

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd



BIOTRANSFORMACE FENBENDAZOLU V SÓJI
(*Glycine max*)

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Bc. Lenka Martínková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

Bc. Lenka Martínková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí této diplomové práce RNDr. Lucii Raisové Stuchlíkové, Ph.D. za vedení práce, trpělivost, ochotu, a především za její přátelský přístup a konzultace. Poděkování také patří mé rodině, která mě podporovala při celém studiu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Lenka Martínková

Školitel: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Biotransformace fenbendazolu v sóji (*Glycine max*)

Veterinární léčiva jsou používána ve velkém množství v novodobém chovatelství pro léčbu a prevenci zvířecích chorob. Anthelmintika podávaná zvířatům vstupují do životního prostředí primárně stolicí nebo močí. Po vyloučení mohou léčiva přetrvávat v životním prostředí a ovlivňovat necílové organismy.

Rostliny jsou schopné přijímat xenobiotika, včetně léčiv a detoxikovat je biotransformací. Detoxikace léčiva však představuje pouze biotransformace léčiva na netoxické a stabilní metabolity a jejich následná akumulace v rostlinách. Z tohoto důvodu je velmi důležitá znalost biotransformačních cest léčiva v rostlinách. Rostliny sóji, případně plody, jsou totiž dále využívány v zemědělství jako krmivo pro dobytek a absorbovaná anthelmintika včetně jejich metabolitů mohou vstupovat dále do potravního řetězce.

Výsledky ukázaly, že fenbendazol vstupuje do rostlin, které jsou ho schopny biotransformovat. Zjistili jsme rozdíly v metabolitech mezi kořeny, listy, semeny a lusky sóji.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Lenka Martínková

Supervisor: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Biotransformation of fenbedazole in soya (*Glycine max*)

Veterinary drugs are used in large amounts in modern husbandry for treatment and prevention of diseases in animals. Anthelmintics administered to animals enter into environment primarily through its excretion in faeces or urine. Following excretion, drugs may persist in the environment and impact non-target organisms.

Plants are able to uptake xenobiotics, including drugs, and detoxify them via biotransformation. However, only drug biotransformation into non-toxic and stable metabolites and their consequent accumulation in plants represent drug detoxification. For that reasons, knowledge of biotransformation pathways of drug in plants is very important. Soybean plants, eventually seeds, are further used in agriculture as feed for cattle and absorbed anthelmintics including their metabolites can enter the food chain.

The results showed that fenbendazole entered plant and enzymatic systems of plant were able to biotransform fenbendazole via several reactions. We found differences in the metabolites between the roots, leaves, seeds and pods of soybean.

Obsah

Úvod	8
Teoretická část.....	9
1 Biotransformace léčiv	9
1.1 Reakce první fáze biotransformace	9
1.2 Reakce druhé fáze biotransformace.....	11
1.3 Faktory ovlivňující biotransformaci	11
1.4 Biotransformace xenobiotik u rostlin	13
1.4.1 Fytoremediace	13
1.4.2 Rostlinné biotransformační enzymy.....	14
2 Anthelmintika	16
2.1 Imidazothiazoly	16
2.2 Aminoacetonitrilové deriváty (AAD).....	16
2.3 Makrocyclické laktony	17
2.4 Benzimidazoly	18
2.4.1 Fenbendazol	19
3 Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> , GM).....	21
4 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)	24
5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	25
6 Hmotnostní spektrometrie (MS)	26
6.1 Historie	26
6.2 Iontový zdroj.....	27
6.2.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)	27
6.3 Hmotnostní analyzátor.....	28
6.3.1 Trojitý kvadrupól (QqQ)	28
7 CÍL PRÁCE	29
Experimentální část	30
8 Použití chemikálie a reagentie.....	30
9 Použité přístroje	31
10 Metodika práce	32
10.1 Pěstování modelové rostliny.....	32
10.2 Extrakce	34
10.3 UHPLC/MS analýza	35

Výsledky.....	36
10.4 Identifikace metabolitů FBZ.....	36
10.4.1 Metabolity první fáze biotransformace	37
10.4.2 Metabolity druhé fáze biotransformace.....	37
10.5 Zastoupení metabolitů v různých částech rostliny	37
10.6 Kvantifikace FBZ	42
11 Diskuze.....	43
12 Závěr.....	45
13 Seznam zkratk	46
14 Seznam obrázků	47
15 Seznam tabulek	48
16 Seznam grafů.....	49
17 Seznam použité literatury	50

Úvod

Parazitická onemocnění jsou běžné stavy, které se mohou týkat všech obratlovců, včetně lidí. Nejčastěji jimi však trpí zvířata hospodářská a domácí mazlíčci. Léčiva používaná na tato onemocnění nazýváme anthelmintika, respektive veterinární anthelmintika. Mezi nejčastěji používaná anthelmintika patří benzimidazoly, které jsou výhodné svým širokým spektrem účinku.

Časté používání těchto léčiv, ať už kvůli léčbě onemocnění nebo jako prevence, má však za následek jejich kumulaci v životním prostředí. Do něj se dostávají buď přímo skrz léčená zvířata nebo kontaminací hnoje či odpadních vod. Je tedy nutné hledat způsoby, kterými můžeme ekosystém čistit, protože nemůžeme zabránit stále vzrůstající spotřebě léčiv všeobecně.

Jedním ze způsobů používaných na odstraňování léčiv z prostředí může být biotransformace. Rostlinné biotransformační enzymy dokáží přeměnit léčivo na jeho netoxické nebo méně toxické metabolity. Pro tyto studie je vhodné používat rostliny, které se běžně nacházejí na polích nebo loukách i ve velkém množství.

Pro tento experiment byla vybrána sója luštinatá (*Glycine max*), protože se pěstuje a hojně využívá jako krmná plodina pro dobytek. Pokud jsou zvířata krmena rostlinami, které už obsahují léčiva, není pak možné kontrolovat dávky, kterým jsou zvířata vystavena, čímž se zvyšuje riziko rezistence.

Přítomnost anthelmintika v potravním řetězci vzhledem k současným stravovacím trendům, kdy se sója stává stále více populární, je tedy vysoce pravděpodobná i pro ty, kteří se stravují pouze rostlině. Na druhou stranu je nutné podotknout, že fenbendazol není pro lidský organismus toxický, ani ho nijak negativně neovlivňuje.

Teoretická část

1 Biotransformace léčiv

Biotransformace (metabolizace) léčiv zobrazuje přehled reakcí, při kterých jsou exogenní a endogenní látky přetvářeny na jejich hydrofilnější metabolity. Obvykle probíhá ve dvou fázích (první a druhá fáze biotransformace). Cílem je zvýšení hydrofility xenobiotik a usnadnění jejich vyloučení z organismu. Lipofilní látky jsou běžně v glomerulech ledvin reabsorbovány do krve, proto nemohou být vyloučeny z organismu. Hydrofilní metabolity jsou zpravidla vyloučeny močí. Léčivo může být biotransformací buď inaktivováno, přičemž vzniká metabolit nebo konjugát s minimálním nebo žádným farmakologickým účinkem nebo aktivováno, kdy se původně neúčinné léčivo (tzv. „pro-drug“) mění na účinný metabolit. Látky polární nejsou v organismu metabolizovány, vylučují se většinou v nezměněné formě ledvinami. Nepochární léčiva většinou podstoupí úplnou nebo částečnou přeměnu na hydrofilní metabolity, které jsou následně vyloučeny ledvinami. U nepolárních látek nemusí biotransformace ani proběhnout a pak jsou tato léčiva vyloučena např. žlučí [1].

Nejdůležitějším tělním orgánem pro biotransformaci látek jsou játra, ale důležité jsou i plíce, ledviny nebo epitel trávicího traktu. Podílejí se ale i mikrosomální enzymy, což jsou nespecifické enzymatické systémy hladkého endoplazmatického retikula buněk jater, ledvin, svalů, plic, kůže a sliznice střev [2].

1.1 Reakce první fáze biotransformace

Během první fáze biotransformace se na skturu xenobiotika zavádějí nové funkční skupiny, což umožňuje přeměnu původních léčiv na polární, ve vodě rozpustné metabolity, které jsou snadněji vyloučeny ledvinami. Metabolity první fáze zpravidla podstupují druhou fázi biotransformace.

Nespecifické mikrosomální enzymy katalyzují procesy první fáze biotransformace léčiv, které lze rozdělit do několika kategorií podle typu enzymatické reakce. Mezi reakce první fáze biotransformace patří oxidace, redukce, hydrolýza, hydratace a izomerace [3].

Oxidace

Prvním typem je oxidace, které se účastní především cytochrom P450 jako monooxygenasový systém. Je to hlavní katalyzátor oxidačních reakcí, tzv. oxidasa se smíšenou funkcí. Dalšími enzymy, které umí oxidovat látky jsou alkoholdehydrogenasa a

aldehyddehydrogenasa, aminooxidasy a další. U oxidace se k léčivu připojí aniontová skupina (například hydroxylová) a dochází k dealkylaci, deaminaci nebo desulfuraci [1]. Mezi další typy oxidace řadíme i *N*- a *S*-oxidace. Enzymy mohou *N*-oxidovat xenobiotika obsahující amin, imin nebo hydrazin. *S*-oxidaci podléhají struktury s molekulou síry na sulfoxidy a sulfony [4].

Hydroxylace

Hydroxylace je reakce, při které se vnáší do struktury xenobiotika hydroxylová skupina (-OH), čímž je metabolit hydrofilnější a snáze podléhá dalším reakcím. Patří mezi nejčastější reakce u sloučenin s alifatickým řetězcem nebo aromatickým kruhem [4].

Oxidační deaminace

Při oxidační deaminaci je ve dvou krocích odstraňován dusík za vzniku ketonu. Aminoskupina se dehydrogenuje a vzniká hydroxylovaný derivát, který podléhá hydrolyze za vzniku ketonu a amoniaku.

Dealkylace

Podle heteroatomu, na kterém je navázána alkylová skupina je můžeme dělit na *N*-, *O*- a *S*-dealkylace. V prvním kroku je hydroxylován amin nebo alkoxy- a alkyl-thiolová skupina xenobiotika, ze kterého vzniká nestabilní sloučenina. Ta se v druhém kroku štěpí na aldehyd a dealkylované xenobiotikum.

Dehalogenace

Další oxidační reakcí můžeme nahradit halogeny vodíkem nebo hydroxidem, za vzniku alkoholu nebo karboxylové kyseliny. Enzymy účastníci se této reakce označujeme jako dehalogenasy.

Redukce

Druhým typem enzymatické reakce je redukce, která je méně běžná než oxidace. Redukční enzymy jsou nitroreduktasy a azoreduktasy a reakce jsou cílené na skupiny léčiv,

kterým tyto enzymy mohou odtrhnout kyslík za vzniku vody a příslušného aminu. Bývají to karbonylové, azoskupiny a nitroskupiny. Další redukce mohou probíhat na *N*-oxidech terciárních aminů a *S*-oxidech, z nichž vznikají aminy a sulfidy. Karbonylové sloučeniny jsou redukovány na příslušné hydroxyderiváty karbonylreduktasou.

Hydrolyza

Dalším typem reakce je hydrolyza, kdy se štěpí vazba za účasti vody. Může probíhat za katalýzy enzymem nebo v některých případech i bez něj. Účastní se jí esterasy, například karboxylesterasa, cholinesterasa a karboxyamidasa nebo jakékoliv peptidasy, lipasy nebo glykosidasy.

