

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických vied

**MONITOROVANIE ROZŠÍRENIA ALBENDAZOLU Z TRUSU  
OVCE DOMÁCEJ V POĽNOHOSPODÁRSKEJ PÔDE  
S POMOCOU LC-MS**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce:

prof. RNDr. Lenka Skálová PhD.

Konzultantka:

Mgr. Martina Navrátilová

Hradec Králové 2021

Bc. Daniela Vrábl'ová

**PREHLÁSENIE:**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Každá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 14.05.2021

Podpis: \_\_\_\_\_

## **POĎAKOVANIE**

Chcela by som veľmi pekne poďakovať vedúcej diplomovej práce prof. RNDr. Lenke Skálovej PhD. za jej milý prístup, pochopenie, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky k diplomovej práci. Veľké ďakujem patrí mojej konzultantke Mgr. Martine Navrátilovej za jej trpezlivosť, priateľský prístup, získané skúsenosti, záchrannú pomoc a jej vzácny čas, ktorý mi venovala pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Moje poďakovanie patrí aj celému kolektívu Katedry biochemických vied, ktorí mi umožnili vypracovávať diplomovú prácu v príjemnom prostredí a laboratórnych podmienkach.

Najväčšie ďakujem však patrí mojim rodičom, súrodencom a môjmu priateľovi, ktorí mi boli počas celého magisterského štúdia a vypracovávaní tejto diplomovej práce oporou a mali pre mňa vždy pochopenie.

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických vied**

**Kandidát:** Bc. Daniela Vrábřová

**Školiteľ:** prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Martina Navrátilová

**Názov diplomovej práce:** Monitorovanie rozšírenia albendazolu z trusu ovce domácej v poľnohospodárskej pôde s pomocou LC-MS

Antihelmintický liek albendazol (ABZ) so širokospektrálnym účinkom sa používa na liečbu helmintóz spôsobených prevažne gastrointestinálnymi červami vo veterinárnej a humánnej medicíne.

Časté, nadmerné alebo nedostatočné dávkovanie predstavuje riziko vzniku rezistencie, čo predstavuje vážny globálny problém pri terapii helmintóz. Anthelmintiká môžu do životného prostredia vstupovať v nezmenenej podobe ako parentná látka alebo ako jej metabolit stolicou liečených zvierat. Tieto chemikálie sa môžu absorbovať do rastlín, pôdy a podzemných vôd a môžu mať negatívny vplyv na život a rast ďalších organizmov.

Tato štúdia bola zameraná na monitorovanie rozšírenia albendazolu a jeho transformačných produktov (TP) albendazolu sulfoxidu (ABZSO) a albendazolu sulfónu (ABZSO<sub>2</sub>) z výkalov ošetrovaných oviec domácich v poľnohospodárskej pôde. Sledovali sa rôzne vzdialenosti a hĺbky, do ktorých sa zlúčeniny mohli šíriť. Parentná látka a TP boli extrahované z pôdy pomocou disperznej extrakcie na pevnej fáze (QuEChERS) a identifikácia a kvantifikácia boli uskutočnené pomocou UHPLC-MS. Podľa očakávania bolo množstvo zlúčenín v pôde vyššie vo vrchnej vrstve ako v spodnej vrstve a klesalo so vzdialenosťou od výkalu. Pozorovali sme tiež závislosť zmien v koncentrácii látok od zrážok (suché a daždivé mesiace).

## ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Bc. Daniela Vrábřová

**Supervisor:** prof. RNDr. Lenka Skálová Ph.D.

**Consultant:** Mgr. Martina Navrátilová

**Title of diploma thesis:** Monitoring the spread of albendazole from the sheep faeces in agricultural land by LC-MS

The anthelmintic drug albendazole (ABZ) with a broad-spectrum anthelmintic effect is used for the treatment of helminthiasis caused mainly by gastrointestinal worms in veterinary and human medicine. Frequent dose, overdose or underdose make a risk of developing resistance, which can be a serious global problem in the treatment of helminthiasis. The anthelmintics can enter the environment unchanged as a parent compound or as a metabolite through the faeces of treated animals. These chemicals can be absorbed into plants, soil and groundwater and they can have a negative impact on the life and growth of smaller organisms.

This study aimed to monitor the distribution of albendazole and its transformation products (TPs) albendazole sulfoxide (ABZSO) and albendazole sulfone (ABZSO<sub>2</sub>) from the faeces of treated domestic sheep in agricultural land. TPs amount was analysed in soil sampled in different distances and depths from faeces of sheep treated with recommended dose of ABZ. The parent drug and TPs were extracted from soil using the solid-phase dispersion extraction (QuEChERS) and identification and quantification were done by UHPLC-MS. As expected, the amount of the compounds in the soil was greater in the topsoil than in the bottom layer and it decreased with the distance from the faeces. We also observed the dependence of changes in substance concentration on rainfall (dry and rainy months).

## **OBSAH**

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>9</b>
1. Antihelmintiká.....	9
1.1. Benzimidazoly .....	10
1.1.1. Tiabendazol .....	11
1.1.2. Albendazol .....	13
1.2. Rezistencia helmintov .....	15
1.3. Vplyv na životné prostredie .....	18
2. Úprava vzorky pred analýzou .....	20
2.1. Priama extrakcia do rozpúšťadla .....	21
2.2. Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE).....	22
2.3. Extrakcia na tuhú fázu (SPE).....	23
2.3.1. Disperzná extrakcia na tuhú fázu (QuEChERS).....	25
3. Kvapalinová chromatografia .....	28
3.1. Kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie .....	30
3.1.1. Vybraný interný štandard .....	34
4. Kvantifikácia látok pomocou LC-MS .....	35
5. Ciele práce.....	38
<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>39</b>
6. Použité chemikálie, prístrojové vybavenie a pracovné pomôcky .....	39
6.1. Chemikálie .....	39
6.2. Prístrojové vybavenie .....	39
6.3. Pracovné pomôcky .....	40
6.4. Príprava mobilnej fáze, príprava štandardov, organického rozpúšťadla, extrakčnej zmesi, kalibračných kriviek a ich rozsah. ....	40
6.4.1. Príprava mobilnej fáze .....	40

6.4.2.	Príprava zásobných roztokov štandardov.....	41
6.4.3.	Príprava pracovných roztokov štandardov.....	41
6.4.4.	Príprava organického rozpúšťadla .....	41
6.4.5.	Príprava extrakčnej zmesi .....	41
6.4.6.	Príprava kalibračných kriviek a ich rozsah .....	42
7.	Priebeh experimentu.....	42
7.1.	Podanie albendazolu a odber vzoriek trusu .....	43
7.2.	Aplikácia trusu na experimentálne pole.....	44
7.3.	Odber vzoriek pôdy .....	46
7.4.	Úprava vzoriek pôdy pred extrakciou.....	47
7.5.	Extrakcia sledovaných látok z pôdy .....	49
8.	Stanovenie analytov pomocou LC/MS .....	55
8.1.	Chromatografické podmienky .....	56
8.2.	Podmienky hmotnostného analyzátoru.....	61
8.3.	Validácia metódy .....	63
9.	VÝSLEDKY .....	64
9.1.	Kvantitatívne vyhodnotenie.....	64
9.2.	Semikvantitatívne vyhodnotenie.....	67
10.	DISKUSIA.....	76
11.	ZÁVER.....	79
	<b>ZOZNAM SKRATIEK .....</b>	<b>80</b>
	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>82</b>
	<b>ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>91</b>
	<b>ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>94</b>

## ÚVOD

V súčasnosti predstavujú helmintózy závažný zdravotný problém v poľnohospodárskej produkcii najmä pri chove malých prežúvavcov obzvlášť ovci a kôz. Globálne užívanie antihelmintík v terapii a prevencii helmintóz sa stalo nevyhnutným pre zabezpečenie udržateľnej produkcie hospodárskych zvierat. Vysoké náklady na liečbu, narastajúce používanie a zneužívanie antihelmintík, vybudovanie si rezistencie na väčšinu komerčne dostupných antihelmintík sú najčastejším a pretrvávajúcim problémom po celom svete [1].

ABZ patrí medzi najviac používané benzimidazolové antihelmintiká so širokospektrálnym účinkom v terapii helmintóz. Do životného prostredia sa môže dostať priamo prostredníctvom živočíšneho moču a výkalov liečených zvierat pasúcich sa na poli alebo nepriamo prostredníctvom ich trusu aplikovaného na polia a pastviny ako hnojivo. Hromadenie sa antihelmintík v životnom prostredí a podzemných vodách má negatívny vplyv na necieľové organizmy žijúce v pôde najmä bezstavovce, či na rastliny a plodiny pestované na postihnutej pôde [2]. Na rozdiel od pesticídov, ktorých vplyv na životné prostredie bol v minulosti rozsiahle študovaný, správanie antihelmintík v životnom prostredí predovšetkým v pôde nebolo dostatočne sledované [3].

Z tohto dôvodu bolo cieľom tejto experimentálnej práce monitorovanie ABZ a jeho TP – ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> v poľnohospodárskej pôde s pomocou LC-MS. Extrakcia sledovaných látok sa uskutočňovala prostredníctvom modifikovanej metódy QuEChERS, ktorá má v súčasnosti široké zastúpenie v bioanalytických metódach.



# TEORETICKÁ ČASŤ

## 1. Antihelmintiká

V súčasnosti je k dispozícii pomerne veľké množstvo farmaceutických prípravkov, ktoré majú využitie v humánnej ale i veterinárnej medicíne. Zabezpečujú zdravie a kvalitu života ľudí i zvierat. Vo veterinárnej medicíne sú farmaceutiká používané na liečbu chorôb alebo prevenciu ich výskytu, podporu rastu a produktivity zvierat. Medzi najviac podávané veterinárne liečivá patria prevažne antibiotiká, antihelmintiká, insekticídy a hormóny [4].

Antihelmintiká tvoria pomerne rozsiahlu skupinu liečiv. Ich úlohou je zabránenie šíreniu infekcii spôsobenej požitím infekčného štádia parazita alebo úplné odstránenie parazita z hostiteľa, ktorým môže byť človek alebo zviera. Infekčné choroby spôsobené parazitujúcimi červami alebo ich infekčnými štádiami sa nazývajú helmintózy [5]. Približne 1,5 miliardy ľudí žijúcich hlavne v tropických a subtropických oblastiach (subsaharská Afrika, Amerika, Čína a východná Ázia) je infikovaná gastrointestinálnymi parazitmi, čo so sebou prináša zdravotné, ekonomické a sociálne problémy. Cieľom svetovej zdravotníckej organizácie je kontrola a eliminácia helmintóz prenášaných pôdou a to prostredníctvom pravidelného odčervenia rizikových skupín ľudí (deti, ženy v reprodukčnom veku, dospelí zamestnaní v rizikových povolaniach) žijúcich v týchto endemických oblastiach. Vo vyspelých štátoch nie sú helmintózy až tak častým ochorením a preto sa antihelmintiká používajú predovšetkým vo veterinárnej medicíne [6, 7].

Prvými antihelmintikami boli liečivá prírodného pôvodu. Extrakty z rastlín a z nich izolovaných látok sa vďaka ich antihelmintickej aktivite využívajú aj dodnes a to prevažne v ekonomicky zaostalých krajinách sveta. Jedným z hlavných dôvodov je ich cenová dostupnosť [8]. Tradičná čínska medicína využíva koreň a kôru z granátového jablka (*Punica granatum*), ktoré sú známe pre svoje antihelmintické vlastnosti. Medzi aktívne zložky izolované z kmeňovej kôry patrí alkaloid pelletierín. Jeho antihelmintický účinok je používaný v boji proti parazitickým nematódam, akým je napríklad vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) [8, 9]. Nevýhodou antihelmintík prírodného pôvodu je ich úzka terapeutická účinnosť s ktorou je spojená vysoká toxicita pri ich nevhodnom dávkovaní. Z toho dôvodu prírodné extrakty postupne nahradili

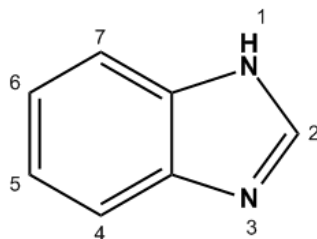
synteticky pripravované liečivá. Je dôležité, aby účinná látka antihelminatika interferovala so životnými funkciami parazita a pritom nepoškodzovala hostiteľský organizmus [10].

Antihelminτικά sa rozdeľujú do mnohých skupín z rôzneho hľadiska. Najčastejším rozdelením je rozčlenenie do troch tried podľa taxonomických skupín pôvodcov najrozšírenejších helmintóz na antinematodiká (pôsobí napríklad proti *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris humbricoids*, *Haemonchus contorus*, *Enterobius vermicularis*), anticestodiká (napríklad proti *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*) a antitrematodiká (napríklad proti *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma hematobolium*, *Fasciola hepatica*) [5, 8, 7].

Najrozsiahljšou skupinou helmintóz, ktoré postihujú ľudí ale i všetky druhy hospodársky a záujmovo chovaných zvierat sú ochorenia spôsobené nematódami. Proti týmto parazitom sú v súčasnosti indikované liečivá, ktoré sú radené do skupín makrocyclických laktónov (ivermektin, moxidectin), benzimidazolov (ABZ, fenbendazol, mebendazol), imidazotiazolov (levamisol), aminoacetonitrilové deriváty (monepantel) a liečiv ostatných chemických štruktúr (pyrantel) [5, 7].

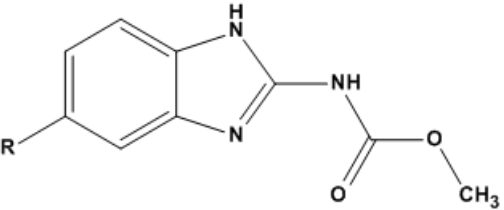

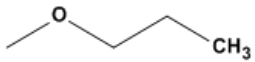
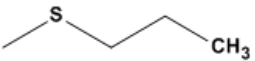
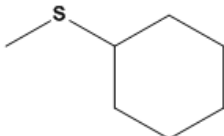
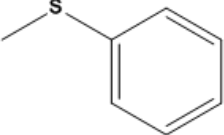
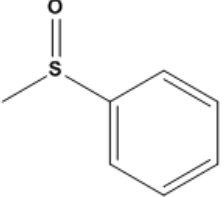
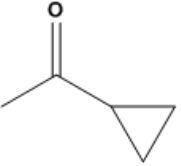
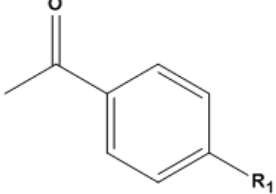
## 1.1. Benzimidazoly

Skupina benzimidazolových antihelminťík je najrozsiahljšou skupinou antinematodik s najširším spektrom účinku. Benzimidazoly sú odvodené z jednej základnej chemickej štruktúry, ktorou je heterocyklická dusíkatá zlúčenina zložená z imidazolového a benzénového jadra. Základná štruktúra benzimidazolov so sumárnym vzorcom  $C_7H_6N_2$  je znázornená na Obr. 1 [11, 12]. Z hlavnej chemickej štruktúry boli odvodené ďalšie substituované benzimidazoly karbamátového typu zobrazené v Tab. 1. Medzi najčastejšie používané anthelmintiká patria synteticky pripravované 5-substituované deriváty benzimidazolu, akými sú napríklad mebendazol, ABZ, oxfendazol, fenbendazol a pod [7].



**Obr. 1.** Chemická štruktúra Benzimidazolu upravená v Chemdraw podľa [12].

**Tab. 1.** Benzimidazoly karbamátového typu upravené podľa [13].

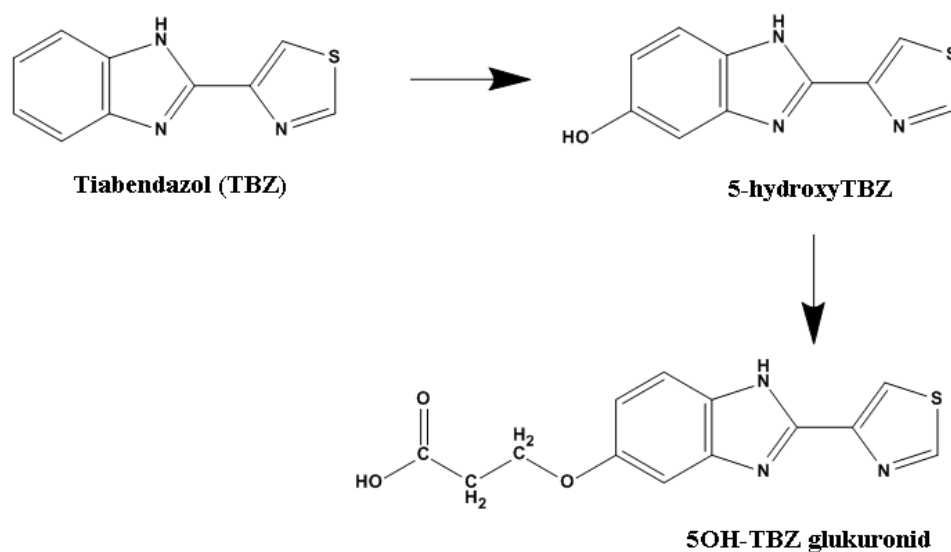
	<b>R</b>	<b>Bendazol</b>
		Parbendazol
		Oxibendazol
		Albendazol
		Dribendazol
		Fenbendazol
		Oxfendazol
		Cyklobendazol
		R <sub>1</sub> = <b>H</b> Mebendazol R <sub>1</sub> = <b>F</b> Flubendazol

### 1.1.1. Tiabendazol

Tiabendazol, chemicky 2-(4thiazolyl)benzimidazol je zlúčenina bez chuti a zápachu, takmer nerozpustná vo vode. Ako prvé širokospektrálne antihelmintikum sa používal na terapiu helmintóz spôsobených prevažne nematódami (*Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* a pod.). Pôsobením tiabendazolu sa zabraňuje produkcii vajíčok a lariev,

ktoré sa vylučujú vo výkaloch infikovaných organizmov. Mechanizmus účinku tiabendazolu spočíva v inhibícii mitochondriálneho enzýmu parazita - fumarátreduktázy, čím inhibuje cyklus kyseliny citrónovej, mitochondriálne dýchanie a následnú produkciu ATP, čo vedie k úhynu parazita [14].

Účinok tiabendazolu je pomerne krátkodobý. Plazmatická koncentrácia dosahuje maxima po 1 až 2 hodinách po perorálnom podaní. Liečivo sa relatívne rýchlo vstrebáva a v organizme sa metabolizuje na 5-hydroxytiabendazol, ktorý sa vylučuje vo forme konjugátu s kyselinou glukuronovou a je znázornený na Obr. 2 [5, 7, 14, 15].

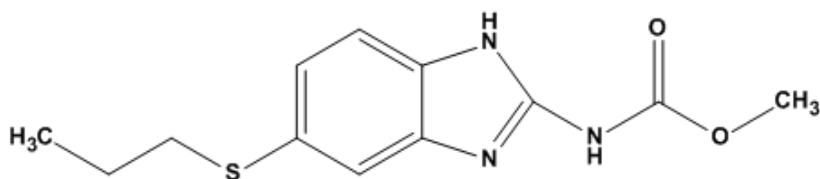


**Obr. 2.** Metabolizmus tiabendazolu upravený v Chemdraw podľa [15].

V súčasnosti sa tiabendazol používa ako antimykotikum vo veterinárnej medicíne pri ošetrovaní mykóz nepotravinových zvierat [5, 7]. Slúži aj ako bežne používaný pesticíd po zbere ovocia na potlačenie chorôb citrusových plodov spôsobených plesňami a hnilobou. Ako systémový fungicíd môže preniknúť cez kutikuly do rastlinných tkanív. Môže tak ľahko zostať v potravinách ako zvyšok rezídua pesticídov, čo predstavuje riziko pre spotrebiteľa. Môže spustiť apoptózu hepatocytov, čím vážne poškodí pečeň. Maximálne zvyškové limity tiabendazolu v citrusovom ovocí, ktoré navrhla Regulačná agentúra pre ochranu rastlín proti škodcom v Kanade a Európska komisia pre databázy pesticídov, sú 10 ppm a 5 ppm. [16]. V medicíne sa tiabendazol využíva aj ako chelatačné činidlo, vďaka svojej schopnosti viazať kovy napríklad pri otravách ortuťou [14].

### 1.1.2. Albendazol

Albendazol (ABZ) chemicky methylester kyseliny [5-(propylthio)-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbámovej, je najbežnejšie používané širokospektrálne benzimidazolové antihelmintikum, využívané ako v humánnej tak i veterinárnej medicíne. Jeho chemická štruktúra je znázornená na Obr. 3. [5, 17, 18].



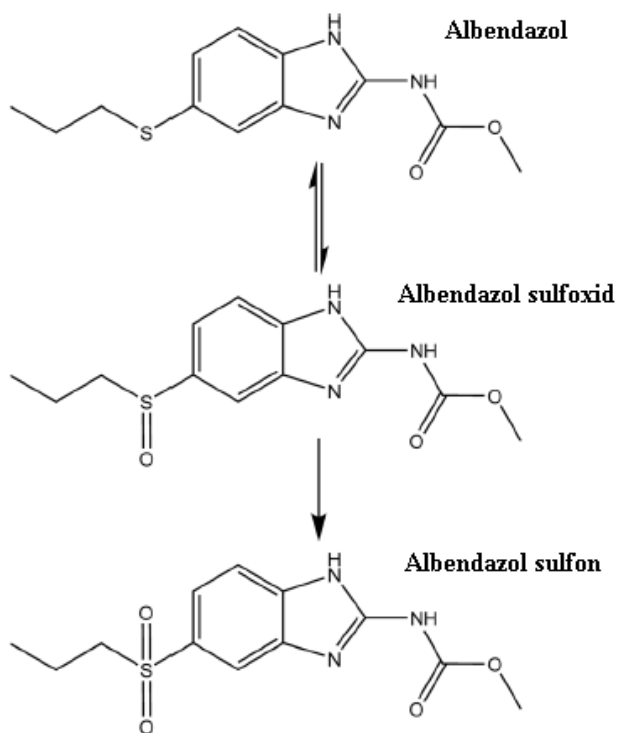
Obr. 3. Chemická štruktúra ABZ upravená v Chemdraw podľa [17].

Vo veterinárnej medicíne sa ABZ používa prevažne na terapiu gastrointestinálnych infekcií spôsobených nematódami (*Haemonchus contortus*, *Strongyloides papillosus*), infekcií spôsobených pľúcnyimi červami (*Dictyocaulus species*), pečenej motolicami (*Fasciola hepatica*) a pásomnicami (*Moniezia species*) u prežúvavcov. Jeho nízka toxicita a vysoká účinnosť sú hlavným dôvodom, prečo sa jeho podávanie infikovaným zvieratám celosvetovo zvyšuje [18].

Mechanizmus účinku ABZ je založený na inhibícii  $\beta$ -tubulínových subjednotiek v bunkách parazitov, ktoré sú dôležité pre tvorbu mikrotubulov. Ich narušená tvorba sa prejaví poškodením funkčnosti celej bunky helminta. Dochádza k narušeniu príjmu, transportu a metabolizmu glukózy, čoho výsledkom je strata pohyblivosti, vyčerpanie zásob glykogénu až úhyn parazita [5, 17]. Inhibícia tvorby mikrotubulov je opisovaná ako jeden z hlavných spôsobov pôsobenia benzimidazolových antihelmintík [19].

Afinita benzimidazolov je viacnásobne vyššia k parazitárnemu typu  $\beta$ -tubulínom ako afinita k  $\beta$ -tubulínom ošetrovaných zvierat [5]. Aj keď je tubulínový proteín vysoko konzervovaný, boli preukázané jemné zmeny v postupnosti a štruktúre parazitárneho tubulínu od tubulínu cicavcov. To môže byť spôsobené mnohými faktormi ako napríklad sekvenačnými variáciami na C-koncoch alfa a beta tubulínu [20]. Vďaka špecifickej afinite k parazitárnemu tubulínu je dávkovanie benzimidazolov účinné a bez vedľajších prejavov [5].

Antihelmintická aktivita je závislá od dĺžky pretrvávania terapeutických koncentrácií v telesných tekutinách a v tkanivách organizmu. Aby sa dosiahla požadovaná účinnosť liečiva, je potrebné zvieratám s jednoduchým žalúdkom (pes, mačka, prasa) liečivo podávať opakovane. Zvieratám so zloženými žalúdkami a ďalším bylinožravým prežúvavcom (ovca, kôň) je potrebné benzimidazoly podávať jednorazovo, aby sa zachovala antihelmintická účinnosť liečiva [5].



**Obr. 4.** Biotransformácia ABZ upravené [21].

Biotransformácia ABZ bola študovaná na mnohých organizmoch (potkan, myš, králik, ovca, hydina, dobytok, prasa, pes a človek) [22]. Po perorálnom podaní sa ABZ absorbuje v gastrointestinálnom trakte organizmu a metabolizuje sa na albendazol sulfoxid (ABZSO) známy aj ako ricobendazol, ktorý je antihelminticky aktívnejší ako samotný ABZ. Následne sa ABZSO opäť oxiduje a vzniká polárnejší metabolit albendazol sulfón (ABZSO<sub>2</sub>), ktorý oproti ABZSO nedisponuje tak výraznou antihelmintickou aktivitou [22, 21, 23]. Chemická štruktúra ABZ a vzniknuté metabolity (ABZSO, ABZSO<sub>2</sub>) sú znázornené na Obr.4. [21].

Biotransformáciou ABZ v pečňových mikrozómoch však môžu vzniknúť dve rôzne formy enantiomérov ABZSO ktorými sú (-) – ABZ SO a (+) – ABZSO. Na formácií

týchto enantiomérov sa podieľajú rôzne biotransformačné enzýmy. Izoforma cytochrómu CYP450 - CYP3A podnecuje tvorbu prevažne (-) – ABZSO, zatiaľ čo flavínové monooxygenázy produkujú (+) - ABZSO. Biotransformáciou ABZ u oviec domácich (*Ovis aries*) a muflónov divých (*Ovis musimon*) vznikajú prevažne (+) – ABZSO u ktorých sa predpokladá vyššia antiparazitická účinnosť. Tieto dva druhy zvierat sú fylogeneticky rovnaké. U pečňových mikrozómov muflónov infikovaných helmintózou bola zistená zvýšená aktivita flavínmonooxygenáz, ktoré produkujú spomínanú formu enantioméru (+) – ABZSO [24]. Taktiež aj špecifický pomer enantiomérov ABZSO (+/-) v plazmatických koncentráciách u oviec a kôz sa od podania ABZ časom mení v prospech (+) – ABZSO [25]. Avšak u infikovaných muflónov môže mať zvýšenie tvorby ABZSO<sub>2</sub> sprostredkovaného CYP1A negatívne dôsledky akým je mierne zvýšenie deaktivácie ABZ. CYP1A je známym aktivátorom mnohých organických zlúčenín, čo môže negatívne ovplyvniť zvýšenie znečisťujúcich látok nachádzajúcich sa v životnom prostredí [24]. ABZ a TP sa vylučujú stolicou alebo močom liečených ľudí alebo zvierat [21].

## 1.2. Rezistencia helmintov

V súčasnej dobe predstavujú helmintózy závažný zdravotný problém v poľnohospodárskej produkcii najmä pri chove malých prežúvavcov - ovci a kôz. Zároveň sú tieto infekcie jednou z príčin významnej ekonomickej straty po celom svete a to prevažne z dôvodu vysokých nákladov na ich terapiu. Obmedzenie infekcií spôsobených gastrointestinálnymi červami je založené na funkčnom systéme chovu týchto zvierat a predovšetkým na optimálnom podávaní anthelmintík [26, 27]. Účinnosť dostupných antihelmintík je obmedzená a kontrola narastajúcich helmintóz je ohrozená zvyšovaním rezistencie na liečivá v populáciách helmintov [27].

Vybudovanie si rezistencie na väčšinu komerčne dostupných antihelmintických liečiv sa tak stáva veľkým globálnym problémom. Vznikajúca závislosť na anthelmintikách a súčasne ich širokospektrálne použitie v terapii, vyvoláva významnú toleranciu na podávanú dávku liečiva, ktorá je pre bežnú populáciu parazitov smrteľná [28]. Rezistencia nastáva, keď náchylná populácia parazitov vykazuje významný pokles v reakcii na liečbu. Úplná rezistencia vzniká vtedy, keď maximálna dávka liečiva, ktorú môže hostiteľ tolerovať, nemá žiadny účinok [29]. Časté, nadmerné alebo aj nedostatočné

dávkovanie antihelmintikami tak vedie k podstatným a rozšíreným problémom s antihelmintickou rezistenciou [28, 29]. Masívne používanie antihelmintík má na svedomí rozsiahle rozšírenie rezistencie na dostupné antihelmintiká, čo výrazne komplikuje terapiu a taktiež znečisťuje životné prostredie [27]. U jednotlivých skupín antihelmintík sú mechanizmy vzniku rezistencie odlišné. Jedna skupina anthelmintík si môže zachovať svoju aktivitu proti helmintovi, zatiaľ čo proti druhej skupine antihelmintík sa prejaví odolnosť parazita a táto skupina antihelmintík sa stáva neúčinná. Na zabránenie výskytu hromadnej rezistencie sa v praxi využívajú kombinácie antihelmintík avšak aj táto stratégia sa nejaví ako príliš účinná. V súčasnosti vykazuje väčšina gastrointestinálnych parazitov určitú úroveň rezistencie aj voči kombinovanej liečbe v zložení benzimidazolov, imidazotiazolov a makrocyclických laktónov [30, 29, 27]. Podstatne rýchlejší vývin rezistencie bol popísaný v regiónoch, kde sa zvieratá odčervovali pravidelne, čo znamená, že ani pravidelná terapia živočíchov nemusí problém s narastajúcou rezistenciou vyriešiť [29]. Jednou z možností pre spomalenie jej šírenia je zameranie sa na samotný mechanizmus jej vzniku u parazitov a ďalej na identifikáciu rezistentných kmeňov. Mechanizmus rezistencie u parazitov na benzimidazoly sa odvíja od ich spôsobu účinku. Mutácie v  $\beta$ -tubulínovom géne môžu spôsobiť zmeny v štruktúre  $\beta$ -tubulínu a v dôsledku toho sa už benzimidazol nemôže viazať na cieľové miesto [28, 31].

*Haemonchus contortus* je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich gastrointestinálnych nematód rezistentných na anthelmintiká u malých prežúvavcov a súčasne aj najviac študovaný parazitický hlístovec. V súčasnosti existuje množstvo testov, ktoré dokážu identifikovať gastrointestinálne nematódy a včas zabrániť vzniku narastajúcich rezistentných kmeňov [32]. Ich využitie je najmä pri plánovaní optimálneho použitia účinných antihelmintík na ktoré doposiaľ nebola pozorovaná rezistencia. Z molekulárno-genetických metód bol navrhnutý test kvapkovej digitálnej PCR (polymerázovej reťazovej reakcie) na rýchlu a presnú identifikáciu rezistentných a citlivých kmeňov *Haemonchus contortus* na benzimidazolové anthelmintiká. Tento test určí daný kmeň parazita na základe prítomnosti alebo neprítomnosti jednej z najbežnejších bodových mutácií F200Y (TAC) v géne  $\beta$  tubulínového izotypu 1 parazitov [32, 26, 31]. Nie každé laboratórium disponuje PCR vybavením, z toho dôvodu sa využívajú ekonomicky dostupnejšie a zároveň dostatočne citlivé testy na in vitro detekciu antihelmintickej rezistencie. Medzi nimi je napríklad test



na vyliahnutie vajčiek parazitov, ktorého použitie je špecifické pre konkrétnu triedu antihelmintík [33].

Rozšírená rezistencia na syntetické anthelmintiká stimulovala výskum alternatívnych stratégií v boji proti parazitom vrátane použitia liečivých rastlín s antihelmintickým účinkom. Po celé storočia sa liečivé rastliny používali na liečbu rôznych zdravotných problémov [27]. Doposiaľ nebol publikovaný dôkaz o tom, že by si parazit vyvinul rezistenciu na niektorý typ bioaktívnej rastliny s antiparazitickým účinkom. Získané prírodné antiparazitiká pochádzajú prevažne z rastlín ale aj baktérií, húb, hmyzu či vodných organizmov [34]. Môžu mať rôzny mechanizmus účinku, pretože obsahujú viac bioaktívnych látok na rozdiel od syntetických antihelmintík [34, 27]. Sú zdrojom primárnych (uhl'ohydráty, lipidy, bielkoviny) aj sekundárnych metabolitov (terpény, fenolové zlúčeniny, izoflavonoidy, alkaloidy, neproteínové aminokyseliny), ktoré môžu predstavovať hlavné príčiny antihelmintického účinku. Okrem jednotlivých zlúčenín pochádzajúcich z rastlín vykazovali sľubné antihelmintické účinky aj mnohé rastlinné extrakty a prírodné produkty [27]. Napríklad užívanie artemisinínu (získaného z rastliny *Artemisia annula*), môže pomôcť infikovanému organizmom neutralizovať voľné radikály tvorené v ich krvi a posilniť ich imunitný systém, čím podporí elimináciu gastrointestinálnych parazitov [35]. Zlepšenie imunitnej odpovede organizmu voči parazitom súvisí so zvýšením počtu špecifických efektorových buniek [34, 27].

Tabak (získaný z rastliny *Nicotiana tabacum*), celosvetovo obľúbený pre svoje narkotické vlastnosti obsahuje viac ako 90% nikotínu izolovaného z tabakového listu. Výsledky *in vitro* štúdie jasne naznačujú, že extrakty z tabaku majú viditeľnú antihelmintickú aktivitu [36].

Okrem antihelmintických účinkov majú niektoré sekundárne metabolity pre hostiteľa aj ďalšie zdravotné výhody, ako napríklad antioxidantné a protizápalové účinky niektorých fenolových zlúčenín, ako je kurkumín z *Curcuma longa* alebo hepatoprotektívne účinky rôznych extraktov z plodov a koreňov *Piper chaba* [27].

V súčasnej dobe sú mnohé prírodné látky s antihelmintickým účinkom využívané v terapii malých prežúvavcov a to predovšetkým v menej rozvinutých krajinách [37]. Je pravdepodobné, že antihelmintické látky nachádzajúce sa v rastlinách majú oproti farmaceuticky dostupným antihelmintikám menšiu efektivitu a s ich užívaním je vyvíjaný nižší tlak na vznik rezistencie u parazitov [34]. Majú tak potenciál znížiť užívanie syntetických liekov alebo zvýšiť ich účinnosť ak sa používajú v kombinovanej terapii [35]. Ďalšou z výhod ich používania je menšia kumulácia v tkanivách

a obmedzenie výskytu rezíduí v životnom prostredí, čo môže výrazne prispieť k zníženiu environmentálneho znečistenia [34, 27].

### 1.3. Vplyv na životné prostredie

Antihelmintiká boli vyvinuté pre humánne a veterinárne využitie. Ľudia alebo zvieratá, ktoré ich užívajú v terapii sú týmto farmaceutikám vystavení iba po stanovenej dobe liečby. Lenže necieľové organizmy nachádzajúce sa v životnom prostredí sú účinkom antihelmintík vystavené chronicky [21].

Antihelmintiká používané na humánnu terapiu sú vo väčšine prípadoch vylučované kanalizáciou a čiastočne sa môžu odbúravať v čistiarňach odpadových vôd. Avšak veterinárne lieky a ich vzniknuté metabolity sa zvyčajne do životného prostredia dostanú živočíšnym močom a výkalmi, ktoré zostanú na pastvinách alebo sa používajú na hnojenie poľnohospodárskych pôd. Liečivé látky nachádzajúce sa vo vylučovanom moči a truse zvierat si môžu udržať farmakologické vlastnosti a účinky, ktorými nepriaznivo ovplyvňujú necieľové organizmy alebo ohroziť podzemné vody v závislosti od ich vstrebania do pôdneho systému [21, 38, 5, 39].

Do životného prostredia sa antihelmintiká môžu dostať v nezmenenej podobe ako pôvodná zlúčenina alebo ako jej produkty transformácie [23]. Adsorbujú sa v pôde, dostanú sa do vodného prostredia a môžu byť absorbované rastlinami, ktoré sa následne môžu stať živočíšnou či ľudskou potravou. Konzumáciou týchto rastlín antihelmintiká opäť pôsobia v organizme a môžu ho ovplyvňovať [38, 5, 40]. Subletálne dávky antihelmintík nachádzajúce sa v absorbovaných rastlinách môžu podporiť vývoj rezistentných kmeňov helmintov, ktoré s týmito rastlinami prichádzajú do kontaktu [40]. Z toho dôvodu je dôležité aby osud farmaceutík podávaných organizmom, vrátane vylúčenia ich negatívneho dopadu na environmentálne prostredie, bol súčasťou požiadaviek, ktoré povoľujú tieto liečivá k používaniu v terapii. Preto platí, že každé veterinárne liečivo musí mať pred uvedením na trh vyhodnotené ekotoxikologické riziká jeho budúceho používania [5].

Konečná koncentrácia farmaceutika, nachádzajúca sa v životnom prostredí je určená mnohými faktormi a procesmi, vrátane fyzikálno-chemických vlastností, rozdelenia do sedimentu, degradácie, environmentálnych charakteristík a klimatických podmienok exponovaného biotopu [23]. Po uvoľnení farmaceutík do životného prostredia

sa transportujú a distribuujú prevažne do vody, sedimentov, pôdy a bioty. Farmaceutické látky sú tak podrobené biodegradácii, chemickej a fotochemickej degradácii, čo prispieva k ich následnej eliminácii zo životného prostredia. Degradácia, ktorú podstupujú (napr. oxidácia, redukcia, hydrolýza), vytvára v životnom prostredí zlúčeniny, často identické s metabolitmi vyskytujúcimi sa v organizme [41, 23]. V prípade, že farmaceutiká nepodľahnú eliminácii, môžu reagovať s inými zlúčeninami, ktoré sa v životnom prostredí nachádzajú [23]. