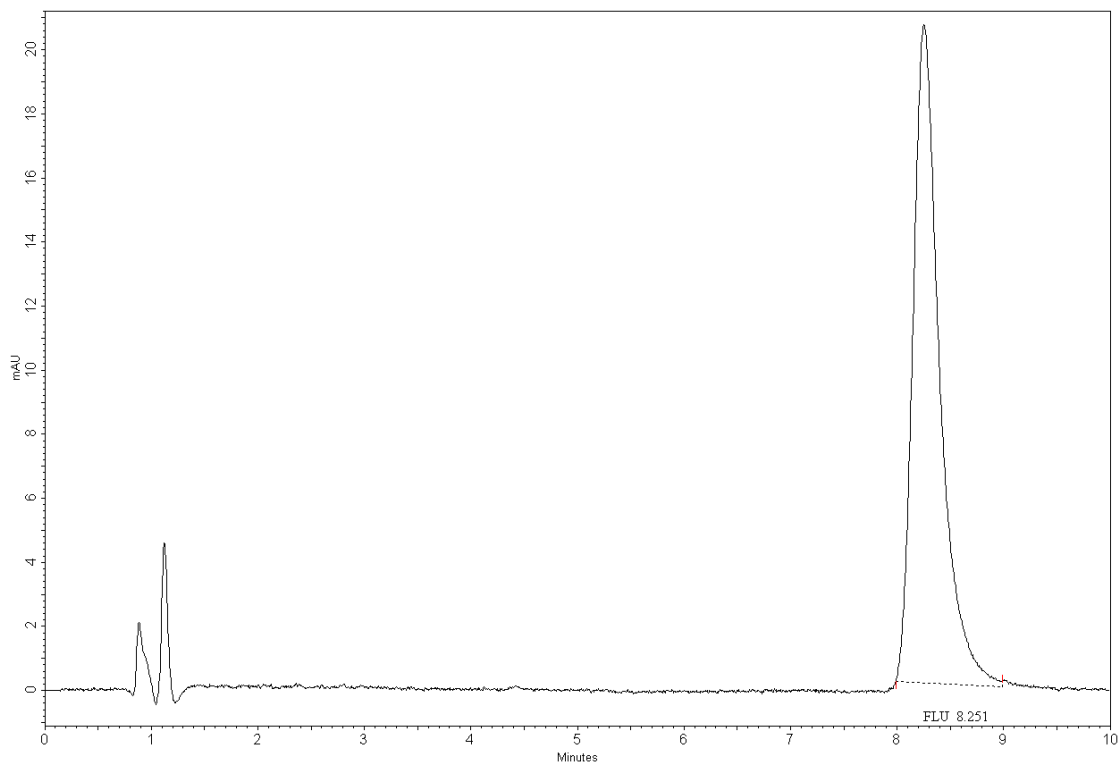
Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K3 [%]	Druhá eluce K3 [%]	Σ K3 [%]
1.	100	0	105	0	105
2.	100	0	72	19	91

Tabulka 13: Extrakce činidlem K3

První extrakce činidlem K3 poskytla nadějný výsledek. Ten se ale při druhé extrakci nepotvrdil. Pro dosažení podobného výtěžku bylo zapotřebí dvojího promytí kolonky.

Ukázka chromatogramu z první extrakce je na obrázku 5.5.



Obrázek 5.5: První eluce FLU čidlem K3

Chromatogram byl pořízen při 246nm.

$R_t = 8,25 \text{ min}$ $AUC = 503\,998$

Eluční čidlo K4:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 14.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K4 [%]	Druhá eluce K4 [%]	Σ K4 [%]
1.	100	0	0	0	0
2.	100	0	0	0	0

Tabulka 14: Extrakce čidlem K4

Podobně jako tomu bylo u elučního čidla N4, ani K4 nemělo dostatečnou eluční sílu k uvolnění zadrženého FLU.

5.2.2. Mebendazol

Pro testování extrakce MBZ v kyselém prostředí jsem se vrátil ke vzorkům řaděným 100x. Každé eluční činidlo bylo testováno dvakrát.

Eluční činidlo K1:

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 15.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K1 [%]	Druhá eluce K1 [%]	Σ K1 [%]
1.	100	0	120	0	120
2.	100	0	91	0	91

Tabulka 15: Extrakce činidlem K1

Použití elučního činidla K1 vedlo k relativně dobrým výtěžkům, ale s velkým rozptylem. Navíc toto činidlo nedosáhlo podobných výsledků u FLU, proto jsem ho označil za nevhodné.

Eluční činidlo K2:

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 16.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K2 [%]	Druhá eluce K2 [%]	Σ K2 [%]
1.	100	0	120	0	120
2.	100	0	162	0	162

Tabulka 16: Extrakce činidlem K2

Výtěžky extrakce pomocí činidla K2 vyšly vysoko nad 100% a navíc s velkým rozptylem. Proto není toto činidlo pro extrakci vhodné.

Eluční činidlo K3:

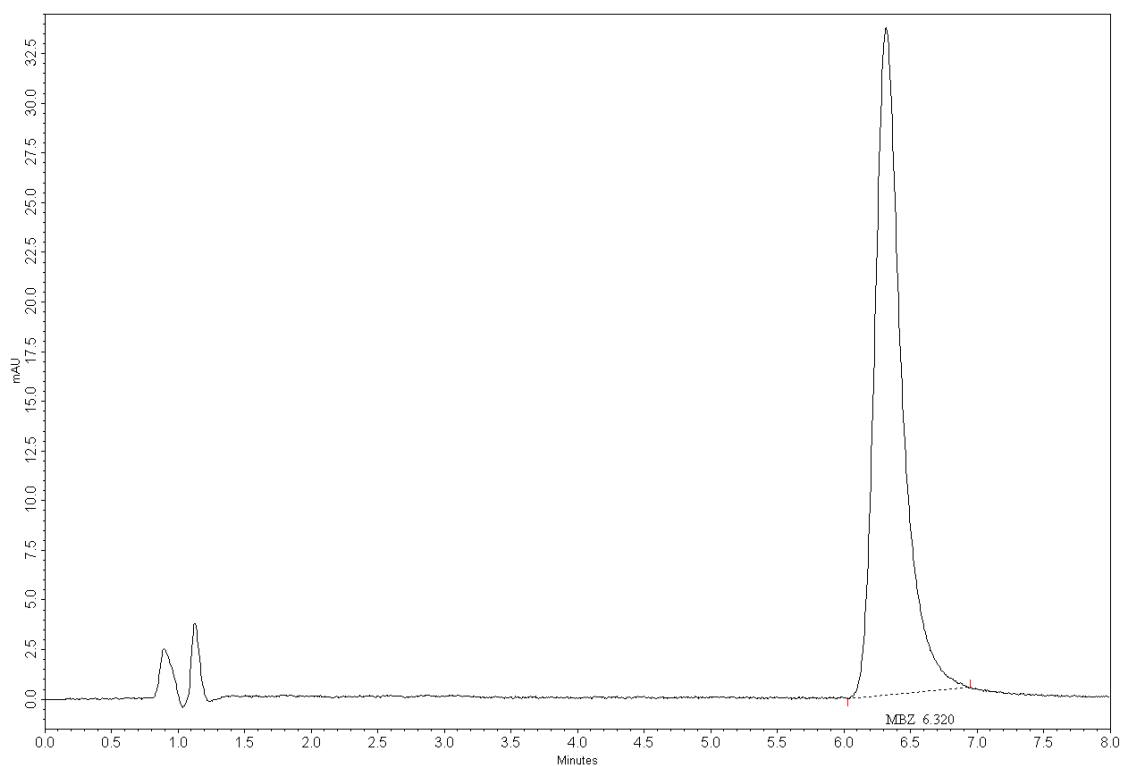
Výsledky jsou uvedeny v tabulce 17.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K3 [%]	Druhá eluce K3 [%]	Σ K3 [%]
1.	100	0	136	0	136
2.	100	0	102	0	102

Tabulka 17: Extrakce činidlem K3

Výsledky extrakce MBZ činidlem K3 vypadaly obdobně jako u FLU. Jednotlivé extrakce měly příliš velký rozptyl mezi výtěžky.

Na obrázku 5.6 je chromatogram eluce první extrakce.



Obrázek 5.6: První eluce MBZ činidlem K3

Chromatogram byl pořízen při 246nm.

$R_t = 6,32 \text{ min}$ $AUC = 634 \ 144$

Eluční činidlo K4:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 18.

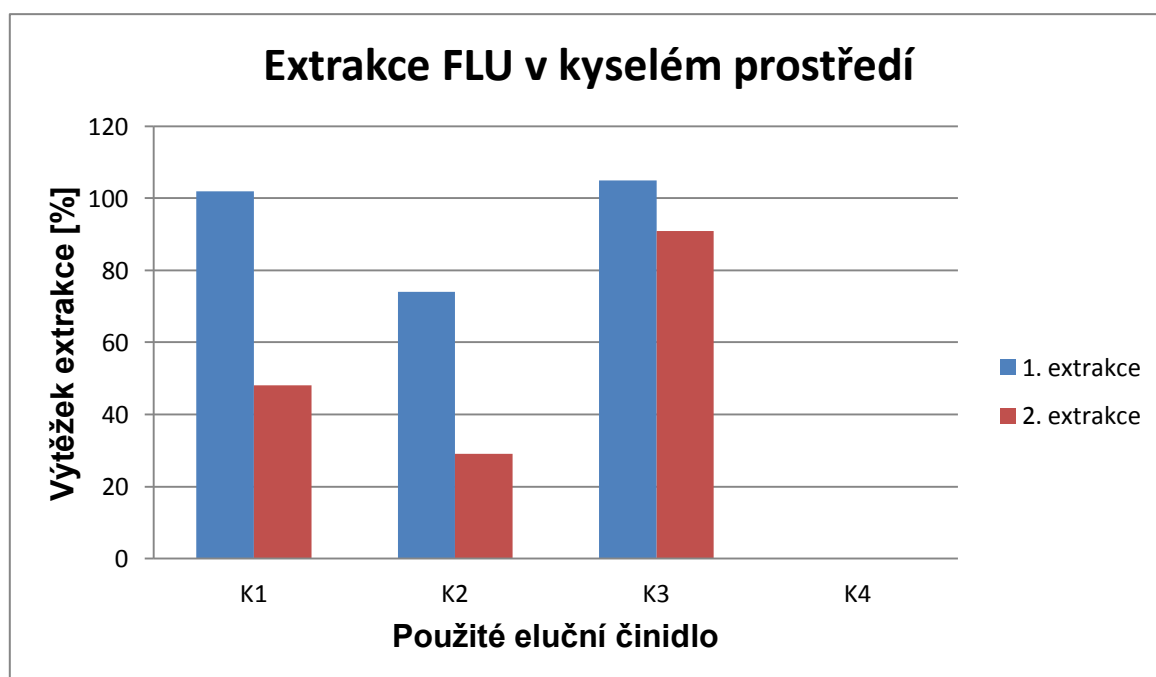
Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce K4 [%]	Druhá eluce K4 [%]	Σ K4 [%]
1.	100	0	0	0	0
2.	100	0	0	0	0

Tabulka 18: Extrakce činidlem K4

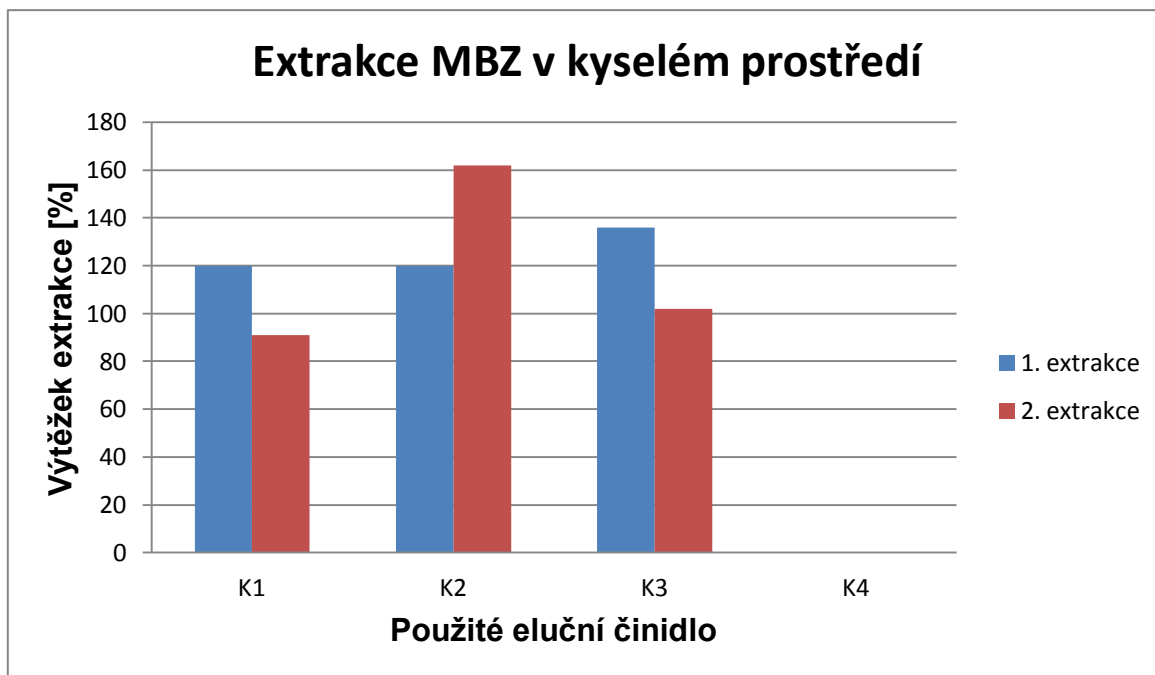
Provedení extrakce činidlem K4 u MBZ opět potvrdilo, že toto eluční činidlo nestačí na vymytí benzimidazolu z kolonky.

5.2.3. Shrnutí extrakce v kyselém prostředí

Výsledky jednotlivých extrakcí v kyselém prostředí shrnují grafy III a IV.



Graf III: Výsledky extrakce FLU v kyselém prostředí



Graf IV: Výsledky extrakce MBZ v kyselém prostředí

Ani v případě extrakce v kyselém prostředí nebylo možné označit některé z elučních činidel jako vhodné.

Proto jsem pokračoval se sérií extrakcí v zásaditém prostředí.

5.3. Extrakce v zásaditém prostředí

V případě extrakcí v zásaditém prostředí jsem jako eluční činidla používal směsi ACN a 10% roztoku amoniaku. Seznam elučních činidel je uveden v tabulce 19.

Eluční činidlo	Z1	Z2	Z3	Z4
ACN (díly)	8	6	4	2
⊖ NH ₃ (díly)	2	4	6	8

Tabulka 19: Složení použitých elučních činidel

5.3.1. Flubendazol

Pro extrakci FLU v zásaditém prostředí jsem použil 100x pracovní roztoky. Každé eluční činidlo je testováno dvakrát.

Eluční činidlo Z1:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 20.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z1 [%]	Druhá eluce Z1 [%]	Σ Z1 [%]
1.	100	0	161	0	161
2.	100	0	132	0	132

Tabulka 20: Extrakce činidlem Z1

I v zásaditém prostředí docházelo k úplnému zachycení FLU v kolonce. Vodou se FLU nevymýval. Při použití elučního činidla Z1 pro extrakci FLU byly ale oba výtěžky extrakce vysoko nad 100% a navíc s velkým rozptylem. Z tohoto důvodu není Z1 vhodným elučním činidlem.

Eluční činidlo Z2:

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 20.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z2 [%]	Druhá eluce Z2 [%]	Σ Z2 [%]
1.	100	0	191	0	191
2.	100	0	170	0	170

Tabulka 20: Extrakce činidlem Z2

Eluční činidlo Z2 poskytovalo extrémně vysoké výtěžky extrakce s velkým rozptylem. Proto není pro extrakci vhodné.

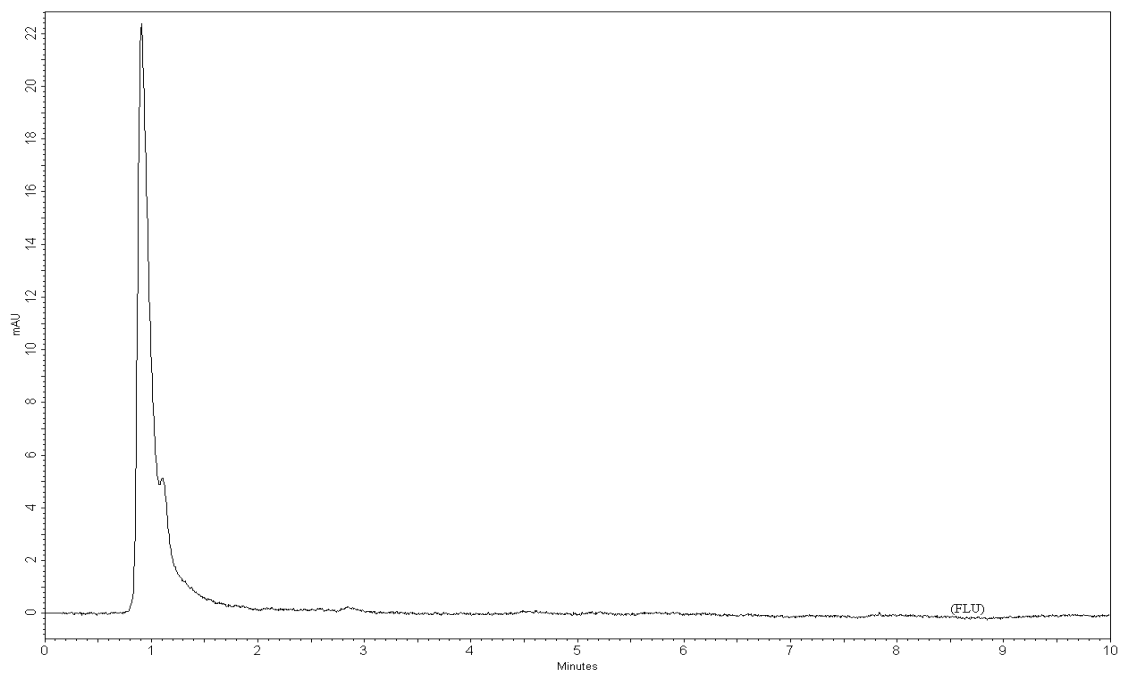
Eluční činidlo Z3:

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 21.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z3 [%]	Druhá eluce Z3 [%]	Σ Z3 [%]
1.	100	0	100	0	100
2.	100	0	105	0	105

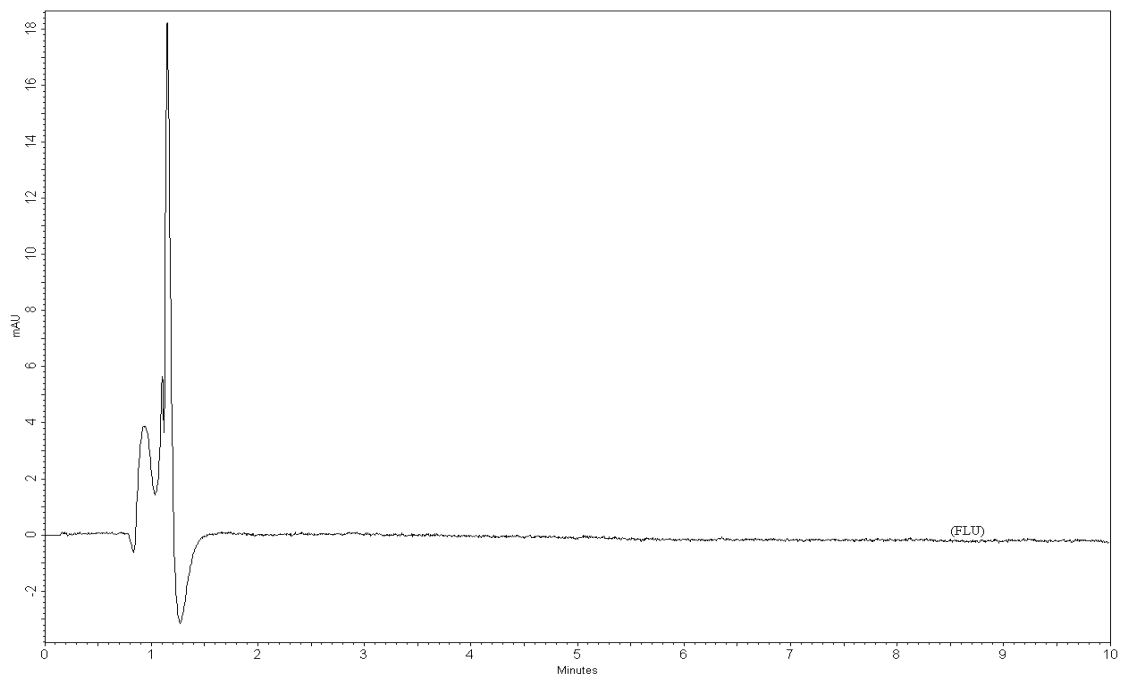
Tabulka 21: Extrakce činidlem Z3

Při použití elučního činidla Z3 jsem získal velmi dobré výtěžky extrakce. Jako ilustraci zde uvádím na obrázcích 5.7 - 5.10 chromatogramy z průběhu extrakce. Všechny uvedené chromatogramy byly zaznamenány při 246 nm.



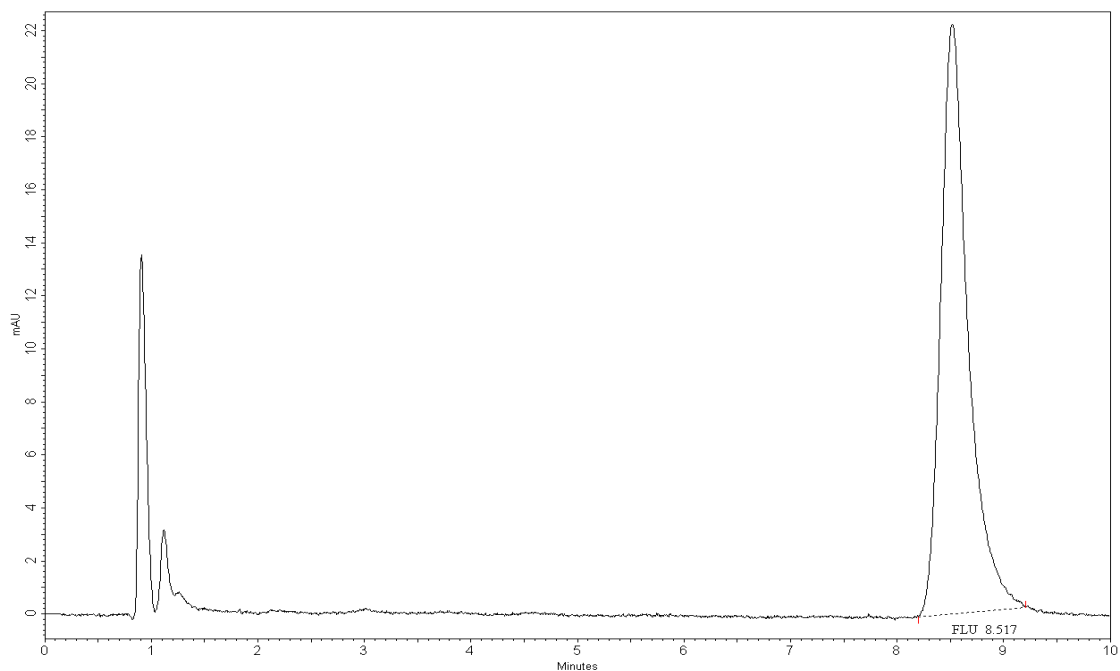
Obrázek 5.7: Chromatogram rozpouštědla vzorku po nanesení na kolonku

V oblasti mezi osmou a devátou minutou by se měl nacházet pík FLU. Na chromatogramu se pík FLU nevyskytuje.



Obrázek 5.8: Chromatogram po promytí kolonky vodou

V oblasti mezi osmou a devátou minutou opět pík FLU chybí.

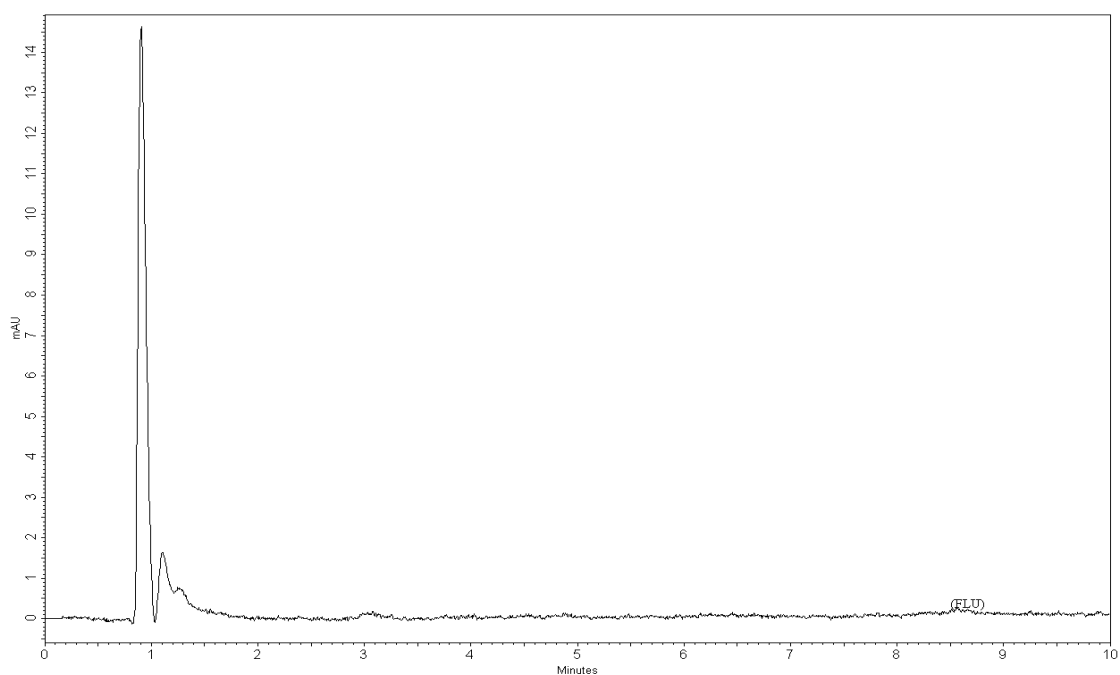


Obrázek 5.9: První promytí kolonky elučním činidlem Z3

Pík FLU

$R_t = 8,52 \text{ min}$

$AUC = 492\ 847$



Obrázek 5.10: Druhé promytí kolonky elučním činidlem Z3

Při druhém promytí kolonky elučním činidlem Z3 se na chromatogramu žádný pík FLU nevyskytuje. Z výtěžku je patrné, že došlo k eluci FLU už prvním mililitrem elučního činidla.

Eluční činidlo Z4:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 22.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z4 [%]	Druhá eluce Z4 [%]	Σ Z4 [%]
1.	100	0	6	0	6
2.	100	0	0	0	0

Tabulka 22: Extrakce činidlem Z4

Ani v zásaditém prostředí nemá činidlo Z4 dostatečnou eluční sílu pro vymytí FLU z kolonky.

5.3.2. Mebendazol

Pro zásadité prostředí jsem použil opět pracovní roztoky MBZ zředěné 100x. Každé eluční činidlo bylo zkoušeno dvakrát.

Eluční činidlo Z1:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 23.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z1 [%]	Druhá eluce Z1 [%]	Σ Z1 [%]
1.	100	0	134	0	134
2.	100	0	124	0	124

Tabulka 23: Extrakce činidlem Z1

Eluce MBZ činidlem Z1 poskytovala výtěžky relativně vysoko nad 100%. V kombinaci s výsledky Z1 u FLU ho nelze považovat za vhodné eluční činidlo.

Eluční činidlo Z2:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 24.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z2 [%]	Druhá eluce Z2 [%]	Σ Z2 [%]
1.	100	0	122	0	122
2.	100	0	136	0	136

Tabulka 24: Extrakce činidlem Z2

Činidlo Z2 opět poskytovalo výtěžky relativně vysoko nad 100%. V kombinaci s extrémními výtěžky tohoto činidla u FLU bylo Z2 označeno za nevhodné.

Eluční činidlo Z3:

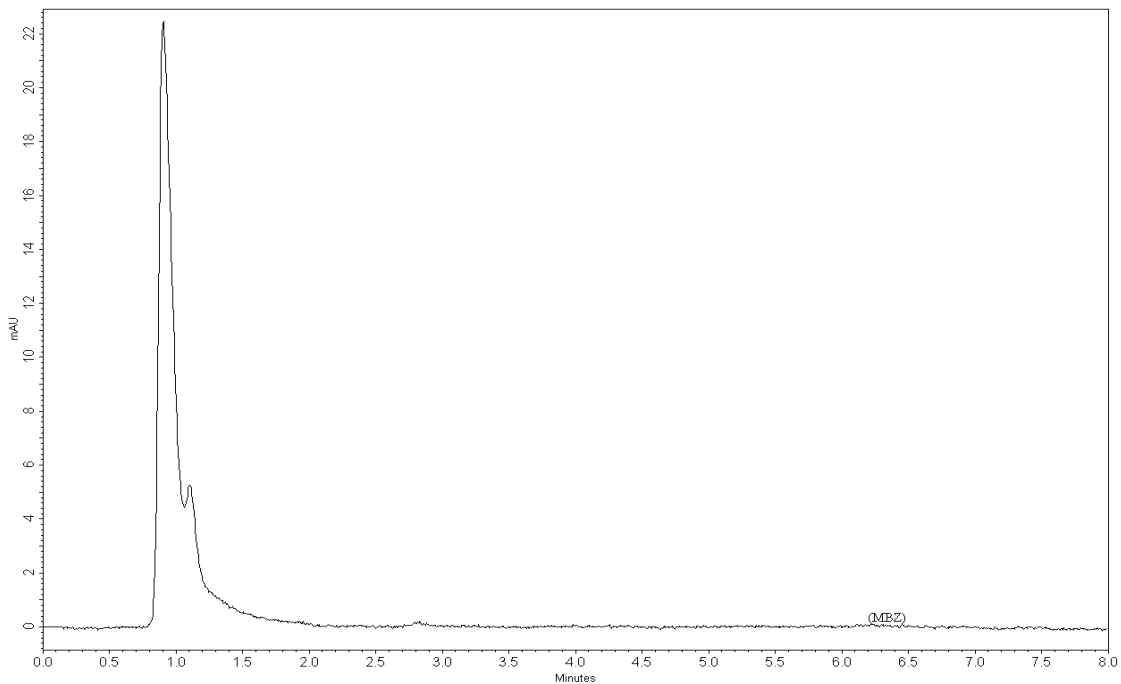
Výsledky shrnuje tabulka 25.

Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z3 [%]	Druhá eluce Z3 [%]	Σ Z3 [%]
1.	100	0	107	0	107
2.	100	0	114	0	114

Tabulka 25: Extrakce činidlem Z3

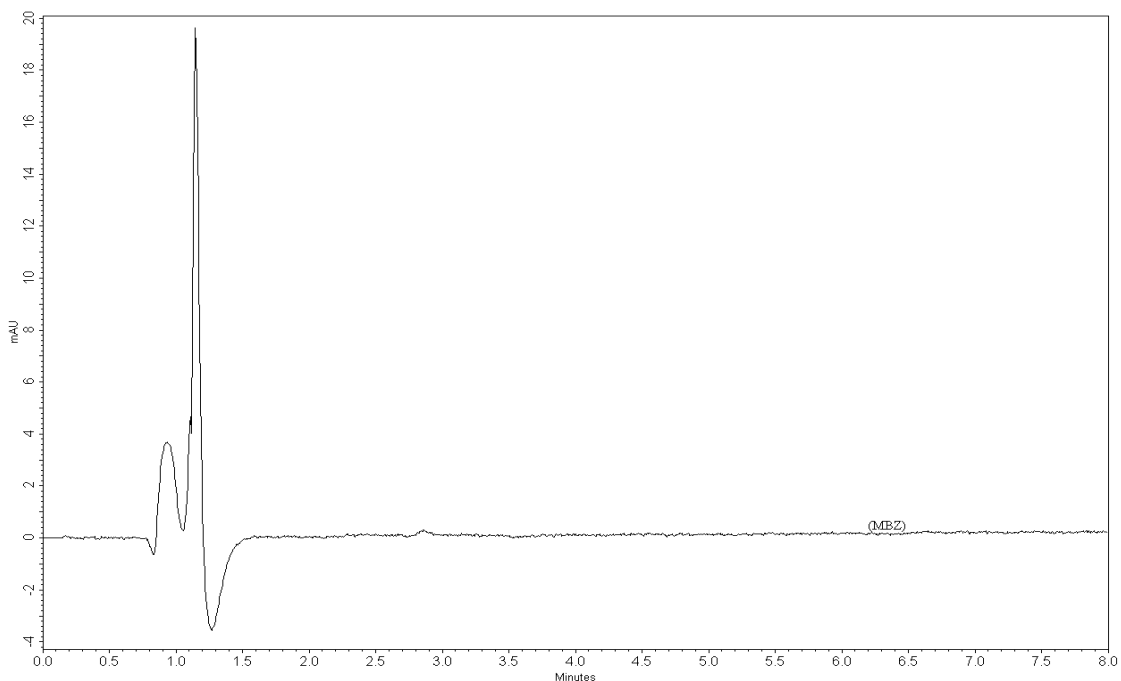
Stejně jako u FLU poskytovalo eluční činidlo Z3 u MBZ dobré výtěžky extrakce. Oba výtěžky byly lehce nad 100% a blízko u sebe.

Průběh celé extrakce ilustrují chromatogramy na obrázcích 5.11 - 5.14. Všechny chromatogramy byly zaznamenány při 246 nm.



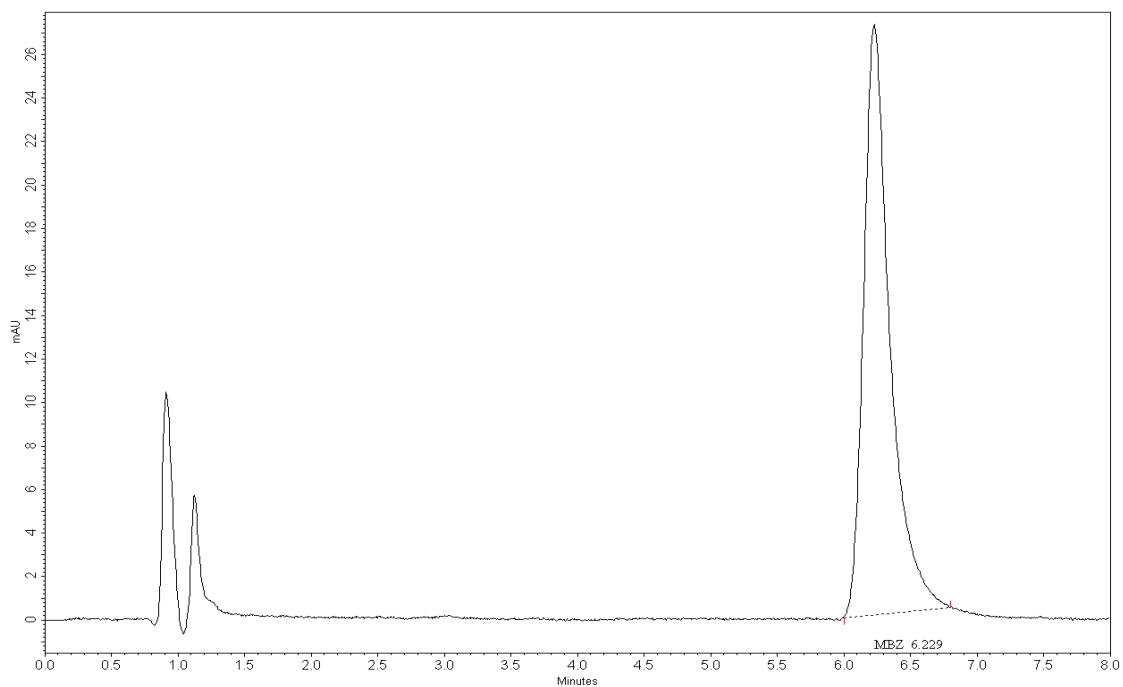
Obrázek 5.11: Chromatogram rozpouštědla vzorku po nanesení na kolonku

V oblasti mezi šestou a sedmou minutou by se měl nacházet pík MBZ. Z chromatogramu je patrné, že zde žádný pík není.



Obrázek 5.12: Chromatogram po promytí kolonky vodou

Pík MBZ opět chybí. MBZ tedy zůstal zadrženy v kolonce.

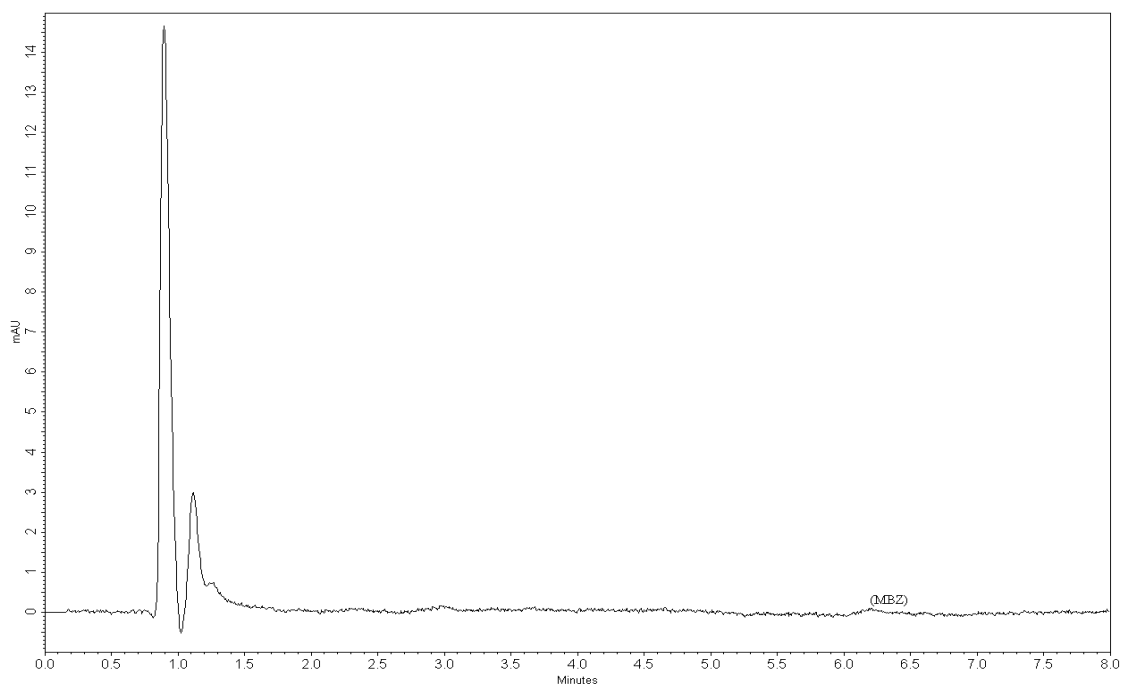


Obrázek 5.13: První promytí kolonky elučním činidlem Z3

Pík MBZ

$R_t = 6,23 \text{ min}$

$AUC = 537\,450$



Obrázek 5.14: Druhé promytí kolonky činidlem Z3

V oblasti okolo retenčního času MBZ se nevyskytuje žádný zřetelný pík.

Eluční činidlo Z4:

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 26.

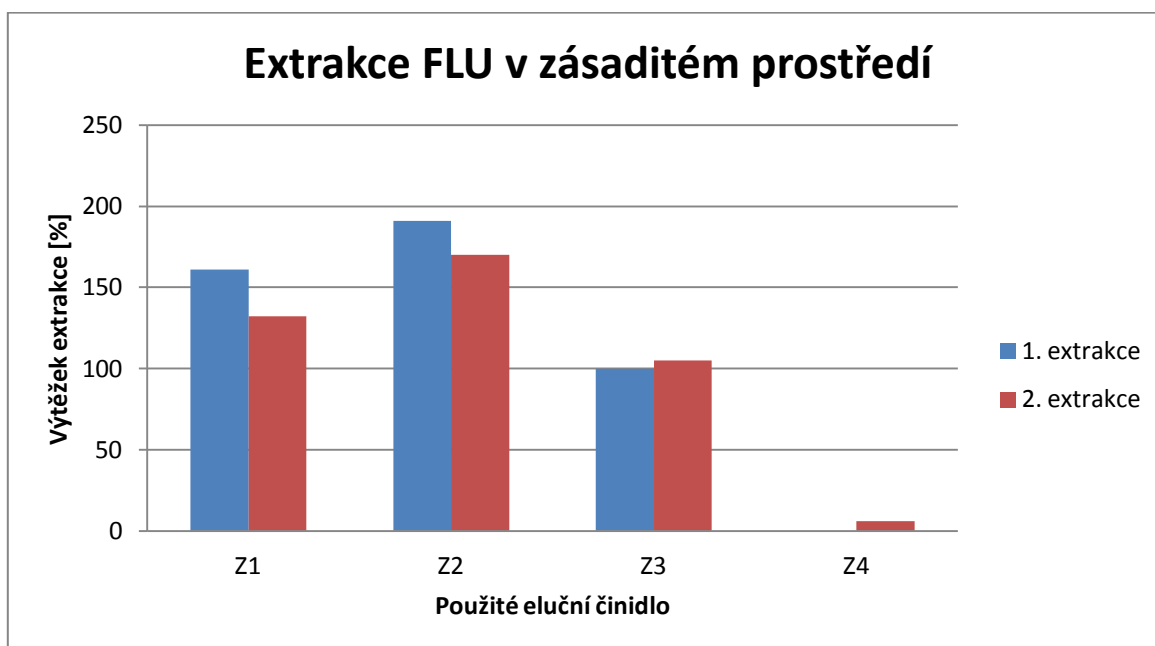
Extrakce	Zachyceno po nanesení [%]	Vymyto promývacím roztokem [%]	První eluce Z4 [%]	Druhá eluce Z4 [%]	Σ Z4 [%]
1.	100	0	0	0	0
2.	100	0	0	0	0

Tabulka 26: Extrakce činidlem Z4

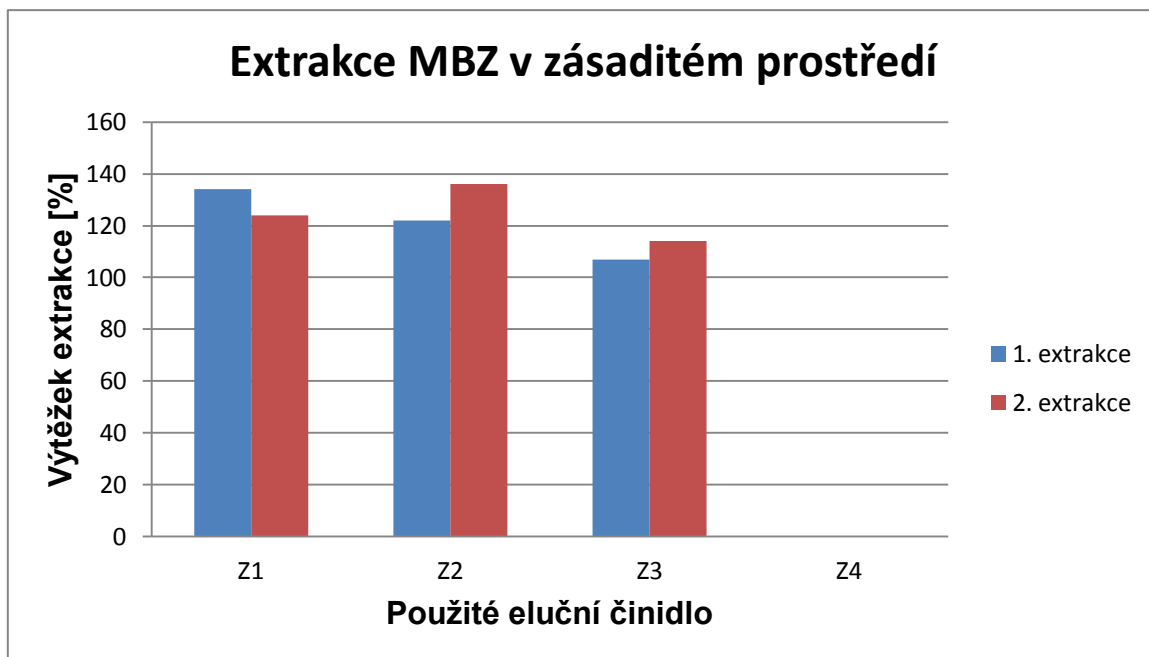
I poslední extrakce provedené s činidlem Z4 potvrdily, že jeho eluční síla není dostatečná a jeho použití je tedy nemožné.

5.3.3. Shrnutí extrakce v zásaditém prostředí

Výsledky provedených extrakcí v zásaditém prostředí shrnují grafy V a VI.



Graf V: Výsledky extrakce FLU v zásaditém prostředí



Graf VI: Výsledky extrakce MBZ v zásaditém prostředí

Z výše uvedených dat vyplynulo, že ze všech testovaných elučních činidel poskytuje nejkvalitnější výsledky roztok Z3.

Toto eluční činidlo je tvořeno směsí 4 dílů ACN a 6 dílů 10% roztoku amoniaku.

5.4. Správnost a opakovatelnost metody

U zvolené metody extrakce pomocí elučního činidla Z3 jsem provedl výpočet správnosti a opakovatelnosti metody. Oba testované benzimidazoly jsem extrahoval vybranou metodou osmkrát.

Správnost jsem vyjádřil jako výtěžnost metody. Porovnal jsem AUC po extrakci pomocí SPE s AUC příslušného standardu. Jako standard sloužil roztok benzimidazolu o stejné koncentraci, jaká byla použita při SPE.

Opakovatelnost jsem vyjádřil jako relativní směrodatnou odchylku (RSD) osmi extrakcí.

Výtěžnosti jednotlivých extrakcí jsou uvedeny v tabulce 27.

Extrakce	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	Průměr
FLU (%)	108	83	100	119	105	117	125	81	104,75
MBZ (%)	107	114	109	111	111	109	119	110	111,25

Tabulka 27: Výtěžnosti extrakcí

Při výpočtu správnosti metody by se naměřené hodnoty neměly lišit od skutečných o víc než $\pm 15\%$.

U FLU toto splnily pouze tři extrakce. Extrakce 2, 4 a 6 byly tomuto rozptylu poměrně blízko. Výkyvy od správné hodnoty byly ale v obou směrech, a to není pro poskytování správných výsledků ideální.

Naproti tomu u MBZ se do intervalu $\pm 15\%$ nevešla pouze jedna extrakce. Všechny výkyvy od správné hodnoty byly podobné a stejným směrem.

Při výpočtu opakovatelnosti metody by RSD neměla být větší než 15%. Vypočtené RSD jsou uvedeny v tabulce 28.

	RSD (%)
FLU	16,18
MBZ	3,7

Tabulka 28: Opakovatelnost metody

Výsledná RSD pro FLU byla za hranicí 15% a nesplnila tak požadovanou podmínku. Naopak RSD u MBZ je velmi dobrých 3,7% a podmínku tak s rezervou splňuje.

6. Diskuze

V rámci této práce bylo mým úkolem najít nejvhodnější eluční činidlo pro SPE zkoušených benzimidazolů. Jako činidla jsem použil směsi ACN a polární fáze, lišící se v hodnotě pH, v různých poměrech. Všechny extrakce byly prováděny na kolonkách s C8 endcappovanou reverzní fází.

Endcappování slouží k zakrytí hydroxylových funkčních skupin silikagelu, u kterých nedošlo k substituci větším oktylem. Tím se omezuje obsah hydrofilních skupin v sorbentu kolonky, ale i při opakovaném endcappování zůstává řada -OH skupin volná.

Testované benzimidazoly jsou lipofilní látky bazického charakteru a ve své struktuře obsahují funkční skupiny schopné vytvářet vodíkové můstky. Díky substituci fluorem je FLU lipofilnější než MBZ. Tento rozdíl mezi zkoušenými benzimidazoly se projevuje v hodnotách retenčních časů při HPLC.

Při všech provedených extrakcích jsem sledoval, zda jsou použité kolonky schopny zachytit testované benzimidazoly. Na žádném z chromatogramů získaných analyzováním rozpouštědla vzorku po průtoku kolonkou nebyl přítomen pík benzimidazolu. Použité kolonky zachytily nanesené analyty beze zbytku.

Rovněž při promývání kolonky vodou jsem na příslušných chromatogramech nenašel pík sledovaných látek. Voda tedy benzimidazoly z kolonky nedokázala vymýt.

Při hledání vhodného elučního činidla jsem začal extrakcemi v neutrálním prostředí. Vyzkoušel jsem čtyři různé poměry ACN a roztoku octanu amonného. Žádné z těchto elučních činidel ale neposkytovalo dostatečně kvalitní výsledky pro oba testované benzimidazoly.

V dalším kroku jsem se rozhodl otestovat extrakci v kyselém prostředí. Benzimidazoly mají bazický charakter a v kyselém prostředí by mělo dojít k jejich ionizaci. Vycházel jsem z teorie extrakce kapalina-kapalina, kdy je pro přechod extrahované látky do nepolární fáze zapotřebí, aby látka nebyla ionizovaná. Očekával jsem, že ionizovaný benzimidazol ztratí svou afinitu k reverzní fázi kolonky a dojde k jeho bezproblémové eluci. Vyzkoušel jsem čtyři poměry ACN a pufru o pH = 3,0. Výsledky provedených extrakcí ale mé

očekávání nenaplnily. Kromě pozměněné afinity k C8 řetězcům došlo pravděpodobně i ke zvýšené afinitě k nesubstituovaným -OH skupinám sorbentu. Rovněž se dá předpokládat i jiná afinita k elučnímu činidlu.

Nejlepších výsledků jsem nakonec dosáhl v bazickém prostředí. V tomto prostředí jsou benzimidazoly neionizované. V takovém stavu se mohou naplno uplatňovat hydrofobní interakce se sorbentem i elučním činidlem. Pro C8 kolonky se jako nejvhodnější eluční činidlo ukázala směs 4 dílů ACN a 6 dílů 10% roztoku amoniaku.

Pro toto eluční činidlo jsem provedl výpočet opakovatelnosti extrakce, která je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka osmi měření. U MBZ byla RSD = 3,7%. Naproti tomu u FLU byla RSD = 16,18%.

Při výpočtu opakovatelnosti platí, že by RSD neměla být větší než 15%. MBZ toto pravidlo splnil s rezervou, opakovatelnost pro FLU bohužel hodnotu 15% mírně přesáhla.

Pro výpočet opakovatelnosti bylo změřeno osm vzorků naráz. SPE byla prováděna "ručně" za pomoci podtlaku. I při jednotném podtlaku, který působil na všech osm kolonek, nebyla rychlost extrakce na všech kolonkách naprosto stejná. Otázkou je, zda a případně do jaké míry se toto mohlo podepsat na výsledcích při extrakci FLU.

Přestože opakovatelnost extrakce pro FLU není zcela uspokojivá, eluční činidlo tvořené směsí 4 dílů ACN a 6 dílů 10% roztoku amoniaku poskytovalo nejlepší výsledky.

Za zmínku stojí i možnost použití kolonek s jinou reverzní fází. Nejsnáze se dá odvodit chování benzimidazolů na C18 kolonkách. Reverzní fáze má podobný charakter jako mnou použitá C8, je ale lipofilnější. Proto se dá očekávat, že pro eluci benzimidazolu z této kolonky bude zapotřebí lipofilnější eluční činidlo. Toho dosáhneme větším zastoupením ACN v elučním činidle.

Možnost použití jiných sorbentů nebo elučních roztoků pro SPE benzimidazolů zůstává námětem pro další práce.

7. Závěr

Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu extrakce benzimidazolů na pevné fázi. Z výsledku vyplývá, že je nejvhodnější tuto extrakci provádět v zásaditém prostředí. Benzimidazoly jsou v neionizovaném stavu a mohou tak vznikat hydrofobní interakce.

Na použité kolonce Supelco Discovery DSC-C8 (1ml, 100mg) jsem nejlepších výsledků dosáhl s elučním činidlem tvořeným 4 díly acetonitrilu a 6 díly 10% roztoku amoniaku. Použit byl 1 ml činidla.

Pro mebendazol byly výtěžky extrakce v rozmezí 107-119%. Relativní směrodatná odchylka měření byla 3,7%.

Pro flubendazol byly výtěžky extrakce v rozmězí 81-125%. Relativní směrodatná odchylka měření byla 16,18%.

V případě mebendazolu je tedy tato metoda relativně dobře upotřebitelná. Na druhou stranu má bohužel metoda poněkud menší přesnost při extrakci flubendazolu.

8. Použité zdroje

1. BÁRTÍKOVÁ, H., et al. Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 2010, 33.1: 56-62.
2. BÁRTÍKOVÁ, H., et al. Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary parasitology*, 2012, 187.3: 473-479.
3. BIOTAGE, *Solid Phase Extraction*. Obrázek upraven. [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://biotage.phosdev.se/Graphics/9223.jpg>
4. BIOTAGE, *Solid Phase Extraction*. Obrázek upraven. [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://biotage.phosdev.se/Graphics/9222.jpg>
5. BISSET, S. A., Helminth parasites of economic importance in cattle in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* [online]. 1994, vol. 21, issue 1, p. 16 [cit. 2014-04-22]. DOI: 10.1080/03014223.1994.9517972
6. CLARK, M. A., *Lippincott's illustrated reviews: Pharmacology*. 5th ed. Baltimore, MD: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams, 2012, s. 455-459. ISBN 1451113145
7. CVILINK, V., et al. LC–MS–MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed ex vivo by *Haemonchus contortus*: revue littéraire mensuelle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, vol. 391, issue 1, pp. 337-343 [cit. 2014-04-22]. DOI: 10.1007/s00216-008-1863-9
8. ČERMÁKOVÁ, Z., et al. Parazitičtí helminti člověka. *Folia Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7.1.
9. *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
10. DUBEY, A. K., et al. Benzimidazoles in a Wormy World. *VetScan*, 2010, 5.2.
11. GILLEARD, J. S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*, 2013, 140.12: 1506-1522.

12. HARTL, J. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, s. 156-157, 159. ISBN 978-80-246-1169-3
13. HENNION, M.-C., Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, vol. 856, 1-2, p. 3-54 [cit. 2014-04-22]. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00832-8
14. JOHNSTONE, C., *Basic Nematode Life Cycle* [online]. 1998, 24.1. 2000 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Nematodes/nems_5.htm
15. KLIMEŠ J., et al.: *Kontrola léčiv I*. Praha, Karolinum, 2008, s. 36-37, 245-246
16. NOVÁKOVÁ, L., et al. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 656.1: 8-35.
17. PubChem, *Flubendazole*, [online] [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=35802&loc=ec_rcs
18. PubChem, *Mebendazole*, [online] [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4030&loc=ec_rcs
19. Santa Cruz Biotechnology, *Flubendazole*, [online] [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.scbt.com/datasheet-204754-flubendazole.html>
20. Santa Cruz Biotechnology, *Mebendazole*, [online] [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.scbt.com/datasheet-204798-mebendazole.html>
21. SIGMA ALDRICH, Co. *Guide to Solid Phase Extraction*. [online]. p. 6-8. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
22. SIGMA ALDRICH, Co. *Overview of SPE Technology*. [online]. p. 17. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Posters/1/t407048h.pdf>
23. SIGMA ALDRICH, Co. *Solid Phase Extraction Products*. [online]. [cit. 2014-04-22]. Dostupné z:

http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf

24. SIMPSON, N. J. *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2000. ISBN 082470021x
25. SKÁLOVÁ, L., et al. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2011, s. 7-9, 12, 18, 21, 80, 86. ISBN 9788024619170
26. STEJSKAL, F. Současná léčba helmintóz. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2005, 111-115.
27. THURMAN, E., et al.. *Solid-phase extraction: principles and practice*. New York: Wiley, 1998, ISBN 04-716-1422-X.
28. VOKŘÁL, I., et al. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 2012, 139.10: 1309-1316.
29. VOLF, P., et al. *Paraziti a jejich biologie*. 1. vydání. Praha: Triton, 2007, s. 141, 148-152, 179-181, 188-189, 199-204,. ISBN 978-80-738-7008-9