1.2 Reakce druhé fáze biotransformace

Při druhé fázi biotransformace dochází především ke konjugaci, proto tyto reakce nazýváme konjugační. Dochází při nich za účasti enzymů, většinou transferas, k tvorbě kovalentní vazby mezi funkční skupinou původního léčiva nebo jeho metabolitu, prošlého první fází a endogenní látkou. Tento děj je energeticky náročný. Enzymy druhé fáze se nacházejí v cytosolu a mitochondriích. Konjugovaná xenobiotika jsou hydrofilnější, proto se snadněji eliminují z organismu. Dochází také k inaktivaci léčiva nebo alespoň zmenšení jeho účinku. Mezi hlavní konjugační reakce patří konjugace s kyselinou UDP-glukuronovou (konjugace alkoholů, fenolů, karboxy-, amido- a aminoskupin), konjugace s glutationem, s kyselinou octovou (konjugace sulfonamidů) a sírovou, s aminokyselinami (konjugace karboxylových kyselin). Farmakologicky inaktivní polární konjugáty jsou z organismu následně vyloučeny nejčastěji močí, popř. stolicí a potem. Konjugáty léčiv s kyselinou UDP-glukuronovou s vyšší molekulovou hmotností se vylučují žlučí a putují do enterohepatálního oběhu [1, 4].

1.3 Faktory ovlivňující biotransformaci

Biotransformační procesy jsou ovlivňovány celou řadou vnitřních a vnějších faktorů. Mohou to být interindividuální genetické faktory nebo pohlaví a živočišný nebo rostlinný druh. Mezi intraindividuální nezanedbatelný faktor u všech organismů patří také jejich věk a pohlaví. Aktivita biotransformačních enzymů plodu je minimální, po narození se však zvyšuje a u starých jedinců dochází naopak ke snižování činnosti jaterních enzymů a ke zhoršení

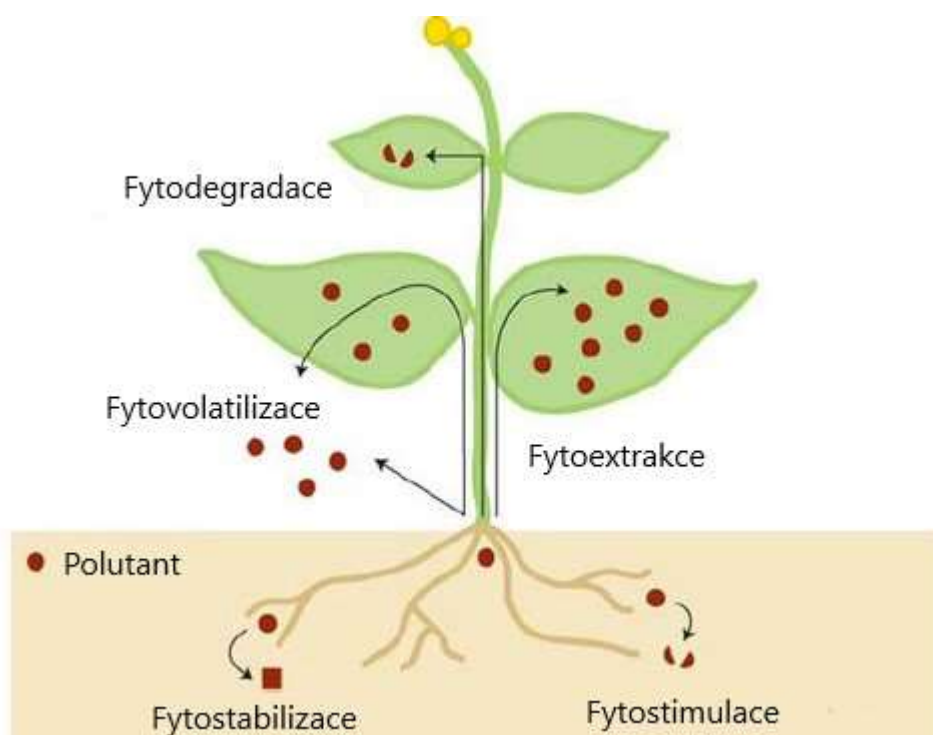
metabolizace léčiv. Vliv pohlaví se projevuje například rychlejší metabolizací léčiv u samců v porovnání se samicemi. Další roli mohou hrát hormonální vlivy nebo různá metabolická onemocnění především jater. Ovlivňovat aktivitu enzymů může také výživa díky přítomnosti nenasycených mastných kyselin, vitamínu E a C v potravě. Mezi jeden z méně častých, ale výrazných faktorů považujeme i podávání induktorů a inhibitorů enzymů (např. chemické látky, léčiva, alkoholy, polyaromatické uhlovodíky), které zvyšují nebo snižují aktivitu těchto enzymů. Při zvýšení aktivity enzymů je léčivo rychleji metabolizováno a naopak [1, 4, 5].

1.4 Biotransformace xenobiotik u rostlin

Způsob biotransformace u živočichů i rostlin je velmi podobný. Procesy biotransformace jsou prakticky stejné, liší se pouze to, co se děje s následnými metabolity. U živočichů jsou metabolity většinou vylučovány nejčastěji stolicí, močí, potem a dalšími tělními tekutinami. U rostlin se hromadí a uskladňují ve formě vakuol (hydrofilní metabolity) nebo v buněčné stěně (lipofilní metabolity). Hromadění xenobiotik v rostlině má za následek chemický stres, který se projevuje změnou pH, inhibicí či aktivací některých enzymů, snížení fotosyntézy a potlačení respirace atd., což při delší expozici může mít za následek trvalé poškození rostliny [4].

1.4.1 Fytoremediace

Fytoremediace je výraz, který používáme pro využívání zelených rostlin k fixaci, akumulaci či rozkladu polutantů z životního prostředí. Rostliny dokážou vstřebávat především hydrofobní organické i anorganické polutanty z půdy a povrchové vody [6].



Obrázek 1 Různé cesty fytoremediace (<https://blogs.umass.edu/natsci397a-eross/phytoremediation-the-future-of-environmental-remediation/>)

Fytoremediace využívá fytodekontaminaci a fytostabilizaci. Fytodekontaminace je proces, při kterém rostliny hromadí kontaminanty ve svých tkáních, poté jsou sklizeny a následně uloženy na bezpečné místo nebo chemicky či tepelně zpracovány. Při fytodegradaci

rostliny metabolizují polutanty a produkty uloží do svých struktur. Fytostabilizace je využívána, když je nutné zajistit regulaci kontaminované podzemní vody. Vysazují se například rychle rostoucí dřeviny, jejichž kořenový systém pohlcuje velké množství vody. Fytoremediace je stále více využívána, protože je levná a poměrně efektivní, přesto tento proces trvá o mnoho déle než využití běžných fyzikálně-chemických metod dekontaminace. Používá se u vysoce znečištěných míst, ale i k dočištění oblasti po použití jiných postupů [7].

1.4.1.1 Příjem a metabolizace rostlinou

Na fytoremediaci se podílí nejen samotné rostliny, ale i symbiotické mikroorganismy v jejich kořenovém systému. Rostliny absorbují a metabolizují především organické látky několika různými způsoby. Mohou je přímo absorbovat kořeny, metabolizovat a uložit jako netoxické metabolity nebo přijmout listy ze vzduchu. Dalším způsobem je uvolňování rostlinných enzymů (dehalogenasy, reduktasy, peroxidasy), které napomáhají k degradaci v půdním prostředí. Posledním mechanismem je biotransformace pomocí mikroorganismů v rhizosféře, které využívají kontaminanty jako zdroj energie a uhlíku [8].

1.4.2 Rostlinné biotransformační enzymy

V mnoha studiích se potvrdilo, že rostlinné biotransformační enzymy mají mnohem více isoformů a jsou více substrátově a polohově specifitější než živočišné [9].

1.4.2.1 Enzymy první fáze biotransformace

V první fázi biotransformace se molekula stává více polární získáním karboxylové, amino- nebo hydroxy- funkční skupiny nejčastěji oxidačními reakcemi – oxidací, hydroxylací, dealkylací, ale i redukčními a hydrolytickými reakcemi. Mezi nejběžnější enzymy první fáze biotransformace patří esterasy, cytochrom P450 (CYP), peroxidasy a reduktasy [1]. Cytochrom P450 je označení pro obsáhlou skupinu hemoproteinových enzymů. Tyto enzymy byly nalezeny ve všech živých organismech. Jsou to klíčové enzymy při metabolismu xenobiotik účastníci se i při metabolismu endogenních látek, například steroidních hormonů a cholesterolu, mastných kyselin, žlučových kyselin a vitamínů rozpustných v tucích. Díky nim probíhají oxidační reakce s využitím kyslíku, peroxidů nebo peroxykyselin. Dalšími enzymy jsou peroxidasy, které jsou schopny redukovat peroxid vodíku a další peroxidy. Mají širokou substrátovou specifitu podobně jako CYP. Metabolizují anorganické i organické sloučeniny a

nejčastějšími substráty jsou fenoly a aromatické aminy. Katalyzují redoxní reakce, halogenace a dehalogenace, dekarboxylace, oxygenace, hydroxylace a další. Vyskytují se v mnoha formách, nejznámější je křenová peroxidasa. Reduktasy katalyzují xenobiotika s nitroskupinou na amino-, hydroxylamino- nebo nitrosoderiváty [4].

1.4.2.2 Enzymy druhé fáze

Při druhé fázi se na metabolit vážou hydrofilní endogenní sloučeniny jako jsou sacharidy, aminokyseliny nebo glutathion. Jsou to především transferasy, které připojují na xenobiotikum sacharid přes jeho hydroxylovou nebo aminovou skupinu [4]. Podle toho je dělíme na *O*- a *N*-glykosyltransferasy a *N*- a *O*-malonyltransferasy, které jsou většinou specifické pro rostliny. Dalšími enzymy účastníci se konjugace jsou glutathiontransferasy, sulfotrasferasy a *N*-acetyltransferasy, které jsou podobné těm živočišným [7].

U metabolitů uložených v buněčné stěně (lipofilních látek) může probíhat ještě další fáze, tzv. sekundární konjugace. Tyto látky reagují s některými složkami buněčné stěny jako jsou pektiny nebo ligniny [9].

Pokud vznikají další konjugáty s glukózou nebo glutathionem, označujeme tuto reakci jako *N*-malonylaci. Po proběhlé konjugaci jsou metabolity uskladněny, avšak některé se mohou i nadále metabolizovat. Karboxypeptiasa nebo γ -glutamyltranspeptidasa dokáže odštěpovat aminokyseliny z glutathionu navázaném na uskladněném xenobiotika [4].

2 Anthelmintika

Anthelmintika jsou syntetická léčiva využívaná při léčbě a prevenci proti parazitárním onemocněním. Infikované zvíře nebo člověk je hostitel těchto parazitických helmintů, kteří se vyvíjí buď přímo v organismu hostitele a mezihostitele (biohelmintózy) anebo v jejich vnějším okolí (geohelmintózy). Helmint působí na organismus hostitele negativně, kdy mu osmoticky vstřebává živiny, saje krev nebo parazituje na tkáních [11].

Tyto léčiva se dělí podle spektra účinku na širokospektrá a úzkospektrá anebo podle tříd červů, na které působí. Proti hlísticím jsou účinná antinematoda, proti tasemnicím anticestoda a k usmrcení motolic se používají antitreematoda. Onemocnění hlísticemi tzv. nematodózy patří mezi nejobsáhlejší kategorie helmintóz parazitující na veškerých hospodářských i domácích zvířatech [12].

Hlístice, nematoda (*Nematodes*), mají válcovité, velmi pružné a pevné, ke koncům ztenčené tělo s kutikulárními zuby, které jsou schopny narušit tělo hostitele. Postihují hlavně trávicí trakt, dýchací ústrojí, ale i svalovou tkáň, mízní cévy nebo spojivkový vak [10].

Léčiva proti hlísticím, antinematoda se mohou používat preventivně a hromadně. Především se toto praktikuje u hospodářských a domácích zvířat, anebo individuálně při zjištěné parazitární infekci. U hospodářských zvířat se vyrábějí jako příměs krmiva a u domácích zvířat v různých lékových formách, které jdou snadno aplikovat. Mezi antinematoda řadíme benzimidazoly, makrocyclické laktony, imidazothiazoly a aminoacetonitrilové deriváty [1, 12].

2.1 Imidazothiazoly

Prvním objeveným imidazothiazolem byl racemát tetramizol. Později z něj byl separován pouze L-izomer známý jako levamizol, což je jeden z nejtoxičtějších anthelmintik. Působí jako cílený stimulant nikotinových acetylcholinových receptorů parazita, což vede ke svalové paralýze a úhynu. Druhým mechanismem účinku je při podávání vyšších dávek vyvolaný rozvrat sacharidového metabolismu [12].

2.2 Aminoacetonitrilové deriváty (AAD)

Jsou nejnovější skupinou léčiv proti hlísticím, odvozenou od sloučeniny aminoacetonitrilu. Jediným zástupcem je monepantel, komerčně vyráběn pod názvem Zolvix®.

Toto léčivo bylo vyvinuto kvůli vysoké rezistenci na benzimidazolová, imidazothiazolová anthelmintika a makrocyclické laktony. Používá se především u skotu a ovcí a vykazuje nízkou toxicitu a široké spektrum účinku [13, 14].

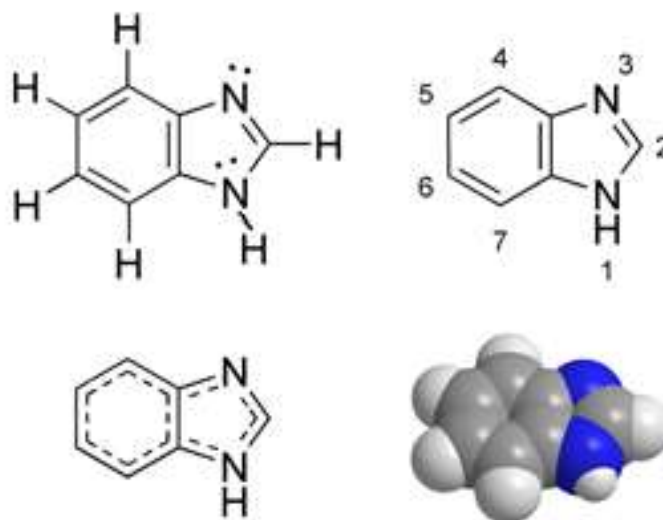
Působí na nikotinový acetylcholinový receptor, konkrétně na podjednotku specifickou pro nematoda ACR-23, což způsobuje svalovou paralýzu hlístic [14]. Jeho metabolity jsou považovány za netoxické pro životní prostředí [15].

2.3 Makrocyclické laktony

Tyto léčiva jsou biosyntetického původu, izolovány jako fermentační produkty bakterií. Mají širokospektrální účinek a jsou účinné i v nízkých koncentracích. Principem mechanismu účinku je ovlivnění glutamátových receptorů parazita spojených s chloridovými kanály a zvýšené uvolňování inhibičního neurotransmiteru – kyseliny γ -aminomáselné. Dochází ke vstupu chloridových iontů do neuronu, hyperpolarizaci a tím k inhibici převodu nervových vzruchů, což způsobí zahynutí všech stádií parazita a jeho následné vypuzení ze střev hostitele [12]. Jsou známy dvě skupiny makrocyclických laktónů – avermektiny a milbemyciny. Nejznámějším léčivem ze skupiny avermektinů je ivermektin, jenž patří mezi širokospektrá antiparazitika, jelikož působí nejen proti hlísticím, ale i hmyzu a roztočům [1, 12]. Za jeho objev byla udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství v roce 2015. Využívá se k léčbě parazitárních onemocnění lidí (známý při léčbě říční slepoty v rovníkové Africe, kdy byl dodáván zdarma) i zvířat [16].

Mezi další zástupce patří doramektin a mezi milbemyciny například moxidektin nebo milbemycin [1].

2.4 Benzimidazoly



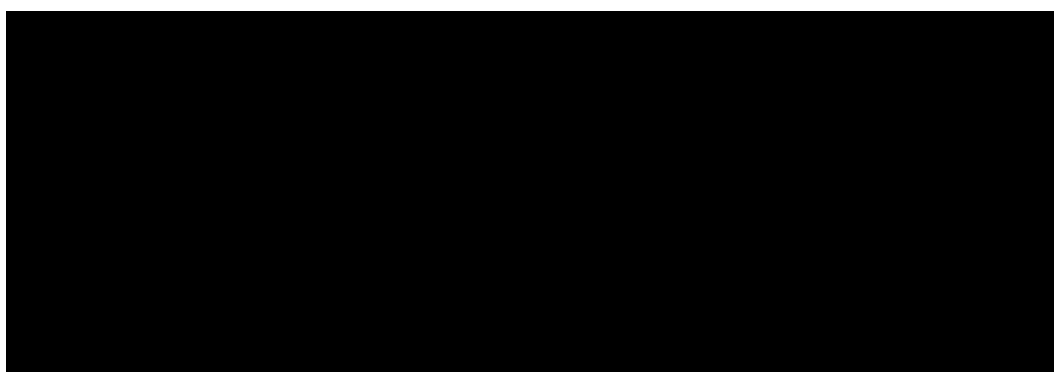
Obrázek 2. Chemická struktura benzimidazolů
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/Benzimidazole_chemical_structure.png)

Benzimidazolová anhelmintika jsou nejrozsáhlejší skupinou antinematod, některé z nich mají dokonce nejširší spektrum účinku. Benzimidazoly jsou heterocyklické aromatické sloučeniny, které vznikly fúzí benzenu a imidazolu. Syntetické benzimidazoly se používají jako antiparazitika, a to konkrétně endoparazitika, anthelmintika, antinematoda a částečně i jako antitrematoda a anticestoda [12].

Tyto léčiva účinkují na dospělé i různá vývojová stádia. Některá dokonce na vajíčka parazitů, která díky silnému obalu odolávají různým nepříznivým podmínkám jako sucho, vlhkost nebo výkyvy teploty. Pozor se musí dát v určitých situacích, kdy je podávání těchto léčiv kontraindikováno. Především u březích zvířat nebo přežvýkavců, jejichž mléko je určeno pro konzumaci člověkem a dále pro zvířata s léčbou s poruchou jater a ledvin. Mechanismus účinku je založen na inhibici β -tubulinových podjednotek, které jsou nezbytné při tvorbě mikrotubulů buněk parazita s následnou inhibicí tvorby ATP. Specifita účinku závisí na mnohonásobně vyšší afinitě k parazitárnímu typu β -tubulinu. Absorpce benzimidazolů závisí na rozpustnosti sloučeniny ve vodě, např. albendazol a oxibendazol jsou lépe absorbovány z GIT v porovnání s ostatními léčivy ve skupině. Všechny účinné látky (vyjma thiabendazolu) jsou málo metabolizovány. Většina léčiv je vyloučena v nezměněné formě stolicí. Mezi zástupce patří thiabendazol a jeho deriváty, albendazol (ABZ), febantel, fenbendazol (FBZ), flubendazol (FLU), mebendazol (MBZ) a oxibendazol [1, 17].

2.4.1 Fenbendazol

Fenbendazol (FBZ) se nejčastěji využívá při parazitárních onemocnění psů, koček, koňů a prasat, ale i drůbeže. Má největší účinnost v kombinaci s prazikvantelem a pyrantelem a působí na škrkavky, tasemnice a hlístice. Může se podávat i jako febantel, což je proléčivo fenbendazolu. V malých dávkách je lidmi dobře tolerován, a dokonce probíhají studie o fenbendazolu jako protinádorovém léčivu [18].



Obrázek 3 Chemická struktura fenbendazolu

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/bc/Fenbendazole.svg/1200px-Fenbendazole.svg.png>

Jsou u něj však známy teratogenní a embryotoxické účinky na některé druhy zvířat (koňovití, kočkovité a psovitě šelmy) a mezi jeho nežádoucí účinky patří hepatotoxicita. Podávání ve vyšších dávkách může poškozovat kostní dřev u psů [1].

Prvně byl představen v Německu roku 1970 firmou Hoechst AG (nyní známá jako Aventis), pod komerčním názvem Panacur. Dnes je dodáván ve formě tablet, roztoků, past nebo v potravních doplňcích [19].



Obrázek 4 Komerčně dostupný přípravek Panacur® pro dobytek (<http://www.infovets.com/books/beef/C/Images/C226.jpg>)

2.4.1.1 *Struktura*

Molekulová hmotnost fenbendazolu je 299,35 g/mol. Jeho systematický název je: methyl-5-(fenylthio)-2-benzimidazolkarbamát a sumární vzorec pak C₁₅H₁₃N₃O₂S. Jeho teplota tání je uváděna jako 233°C. Byly stanoveny letální dávky pro hlodavce – orální LD₅₀ >10000mg/kg a kožní LD₅₀ >2000 mg/kg. Ve vodě je prakticky nerozpustný [20].

2.4.1.2 *Farmakokinetika*

Perorálně podávaný fenbendazol se vstřebává v žaludku a je špatně vstřebáván do krevního řečiště. Absorbované léčivo je metabolizováno v játrech na oxfendazol, který se také používá jako anthelmintikum. Je zajímavé, že oxfendazol je přeměňován bakteriemi v žaludku přežvýkavců zpět na fenbendazol. K vylučování dochází hlavně výkaly. U skotu a ovcí se 6 dní po perorálním podání asi 35 % požitá dávka vyloučí v nezměněné podobě a jen pouze 5 % metabolizuje. Malé množství se vylučuje močí, hlavně ve formě různých metabolitů. Vylučování u koz je asi dvakrát rychlejší než u ovcí. U psů, koček a ptáků je nutné používat vyšší dávku nebo častější ošetření, aby se dosáhlo požadované účinnosti jako u přežvýkavců, protože nemají stejnou trávicí soustavu. U psů není fenbendazol detekovatelný v krevní plazmě již 48 hodin po podání, u ptáků 36 hodin a u koček po 7 dnech. Na farmakokinetiku má vliv i přijímaná strava. U přežvýkavců se záměrně snižuje množství krmiva, aby se zpomalil průchod potravy bachorem a tím pádem má podané léčivo delší dobu, za kterou se může absorbovat do krevního řečiště. Na rozdíl od toho u psů a koní podávání fenbendazolu spolu s jídlem zvyšuje jeho biologickou dostupnost [17, 19].

2.4.1.3 *Mechanismus účinku*

Mechanismus účinku je založen na inhibici β -tubulinových podjednotek, které jsou nezbytné při tvorbě mikrotubulů buněk parazita. Narušením jejich produkce má za následek i inhibici tvorby ATP. Po vyčerpání glykogenových rezerv nemá parazit dostatek energie. Specifita účinku závisí na mnohonásobně vyšší afinitě k parazitárnímu typu β -tubulinu. Je narušeno i buněčné dělení a vývoj vajíčka červů je blokován, má tedy ovicidní účinek [1, 12].

3 Sója luštinatá (*Glycine max*, GM)

Sója, původem z jihovýchodní Asie, je jedna z nejstarších kulturních plodin a její pěstování se brzy rozšířilo i po ostatních kontinentech. V Evropě se začala pěstovat ve větším množství až ve 20. století. V dnešní době je největším světovým producentem USA, Brazílie, Argentina a Čína. V České republice se pěstuje jen v teplejších oblastech [21].



Obrázek 5 Schéma rostliny sóji (https://farm7.staticflickr.com/6142/5936310867_dea9065a18_b.jpg)

Je charakterizována jako teplomilná, krátkodenní rostlina, která je velmi náročná na vláhu. Avšak šlechtěním ve vyšších zeměpisných šířkách se její nároky daří postupně snižovat, a to především její náročnost na vláhu, teplo, ale i požadavky na světlo. Z výsledků těchto pokusů jde jasně poznat, že počáteční růstové fáze sóji nepotřebují takové množství tepla, které se očekávalo, a naopak je to s vláhou a dobou světla. Termín výsevu se pak určuje podle nadmořské výšky oblasti [22].

Tabulka 1 Biologická klasifikace sóji (https://cs.wikipedia.org/wiki/S%C3%B3ja_lu%C5%A1tinat%C3%A1)

Říše	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	Vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád	Bobotvaré (<i>Fabales</i>)
Čeleď	Bobovité (<i>Fabaceae</i>)
Rod	Sója (<i>Glycine</i>)

Řadí se do rodu *Glycine*, ve kterém se nachází spolu se sójou dalších 9 rodů. Patří mezi jednoleté rostliny a je to dvouděložná, samosprašná rostlina, převážně pěstovaná ze semene. Sója dorůstá maximálně do výšky 1,5 metru, ale převážně její výška dosahuje kolem 1 metru [23].

Kořenový systém tvoří hlavní, dolů se zužující, kulovitý kořen a mohutná síť až 3 metry do hloubky rostoucích postranních kořenů, které svojí délkou přesahují i kořen hlavní. V kořenovém systému se také nachází drobné hlízky, jež tvoří tzv. hlízkové bakterie rodu *Rhizobium*, které na kořenech bobovitých rostlin fixují vzdušný dusík.

Rostlina má jednoduché primární listy, sekundární jsou převážně trojčetné, na povrchu s jemnými trichomy. Lodyhu má keříčkovitou, členěnou a hrubou s kruhovým průřezem, s trichomy, která svojí barvu po dozrání změní ze zelené na žlutou. Odrůdy s tenkou lodyhou se používají spíše pro krmné účely. Listy má trojčetné, složené ze 3-5 lístků. Lusky jsou rovné nebo lehce zahnuté a dorůstají od 2 do 7 cm a na rostlině jich může být 20 až 40. V každém lusku se nachází 2 až 4 kulatá nebo oválná semena různé barvy. Mohou být žlutá, zelená, šedá, ale i hnědá a černá. Květy mají uspořádání do hroznů a jsou drobné s fialovým zabarvením [24].



Obrázek 6 *Glycine max* – plod (<https://botany.cz/cs/glycine-max/>)

Sója luštinatá patří mezi významné plodiny díky jejímu širokému využití. Využívá se jako potravina, léčivá rostlina nebo jako krmná a technická plodina. především díky vysokému podílu proteinů v semenech, ty obsahují kolem 35 % a geneticky modifikovaná sója až 45 %. Semena obsahují kolem 20 % oleje, 15–24 % sacharidů, 5–9 % vody, 3 – 6 % vlákniny, 1,6 % lecitinu, vitamínů (především ze skupiny B a E) a z minerálních látek (vápník, hořčík a železo) [25].

Aminokyseliny vytvořené ze sóji se po enzymatickém štěpení chymu dokáží vstřebat o mnoho lépe než ze živočišných zdrojů. Tato rostlinná bílkovina je navíc vhodná pro jedince se sníženou produkcí žaludečních šťáv. Sója má především velké množství esenciálních aminokyselin, v menším množství obsahuje sirmé aminokyseliny [26].

Je však nutno podotknout, že sója patří mezi alergeny, které však díky způsobům zpracování této plodiny nejsou významné. Odstranit se dají tepelnou úpravou nebo fermentací, díky které se sníží riziko vzniku alergické reakce až o 99 % [23].

4 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

Principem extrakce z kapaliny do kapaliny je přecházení rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé, které jsou vzájemně nemísitelné. Používáme ji pro separaci určité látky z roztoku nebo k přečištění. Při vhodně zvolených podmínkách jako jsou správně zvolená extrakční činidla, dostatečná doba třepání nebo vhodně zvolená teplota reakce, je tato metoda velice účinná. Zpravidla bývá používána jako jedna složka voda a druhá organické rozpouštědlo s vodou nemísitelné. Jako organické rozpouštědlo se nejčastěji používá hexan, chloroform nebo ethylacetát. [27]

Původní roztok s rozpuštěnou látkou nazýváme rafinát. Rozpouštědlo, do kterého přejde extrahovaná látka se označuje jako extrakt [28].

Rovnice pro výpočet rozdělovacího koeficientu:

$$K = \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{vod}}}$$

K rozdělovací koeficient

c_{org} koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi

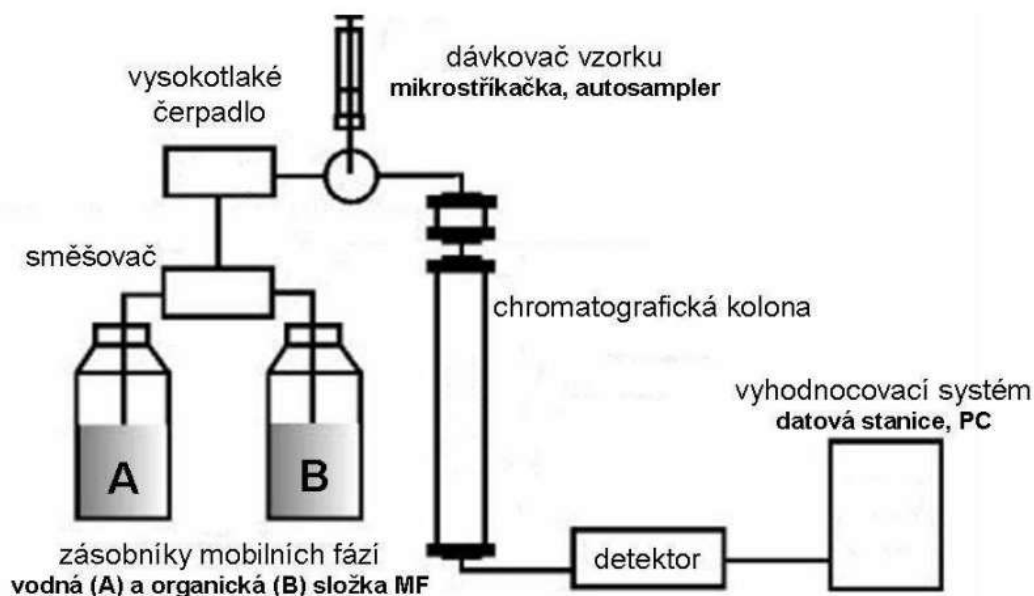
c_{vod} ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi

Rozdělovací koeficient závisí na typu rozpouštědel, rozpuštěné látce, teplot, dalších látkách přítomných v systému a podobně. Pro účinnější separaci je lepší vytřepávat vícekrát s menšími objemy než v jednom kroku.

Postup LLE můžeme rozdělit na tři části. V první se připraví rozpouštědla pro extrakci. Ve druhém kroku probíhá vlastní extrakce, při které se ustanoví rozdělovací rovnováha. A v posledním kroku je nutné oddělit chtěný extrakt a upravit ho pro další použití [27].

5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je široce rozšířená analytická metoda používána k separaci látek v kapalném prostředí. Její princip závisí na opakovaném ustanovení rovnováhy mezi dvě složky systému. V kapalinové chromatografii to je kapalná mobilní fáze, která se pohybuje systémem a nepohyblivá stacionární fáze umístěná v koloně. Analyty různě reagují s oběma fázemi, a proto opouští kolonu v různých časech. Kapalinovou chromatografií můžeme rozdělit podle principu na – rozdělovací, adsorpční, iontově-měnnou a gelovou [29]. Uspořádání fází můžeme rozdělit na normální (mobilní fáze nepolární, stacionární polární) a v praxi více využívanou reverzní (obrácené uspořádání než u normálního uspořádání). Separace probíhá za velmi vysokého tlaku (30-40 MPa), proto musí být celý systém upraven podle těchto potřeb. Mezi výhody patří použití pouze malého množství vzorku (μl) a snadná automatizace systému od automatických dávkovačů, přes počítačem řízený průběh až po automatické vyhodnocování chromatogramů [29, 30].



Obrázek 7. Obecné schéma instrumentace HPLC systému
(https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf?lang=cs)

6 Hmotnostní spektrometrie (MS)

6.1 Historie

Za zakladatele hmotnostní spektrometrie je považován Sir Joseph J. Thompson, který v roce 1897 publikoval svoji práci o analýze pozitivně a negativně nabitých částic v parabolickém hmotnostním spektrometru. Jeho nová technika umožnila nové výzkumy v oblasti chemické analýzy a v roce 1906 za ní získal Nobelovu cenu. V následujícím století jich bylo uděleno za výzkum hmotnostní spektrometrie dalších šest [31]. V dalších desetiletích se výzkumy zabíraly hledáním nových izotopů, jejich zastoupením a přesné atomové hmotnosti, byl použit při výrobě atomové bomby a nejvíce se jeho uplatnění rozšířilo při používání v chemickém průmyslu. První komerčně dostupný přístroj se objevil na trhu v roce 1943. V 60. letech se hmotnostní spektrometrie stala standartním analytickým nástrojem v analýze organických sloučenin a díky tomu vznikaly další způsoby ionizace, analyzátorů i detektorů [32].

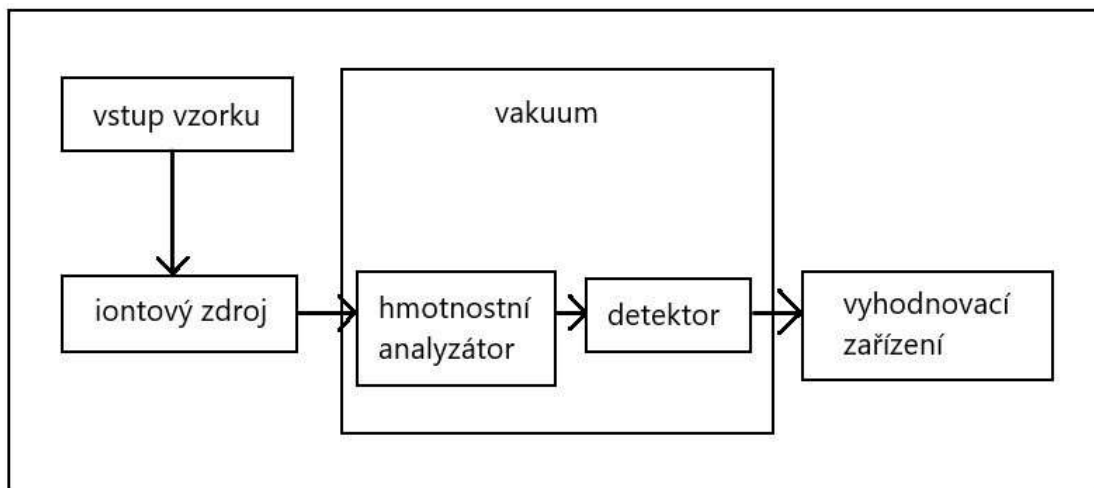
V dnešní době je součástí rutinních laboratoří díky vysoké citlivosti, minimální spotřebě vzorků a možnosti kvalitativní i kvantitativní analýzy [33].

Za československé zakladatele se považují Vladimír Hanuš a Vladimír Čermák, kteří již v 50. letech minulého století začali s konstrukcí prvního hmotnostního spektrometru v Československu. Díky vlastnímu spektrometru se jejich výzkumy mohly zaměřovat na objasňování složitých struktur přírodních látek. Velkým úspěchem byly i jejich studie mechanismu ionizační fragmentace a přesmyku organických kationtů v plynné fázi [34].

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založena na vytvoření iontů ze vzorku v plynné fázi a jejich rozdílné interakci s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Dochází k jejich separaci, rozlišení iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následné kvantifikaci díky poměru relativních intenzit jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr je přístroj, který se skládá ze třech základních částí, které ho definují – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor [33].

Hmotnostní spektrometrie je stále více rozšířená díky menší robustnosti a získání mnoha dat. Je vhodná pro identifikaci a kvantifikaci organických sloučenin a měření zastoupení izotopů. Díky ní je umožněn rozvoj omických věd jako je metabolomika, proteomika nebo lipidomika, které umožňují hlubší výzkum. V současnosti je široce využívána ve sledování kvality v potravinářství, farmaceutickém průmyslu, zemědělství nebo v lékařství při

monitorování terapeutických hladin léků, toxikologii nebo testování novorozenců na dědičné metabolické poruchy [35].



Obrázek 8. Obecné schéma hmotnostního spektrometru

6.2 Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice nebo jejich fragmenty. Dělíme je na tvrdé a měkké ionizační techniky. U méně stabilních sloučenin nebo při použití tvrdých ionizačních technik vznikají fragmenty ionizovaných molekul [33].

Protože je každá látka z chemického hlediska jiná a může různě interagovat, nemůžeme použít na všechny látky pouze jednu ionizační techniku. Musíme zvážit její velikost i polaritu. Mezi základní ionizační techniky patří elektronová a chemická ionizace, chemická ionizace, fotoionizace pracující za atmosférického tlaku, ionizace laserem za účasti matrice a elektrosprejová ionizace [32].

6.2.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Elektrosprej je nejčastěji používaný způsob ionizace. Je využívána při analýze středně polárních až polárních látek. Patří mezi nejměkčí techniky, je velmi šetrná a netvoří se při ní fragmentové ionty. Vzorek je přiveden z kapalinového chromatografu kapilárou, na kterou je vloženo silné napětí. Zároveň na něj působí zmlžující a sušící plyn. Kapičky analytu po výstupu z kapiláry mají kladný nebo záporný náboj a díky neustálému odpařování rozpouštědla se zmenšují a náboj na povrchu narůstá. Při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické

explozi, kdy se vzorek rozpadne na ještě menší kapičky. Tento proces se opakuje, dokud nevzniknou samostatné ionty, které dále putují do hmotnostního analyzátoru [31, 33].

6.3 Hmotnostní analyzátor

Ionty vzniklé ionizací putují do hmotnostního analyzátoru, kde se rozdělí podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní analyzátory můžeme dělit na základní, mezi které patří např. iontová past, kvadrupól nebo analyzátor doby letu, a na hybridní, které jsou složeny z několika analyzátorů jdoucích po sobě (např. trojitý kvadrupól) [31].

6.3.1 Trojitý kvadrupól (QqQ)

Trojitý kvadrupól je typické uspořádání analyzátoru pro kvantitativní analýzu. Díky vysoké citlivosti, specifitě a cenové dostupnosti, je hojně využíván při analýze biologických matric. Jsou to tři za sebou spojené kvadrupóly. První slouží k zachycení požadovaného iontu, druhý jako kolizní cela, kde dochází k fragmentaci a v posledním kvadrupólu jsou fragmentované ionty analyzovány [32].

7 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- zjistit, zda je Sója luštinatá (*Glycine max*) schopna přijímat a dále metabolizovat fenbendazol,
- detekovat a identifikovat metabolity I. a II. fáze biotransformace,
- porovnat rozdíly metabolismu fenbendazolu v různých částí rostliny,
- navrhnout schéma biotransformace.

Experimentální část

8 Použití chemikálie a reagentie

- Acetonitril (Sigma Aldrich), LC/MS čistota
- Amoniak (Sigma Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich)
- Ethylacetát (Sigma Aldrich), LC/MS čistota
- Fenbendazol (Sigma Aldrich)
- Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich), LC/MS čistota
- Mebendazol (Sigma Aldrich)
- Methanol (Sigma Aldrich), LC/MS čistota
- Redestilovaná voda

9 Použité přístroje

- Analytická váha, Sartorius CP225D
- Automatické pipety, Eppendorf Research Plus
- Centrifuga, Heraeus Biofuge Stratos
- Hmotnostní spektrometr LCMS-8030 Triple quadrupole LC/MS/MS, Shimadzu
- Kapalinový chromatograf UHPLC Nexera, Shimadzu
- Kolona Zorbax RRHD Eclipse Plus 95 Å C18 150 x 2,1 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies
- Koncentrátor, Eppendorf Concentrator Plus
- Kuličkový homogenizátor, FastPrep-24
- Systém na získávání ultračisté vody Milli-Q RG
- Třepačka, Heidolph Multi Reax
- Ultrazvuková lázeň, Kraintek

10 Metodika práce

10.1 Pěstování modelové rostliny

Rostlinné vzorky sóji (*Glycine max*) byly pro tento experiment pěstovány za kontrolovaných podmínek v Botanickém ústavu Akademie věd České republiky v. v. i. v Průhonicích. Rostliny byly pěstovány z vlastního semene ve skleníku.

Semena byla očištěna v 70 % ethanolu po dobu 1 minuty, následně 10 minut sterilizována v 0,02 % roztoku TWEEN 20 s 1 % chlornanu sodného a třikrát opláchnuta sterilní vodou. Semena se nechala klíčit na agarovém Murashige a Skoog médiu při 25°C s fotoperiodou 16 hodin a intenzitou světla 72 μmol fotonu na metr čtverečný za sekundu. Celé rostliny byly kultivovány v boxech za stejných podmínek a pravidelně přesazovány každé 4 týdny.

Půda byla obohacena roztokem FBZ rozpuštěném v DMSO. Pro kontrolní, slepé vzorky rostlin, byl do půdy přidán pouze DMSO bez analyzovaného anthelmintika. Koncentrace byla určena podle předchozích experimentů, které byly provedeny na Katedře biochemických věd, na 10 μM FBZ v DMSO. Sběr probíhal v rozmezí jednoho až šesti týdnů, vždy po dvou týdnech a všechny vzorky včetně kontroly byly připraveny ve třech replikátech. Sklizené rostliny byly rozděleny po částech na kořeny, listy a lusky se semeny a uloženy v mrazících boxech při -80°C.



Obrázek 9 Připravené lusky a semena pro homogenizaci



Obrázek 10 List sóji (*Glycine max*) připravený pro analýzu

10.2 Extrakce

Do mikrozkušavek typu Eppendorf o objemu 2 ml bylo na analytických vahách naváženo 50 mg mraženého, případně 200 mg sušeného vzorku nebo všechna dostupná semena a lusky. Mikrozkušavka byla doplněna 1 ml redestilované vody a interní standard (IS) (10 µl 1mM mebendazolu rozpuštěného v DMSO). Následně proběhla homogenizace v homogenizátoru FastPrep-24 ve dvou cyklech po dobu 40 vteřin. Poté byl obsah mikrozkušavek přendán do větších 15 ml zkumavek Falcon vhodných pro centrifugaci a zbylý obsah mikrozkušavek propláchnut 1,5 ml vody. Ke vzorku bylo přidáno 250 µl amoniaku a 7,5 ml ethylacetátu v odvětrávané digestoři. Obsah zkumavek byl třepán na třepačce po dobu 30 minut. Extrahované vzorky se centrifugovaly při 10 000rpm při 25°C po dobu 5 minut. Supernatant byl zakoncentrován v koncentrátoru při 30°C do sucha. Vzorek byl následně převeden do mobilní fáze. Nakonec byl vzorek přefiltrován přes PTFE (polytetrafluoroethylen) filtr s velikostí pórů 0,22 µm a průměrem 2 µm a připraven pro LC/MS analýzu.

10.3 UHPLC/MS analýza

Analýza proběhla na ultravysokoučinném kapalinovém chromatografu Nexera s kolonou Zorbax RRHD Eclipse Plus 95 Å C18 o rozměrech 150 x 2,1 mm a velikostí částic 1,8µm. Byla použita teplota kolony 40°C, rychlost průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min a objem vstříkovaného vzorku 1 µl. Separace probíhala za gradientové eluce, kdy byla jako mobilní fáze použita voda (A) a acetonitril (B), obě mobilní fáze s příměsí 0,1 % kyseliny mravenčí. Gradientová eluce probíhala 11 minut následovně: 0 min-15 % fáze B, 8 min – 40 % fáze B, 10 min – 95 % fáze B. Parametry pro analýzu byly následující: napětí na kapiláře 4,5 kV, teplota termobloku 400°C, teplota kapiláry 250°C. Jako sušící plyn byl použit dusík s průtokem o rychlosti 12 l/min. Jako kolizní plyn argon a energie kolize 25 eV. Hmotnostní spektra byla měřena v rozmezí 50-1000 m/z v pozitivním módu, který vykazuje vyšší senzitivitu pro předpokládané metabolity, jež byly identifikovány na základě produktových a protonovaných iontů $[M + H]^+$. Jejich množství bylo stanoveno použitím mebendazolu (MBZ) jako interního standardu pomocí poměru ploch píku MBZ vůči jednotlivým metabolitům.

Výsledky

Biotransformace anthelmintika FBZ byla studována v sóji luštinaté (*Glycine max*), přesněji v extraktech z kořene, listu, lusku a semen. Testované anthelmintikum bylo přidáno do média v koncentraci 10 μM v DMSO nebo pouze DMSO bez anthelmintika pro kontrolní vzorek a společně s ní kultivována podle metodiky popsané v kapitole 10.1. Hluboce mražené vzorky byly dále extrahovány a následně analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS techniky. Měření bylo provedeno v pozitivním módu, který vykazuje vyšší senzitivitu pro předpokládané metabolity, jež byly identifikovány na základě produktových a protonovaných iontů. Podle nich bylo možné zjistit, které reakce biotransformace v rostlině proběhly. Jejich množství bylo stanoveno použitím MBZ jako interního standardu pomocí poměru ploch píku MBZ vůči jednotlivým metabolitům.

10.4 Identifikace metabolitů FBZ

Detekce a identifikace metabolitů i parentní látky odhalila, že rostlina sóji (*Glycine max*) je schopna absorbovat a metabolizovat toto léčivo. Produktové ionty, retenční časy a teoretické hodnoty m/z všech metabolitů a parentní látky, včetně popisu tvorby metabolitů v první i druhé fázi jsou zobrazené v Tabulce 3. Schéma metabolické přeměny FBZ a jeho produkty v rostlinných regenerantech je znázorněno na Obrázku 11.

Protonovaná molekula parentní látky FBZ byla detekována v retenčním čase 9,60 min při m/z 300 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Byl detekován i jeho typický produktový ion o m/z 268, který je produktem neutrální ztráty methanolu ($\Delta m/z$ 32), a jeho dva fragmentové iony s m/z 159 a 131. Druhý z uvedených vznikl jako další neutrální ztráta methanolu.

Celkem bylo identifikováno 10 různých metabolitů FBZ v listu, 9 v kořenu a lusku a pouze 8 metabolitů v semenech.

Tabulka 2 Zastoupení metabolitů v rostlině

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	FBZ
kořen	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
list	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lusk	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
semeno	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+

10.4.1 Metabolity první fáze biotransformace

Během první fáze biotransformace byly identifikovány metabolity, které prošly hydrolýzou, oxidací a hydroxylací. Hydrolýza byla detekována u čtyř metabolitů (M1, M4, M6 a M8), S-oxidace u M3, hydroxylace u M6 a oxidace/hydroxylace u pěti metabolitů (M1, M2, M6, M7 a M8). Metabolit M5 jako jediný, u kterého neproběhla druhá fáze biotransformace byl detekován v čase 5,18 min s m/z 316 $[M+H]^+$.

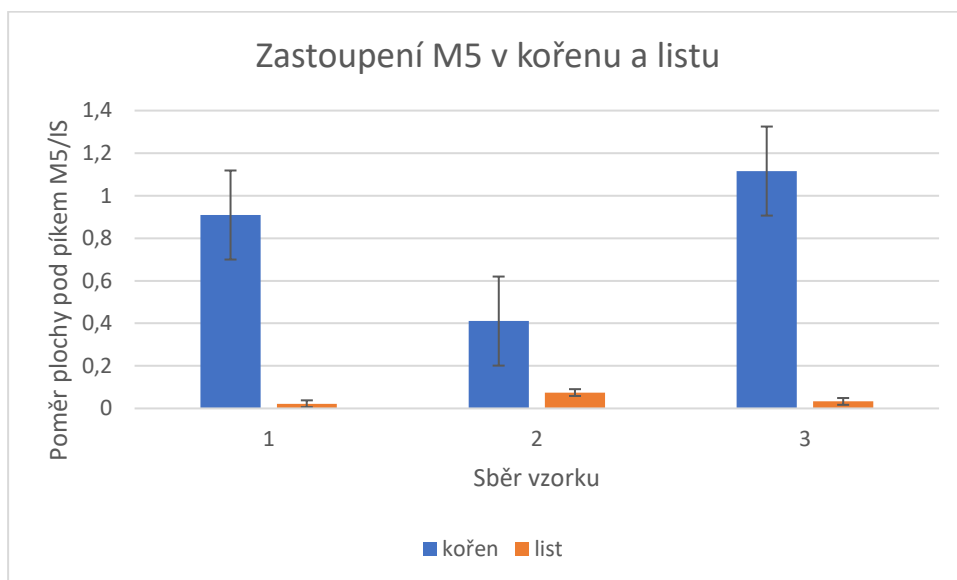
10.4.2 Metabolity druhé fáze biotransformace

Mezi reakce druhé fáze biotransformace patří především glykosidace (konjugace s UDP-hexosou) a acetylace. Charakteristickou neutrální ztrátou u glykosidace bylo odštěpení hexosy ($\Delta m/z$ 162), která byla detekována u všech metabolitů s glykosidací (M2, M3, M4 a M9). Dalšími detekovanými metabolity byly M1, M7 a M8, u kterých proběhla konjugace s acetylglykosidem, s jeho typickou neutrální ztrátou ($\Delta m/z$ 220), kterému předcházela hydrolýza nebo oxidace/hydroxylace. Metabolit M10 vznikl dvojnásobnou *N*-glykosidací, která byla detekována i u metabolitu M6 s následnou acetylací.

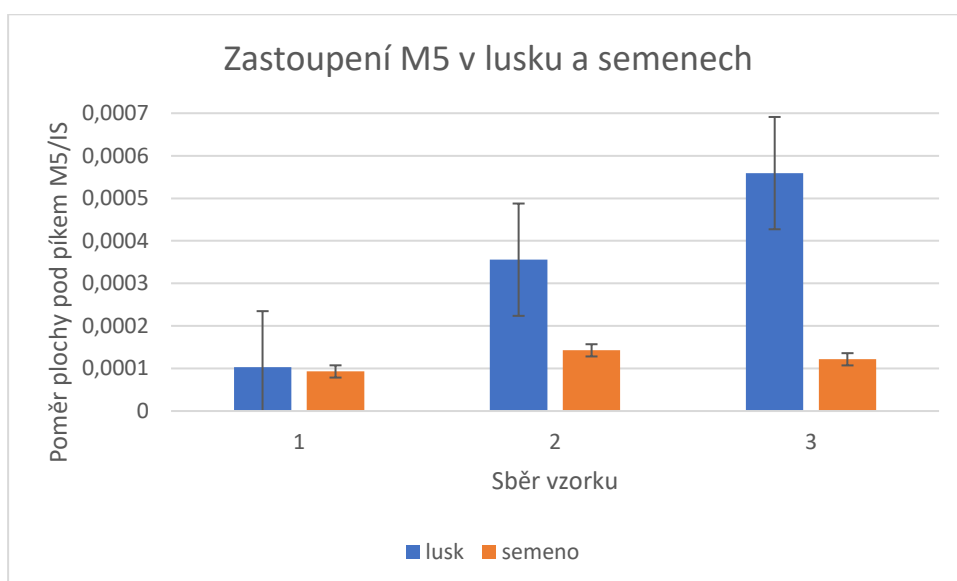
10.5 Zastoupení metabolitů v různých částech rostliny

Dalším cílem práce bylo porovnat zastoupení metabolitů v různých částech rostliny. Pro porovnání množství FBZ a jeho metabolitů byla použita metoda vnitřního standardu za použití mebendazolu (MBZ). Z výsledků je patrné, že v mladších částech rostliny metabolitů FBZ ubývá. V listu bylo analyzováno všech 10 metabolitů, v kořenu a lusku 9 a v semenech pouze 8. Všechny analyzované části modelové rostliny obsahovaly parentní látku FBZ. V grafech 1 (pro kořen a list) a 2 (pro lusk a semeno) je uvedeno porovnání zastoupení metabolitu M5, v grafech 3 (pro kořen a list) a 4 (pro lusk a semeno) zastoupení metabolitu M9. Metabolit M5 je jediný, a tedy i nejvíce zastoupený metabolit první fáze biotransformace v jednotlivých částech rostliny, M9 je nejvíce zastoupený metabolit druhé fáze biotransformace. V lusku koncentrace M5 v čase roste. Stejně tak je to u metabolitu M8, jehož množství v listu stoupá, což můžeme vidět v grafu 3. Metabolit M5 byl nejvíce obsažen v kořenu, následně v lusku a semenech a nejméně ho bylo v listu. *N*-glykosidovaného FBZ – metabolitu M9 bylo nejvíce v listu. Druhé největší zastoupení měl v lusku, nepatrné množství obsahoval i kořen a zanedbatelné množství ho bylo v semenech. Při druhém sběru bylo M5 v kořenu o polovinu

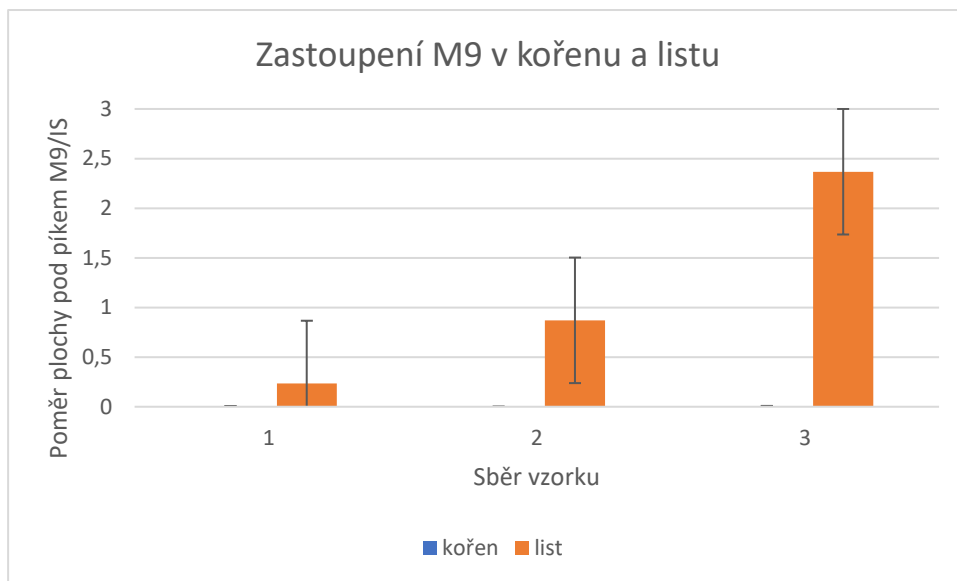
méně než při prvním a posledním. Opačně se tak stalo s metabolitem M9, kdy byla jeho největší koncentrace naměřená při druhém sběru.



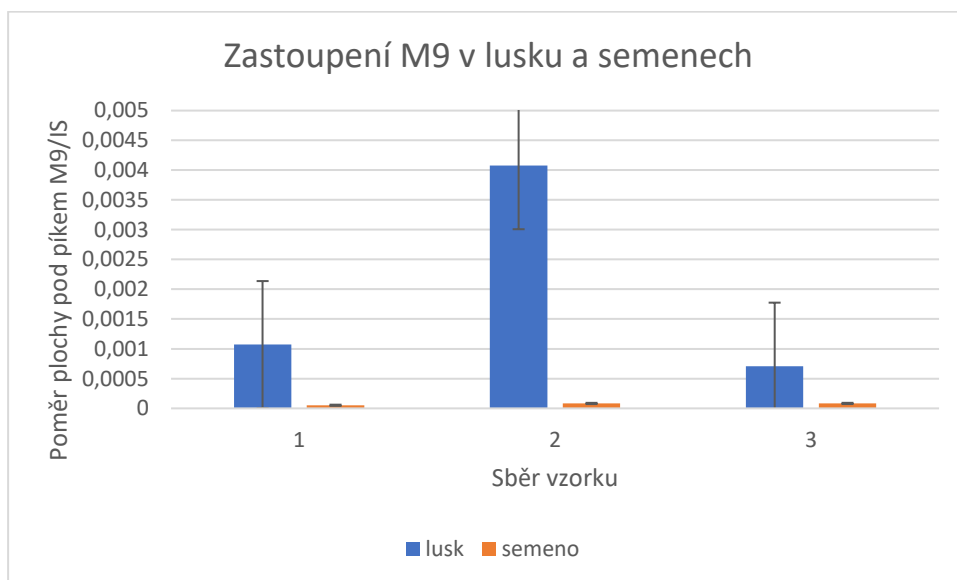
Graf 1 Zastoupení M5 v kořenu a listu GM



Graf 2 Zastoupení M5 v lusku a semenech GM



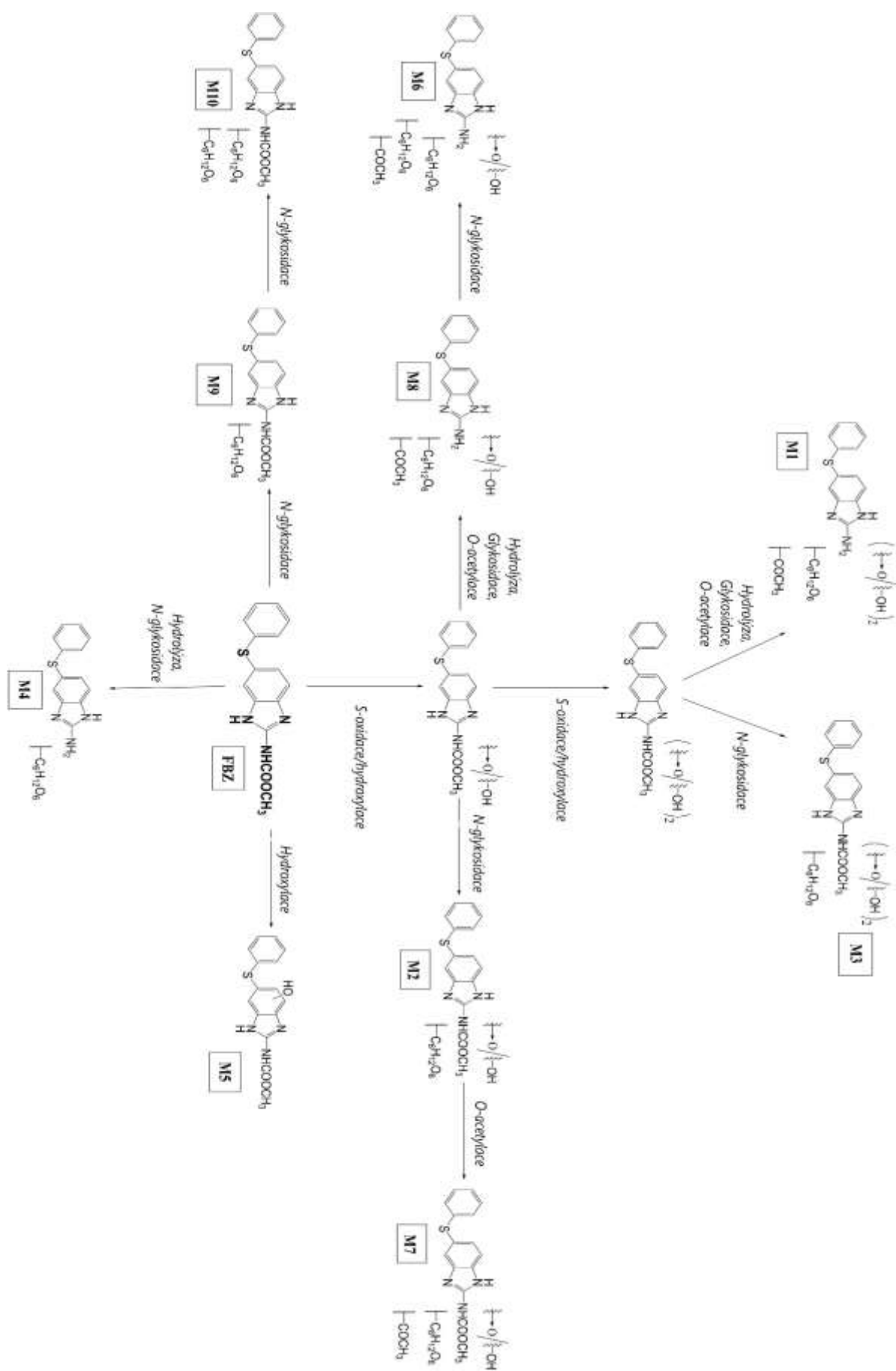
Graf 3 Zastoupení M9 v kořenu a listu GM



Graf 4 Zastoupení M9 v lusku a semenech GM

Tabulka 3 Přehled metabolitů FBZ analyzovaných pomocí spojení UHPLC-MS/MS, t_R , teoretické m/z hodnoty $[M+H]^+$ iontů, elementární složení, produktové ionty

t_R [min]	Teoretické m/z hodnoty $[M+H]^+$ iontů	Elementární složení	Popis tvorby metabolitů		Produktové ionty $[M+H]^+$, m/z	Zkratka metabolitů
			1. fáze	2. fáze		
3.24	478.1278	$C_{21}H_{23}N_3O_8S$	2*O, hydrolýza	glykosidace, O-acetylce	258, 133	M1
3.74	478.1278	$C_{21}H_{23}N_3O_8S$	O	N-glykosidace	316, 284, 191	M2
4.55	494.1227	$C_{21}H_{23}N_3O_9S$	2*S-oxidace	N-glykosidace	332, 300	M3
4.99	404.1274	$C_{19}H_{21}N_3O_5S$	hydrolýza	N-glykosidace	-	M4
5.18	316.075	$C_{15}H_{13}N_3O_3S$	hydroxylace	-	266, 207, 191, 175, 159, 131	M5
5.53	624.1842	$C_{27}H_{33}N_3O_{12}S$	O, hydrolýza	2*glykosidace, O-acetylce	462, 368, 242	M6
5.75	520.1384	$C_{23}H_{25}N_3O_9S$	O	N-glykosidace, O-acetylce	316, 299, 284, 207, 191, 159	M7
6.10	462.1329	$C_{21}H_{23}N_3O_7S$	O, hydrolýza	Glykosidace, O-acetylce	320, 242	M8
6.56	462.1329	$C_{21}H_{23}N_3O_7S$	-	N-glykosidace	300, 268, 159	M9
7.20	624.1839	$C_{27}H_{33}N_3O_{12}S$	-	2*glykosidace	300, 268	M10
9.60	300.0801	$C_{15}H_{13}N_3O_2S$	-	-	268, 159, 131	FBZ



Obrázek 11 Schéma metabolitů FBZ v sóje (*Glycine max*)

10.6 Kvantifikace FBZ

Pro kvantifikaci fenbendazolu a jeho metabolitů byla použita metoda vnitřního standardu. K růstovému médiu byla přidána suspenze 10 μM mebendazolu v DMSO. Jednotlivé plochy pod píky metabolitů byly porovnávány s plochou pod píkem MBZ a čím určena jejich relativní kvantifikace.

11 Diskuze

Sója luštinatá je jednou z nejčastěji pěstovaných obilnin a plní tedy velkou roli v biotransformačních studiích. Studovány jsou biotransformační reakce a výsledné metabolity různých léčiv. Tato rostlina byla například použita k pokusům o přečištění kontaminované půdy od antibiotik (oxytetracyklinu a norfloxacinu) u krevetových farem v Thajsku. Tamní znečištěná půda měla i zvýšenou slanost, a z této příčiny její znovu vyžití může být problematické. Proto se pro tento experiment vytvořila dvě prostředí. První bylo s antibiotiky a s vysokým stupněm slanosti a druhé s přidavkem antibiotik v deionizované vodě. Klíčivost sóji byla mírně snížena kvůli slanému prostředí, přesto i v tomto prostředí sója vyrostla a výsledkem bylo odstranění až 90 % NaCl z prostředí. Rostliny nejvíc absorbovaly během prvních dvou dnů, potom došlo k vadnutí a padání listů. Samotné rostliny se dokázaly zotavit po 10 dnech. V deionizované vodě sója rostla pomaleji, ale byla také schopna absorbovat antibiotika. Z výsledků analýzy bylo patrné, že maximální hladiny antibiotik v rostlinách byly po dvou dnech a poté začaly postupně klesat, což dokazuje schopnost rostlin biotransformovat oxytetracyklin a norfloxacin. Jsou tedy vhodné i pro tento způsob fytořemediace [36].

Mezi nejvíce nadužívaná léčiva patří nesteroidní antiflogistika (NSAID), která jsou organismy vyloučena a hromaděna v odpadních vodách. Cortés et al provedl skleníkový pokus, kdy se do půdy, ve které se pěstovaly rostliny sóji a pšenice, přidával kal posbíraný ze vstupu čističek odpadních vod. V tomto kalu byla vyhodnocena čtyři NSAID – naproxen, ketoprofen, diklofenak a ibuprofen. Rostliny byly sklizeny po 60 a 110 dnech a proběhla analýza zbylého kalu v půdě a samotných rostlin. Výsledky ukázaly, že v kalu se po experimentu nachází pouze diklofenak a ibuprofen v nízkých koncentracích. Žádný z NSAID nebyl v plodinách detekován, což naznačuje úplnou biotransformaci absorbovaných léčiv [37].

V posledních letech se jako nejvíce používaná anthelmintika používají ta benzimidazolová, mezi něž patří i fenbendazol. Používají se při nákaze parazitickými helminty, ale i jako preventivní profylaxe. Přirozeně se tedy přes cílová zvířata dostávají trusem nebo močí i do životního prostředí. Je tedy čím dál víc zřejmé, že je nutné hledat způsoby, jak tyto xenobiotika můžeme efektivně dostávat ze znečištěného prostředí, protože se jejich koncentrace v životním prostředí stále zvyšuje [38].

Benzimidazolová anthelmintika byla nalezena v odpadních a povrchových vodách v koncentracích kolem 1 ng/l, proto jsou tyto hodnoty kontrolovány kolem farmaceutických továren. Protože mechanismus účinku působí nespecificky na mikrotubuly, musíme hodnotit

jejich možný účinek na vodní flóru a faunu, která je nejvíce ovlivňována odpadními a povrchovými vodami. Například v roce 2014 byl proveden experiment, ve kterém se studoval vliv FLU a FBZ na čtyři vodní organismy. Byly použity mořské bakterie *Vibrio fischeri*, zelené řasy *Scenedesmus vacuolatus*, žabinec *Lemna minor* a perloočka (*Daphnia magna*). Výsledek ukázal, že nejcitlivějším organismem byla perloočka. Tyto organismy v ekosystému může ovlivnit i množství v rozmezí ng/l až µg/l FBZ a FLU [39].

U klasického používání anthelmintik, kdy zvířata žijí ve volné přírodě nebo se jejich trus používá k hnojení polí, se tyto xenobiotika nebo jejich metabolity dostávají do polí a luk a můžou tak negativně ovlivňovat běžně rostoucí flóru na daném místě. Měli bychom se tedy zajímat i o to, jak xenobiotika na rostliny působí nebo jestli mají naopak pozitivní vliv na životní prostředí a dokáží je odbourat nebo naopak ne a skrze ně mohou dále vstupovat do potravního řetězce.

Při porovnání detekovaných metabolitů FBZ v sóje a experimentem provedeným v roce 2016, kdy se hodnotil vliv FBZ, FLU a ABZ v buněčných suspenzích, pouze s rostlinou zvonku okrouhlohlístého (*Campanula rotundifolia*, CR), jsme došli k závěru, že GM biotransformuje FBZ na stejné metabolity jako CR. U předchozího experimentu bylo analyzováno 29 metabolitů, většina z nich jako izomery, které z MS spekter nemůžeme rozlišit pomocí fragmentačních iontů [40, 41].

V porovnání s další studií na rostlinných regenerantech jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*, PL), který byl pěstován a analyzován za stejných podmínek jako GM bylo u rostliny PL vyhodnoceno metabolitů 22. U GM byl nalezen navíc jeden metabolit, který měl o jednu glykosidickou skupinu navíc. To ale může být způsobené vysokou nestabilitou glykosidických skupin, které se snadno rozkládají zpět na předešlý metabolit [42, 43].

Z tohoto experimentu a dvou předchozích, které studovaly biotransformaci FBZ v různých často vyskytujících se nebo používaných rostlinách v naší přírodě, je jisté, že přestože tyto rostliny umí částečně metabolizovat tuto patentní látku, je nadále obsahována i v jejich semenech. Rostliny sóji se nejvíce využívají pro krmení dobytka a se semeny sóji se můžeme potkat v různých formách náhražek masa, proto je velice pravděpodobné, že i my se svojí potravou, ať rostlinnou či živočišnou, můžeme přijímat malá množství tohoto léčiva. Jinými slovy je jisté, že se teorie experimentu potvrdila a FBZ vstupuje do potravního řetězce. Nicméně pro přesnější výsledky je nutné ve studii pokračovat a rozšířit ji na přirozené prostředí. Tedy chovat zvířata léčená FBZ jejichž trus bude dál použit k hnojení rostlin.

12 Závěr

Pro experiment byly za stanovených podmínek vypěstovány rostliny sóji (*Glycine max*), které sloužily jako modelový organismus pro sledování biotransformace vybraného anthelmintika – FBZ.

Z výsledků analýzy bylo zjištěno, že sója byla schopna anthelmintikum absorbovat a dále metabolizovat. Pomocí analýzy za použití UHPLC/MS techniky bylo zaznamenáno a vyhodnoceno, že GM byla schopna biotransformovat FBZ na 10 metabolitů.

Po zjištění chemické struktury metabolitů bylo navrženo schéma biotransformace, z něhož bylo možné posoudit, i které biotransformační reakce jednotlivé metabolity podstoupily a určit, kterých fází se účastnily. Detekovanými reakcemi první fáze byla hydrolýza, oxidace a hydroxylace. Při druhé fázi biotransformace docházelo ke glykosidaci a acetylaci.

Dále byly hodnoceny rozdíly v zastoupení jednotlivých metabolitů u kořene, listu, lusku a semen sóji.

Cíle této diplomové práce byly potvrzeny, přesto je však vhodné tento experiment rozšířit a vložit ho do skutečné situace.

13 Seznam zkratek

ABZ – albendazol

CR – *Campanula rotundifolia*

CYP – cytochrom P450

DMSO – dimethylsulfoxid

ESI – elektrosprej

FBZ – fenbendazol

FLU – flubendazol

GM – *Glycine max*

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IS – interní standard

LLE – extrakce z kapaliny do kapaliny

m/z – poměr hmotnost/náboj

MBZ – mebendazol

MS – hmotnostní spektrometrie

NSAID – nesteroidní antiflogistikum

PL – *Plantago lanceolata*

PTFE – polytetrafluorethylen

QqQ – trojitý kvadrupól

t_R – retenční čas

14 Seznam obrázků

Obrázek 1 Různé cesty fytořemediace (https://blogs.umass.edu/natsci397a-cross/phytoremediation-the-future-of-environmental-remediation/)	13
Obrázek 2. Chemická struktura benzimidazolů (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/Benzimidazole_chemical_structure.png).....	18
Obrázek 3 Chemická struktura fenbendazolu (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/bc/Fenbendazole.svg/1200px-Fenbendazole.svg.png).....	19
Obrázek 4 Komerčně dostupný přípravek Panacur® pro dobytek (http://www.infovets.com/books/beef/C/Images/C226.jpg)	19
Obrázek 5 Schéma rostliny sóji (https://farm7.staticflickr.com/6142/5936310867_dea9065a18_b.jpg).....	21
Obrázek 6 Glycine max – plod (https://botany.cz/cs/glycine-max/).....	23
Obrázek 7. Obecné schéma instrumentace HPLC systému (https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf?lang=cs)	25
Obrázek 8. Obecné schéma hmotnostního spektrometru	27
Obrázek 9 Připravené lusky a semena pro homogenizaci	33
Obrázek 10 List sóji (Glycine max) připravený pro analýzu	33
Obrázek 11 Schéma metabolitů FBZ v sóje (Glycine max).....	41

15 Seznam tabulek

Tabulka 1 Biologická klasifikace sóji (https://cs.wikipedia.org/wiki/S%C3%B3ja_lu%C5%A1tinat%C3%A1)	22
Tabulka 2 Zastoupení metabolitů v rostlině	36
Tabulka 3 Přehled metabolitů FBZ analyzovaných UHPLC-MS/MS, t_R , teoretické m/z hodnoty $[M+H]^+$ iontů, elementární složení, produktové ionty	40

16 Seznam grafů

Graf 1 Zastoupení M5 v kořenu a listu GM	38
Graf 2 Zastoupení M5 v lusku a semenech GM.....	38
Graf 3 Zastoupení M9 v kořenu a listu GM	39
Graf 4 Zastoupení M9 v lusku a semenech GM.....	39

17 Seznam použité literatury

[1] DOBŠÍKOVÁ, Radka, Zuzana ŠIROKÁ a Jana BLÁHOVÁ. *Farmakologie v produkci potravin: pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-616-2.

[2] ATKINSON, Arthur J., Charles E. DANIELS, Sanford P. MARKEY, Darrell R. ABERNETHY a Robert L. DEDRICK. CHAPTER 24 - Drug Therapy in the Elderly. *Principles of clinical pharmacology*. 2. Boston: Academic Press, 2007, s. 375-388. ISBN 978-0-12-369417-1.

[3] SHEHATA, Hassan. Chapter Twelve - Drugs and drug therapy. BENNETT, Phillip a Catherine WILLIAMSON. *Basic science in obstetrics and gynaecology: a textbook for MRCOG Part I*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 2010, s. 259-277. ISBN 978-0-443-10281-3.

[4] SKÁLOVÁ, Lenka a Iva BOUŠOVÁ. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1917-0.

[5] RENTON, K.W. Factors affecting drug biotransformation. *Clinical Biochemistry*. 1986, **19**(2), 72-75. DOI: 10.1016/S0009-9120(86)80051-0. ISSN 00099120. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912086800510>

[6] Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in biotechnology* [online]. 1995, Zář 1995, **13**(9), 393-397 [cit. 2019-02-20]. DOI: S0167-7799(00)88987-8. ISSN 0167-7799. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779900889878?via%3Dihub>

[7] KUČEROVÁ, Petra, Martina MACKOVÁ a Tomáš MACEK. PERSPEKTIVY FYTOREMEDIACE PŘI ODSTRAŇOVÁNÍ ORGANICKÝCH POLUTANTŮ A XENOBIOTIK Z ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. *Chemické listy*[online]. 1999, **1999**(93), 19-26 [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/download/2640/2640/>

[8] MACKOVÁ, Martina a Tomáš MACEK. *Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6 - Ruzyně, 2005. Draft. VŠCHT.

[9] CHROMÁ, Ludmila, Martina MACKOVÁ a Tomáš MACEK. ROSTLINNÉ CYTOCHROMY P450 A PEROXIDASY A JEJICH ÚLOHA PŘI DEGRADACI KONTAMINANTŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. *Chemické listy* [online]. 2001, **2001**(95),

212-222 [cit. 2019-06-22]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/04-PDF/212-222.pdf>

[10] CONDER, George A. CHAPTER 34 - Anthelmintics. FINCH, Roger G., Ragnar NORRBY, David GREENWOOD a Richard J. WHITLEY. *Antibiotic and Chemotherapy*. 9. Saunders, 2011, s. 395-405. ISBN 978-0-7020-4064-1.

[11] YADAV, Piyush & Singh, Rupali. (2011). A review on anthelmintic drugs and their future scope. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3. 17-21.

[12] LAMKA, Jiří a Lubomír DUCHÁČEK. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Vyd. 4., nezměn. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2790-8.

[13] KAMINSKY, Ronald, Pierre DUCRAY, Martin JUNG, et al. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* [online]. 2008, **452**(7184), 176-180 [cit. 2019-08-22]. DOI: 10.1038/nature06722. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature06722>

[14] PUBLIC RELEASE SUMMARY on the Evaluation of the New Active Monepantel in the Product Zolvix Monepantel Broad Spectrum Oral Anthelmintic for Sheep: APVMA Product Number 62752. *Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority* [online]. 2010, Červen 2010, , 1-85 [cit. 2019-08-22]. ISSN 1443-1335. Dostupné z: <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14141-prs-monepantel.pdf/>

[15] LECOVÁ, L., L. STUHLÍKOVÁ, L. PRCHAL a L. SKÁLOVÁ. Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*. 2014, **141**(13), 1686-1698. DOI: 10.1017/S0031182014001401. ISSN 0031-1820. Dostupné také z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182014001401/type/journal_article

[16] Ivermektin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2019 [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Ivermektin>

[17] Residues of some veterinary drugs in animals and foods: monographs prepared by the fiftieth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : Rome, 17-26 February 1998. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999. ISBN 92-510-4280-2.

[18] A drug made for animals and taken by humans to treat cancer: fendendazole. Blog: cancer treatments - from research to application [online]. Netherlands, 2015, 19.10.2018 [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <https://www.cancertreatmentsresearch.com/fenbendazole/>

[19] JUNQUERA, P. FENBENDAZOLE: anthelmintic for veterinary use in CATTLE, SHEEP, GOATS, PIG, POULTRY, HORSES, DOGS and CATS against roundworms and tapeworms. *PARASITIPEDIA.net* [online]. Switzerland, 2018, 18.10.2018 [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2512&Itemid=278

5

[20] Fenbendazole. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2019, 28.7.2019 [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Fenbendazole>

[21] SÓJA LUŠTINATÁ (Glycine soja). *Centrum informačních technologií VFU* [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/soja.htm>

[22] ŠTRANC, Přemysl. *Polní dny sója 2004*. 1. České Budějovice: Agromanuál, 2004.

[23] O sóji. *EKOPRODUKT* [online]. Kuřim [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <https://www.soja.cz/o-soji.html>

[24] Sója luštinatá (Glycine soja). *Zemědělská fakulta Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích* [online]. [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/soja_lustinata.html

[25] Glycine max (L.) Merr [online]. 1998 [cit. 2019-08-10]. Dostupné z: https://hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Glycine_max.html

[26] *Glycine max* [online]. Zelen.cz [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: http://www.zelen.cz/detail_galerie_rostlin/Glycine_max_soja_lustinata

[27] Extrakce. *Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity* [online]. Brno [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>

[28] *Rousselet Robotel: Principy separace a extrakce* [online]. [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: <http://www.rousselet.cz/principy/principy2.html>

[29] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-802-4622-026.

[30] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-802-6042-440.

[31] HOFFMANN, Edmond de a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 2. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

[32] GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry*. 2. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer, 2011. ISBN 978-3-642-10709-2.

[33] DASS, Chhabil. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. 1. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 978-0-471-68229-5.

[34] *Cena Vladimíra Hanuše* [online]. [cit. 2019-08-22]. Dostupné z: http://www.spektroskopie.cz/?q=cena_Vladimira_Hanuse

[35] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, (3.), 152-157. ISSN 1210-7921.

[36] BOONSANER, M. a D.W. HAWKER. Accumulation of oxytetracycline and norfloxacin from saline soil by soybeans. *Science of The Total Environment*. 2010, **408**(7), 1731-1737. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.12.032. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969709012674>

[37] CORTÉS, José Manuel, Estelle LARSSON a Jan Åke JÖNSSON. Study of the uptake of non-steroid anti-inflammatory drugs in wheat and soybean after application of sewage sludge as a fertilizer. *Science of The Total Environment*. 2013, **449**, 385-389. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.061. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713001162>

[38] HORVAT, A.J.M., S. BABIĆ, D.M. PAVLOVIĆ, D. AŠPERGER, S. PELKO, M. KAŠTELAN-MACAN, M. PETROVIĆ a A.D. MANCE. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012, **31**, 61-84. DOI: 10.1016/j.trac.2011.06.023. ISSN 01659936. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993611002937>

[39] WAGIL, Marta, Anna BIAŁK-BIELIŃSKA, Alan PUCKOWSKI, et al. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, **22**(4), 2566-2573. DOI: 10.1007/s11356-014-3497-0. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3497-0>

[40] NOBILIS, Milan, Pavel ANZENBACHER, Jiří PASTERA, Zbyněk SVOBODA, Kamil HRUBÝ, Jaroslav KVĚTINA, Karel UBIK a František TREJTAR. Study of the biotransformation of a potential benzo[c]fluorene antineoplastic using high-performance liquid chromatography with high-speed-scanning ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1996, **681**(1), 143-151. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00523-4. ISSN 03784347. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378434795005234>

[41] SZOTÁKOVÁ, Barbora, Lucie Raisová STUHLÍKOVÁ, Lenka SKÁLOVÁ a Radka PODLIPNÁ. *Phytotoxicity and Biotransformation of Fenbendazole in Ribwort*. 2017, , -. DOI: 10.11159/icepr17.144. Dostupné také z: http://avestia.com/NewTech2017_Proceedings/files/paper/ICEPR/ICEPR_144.pdf

[42] STUHLÍKOVÁ, Lucie Raisová, Lenka SKÁLOVÁ, Barbora SZOTÁKOVÁ, Eliška SYSLOVÁ, Ivan VOKŘÁL, Tomáš VANĚK a Radka PODLIPNÁ. Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018, **147**, 681-687. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.020. ISSN 01476513. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651317305961>

[43] STUHLÍKOVÁ, Lucie, Robert JIRÁSKO, Lenka SKÁLOVÁ, František PAVLÍK, Barbora SZOTÁKOVÁ, Michal HOLČAPEK, Tomáš VANĚK a Radka PODLIPNÁ. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*). *Chemosphere*. 2016, **157**, 10-17. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.015. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516306440>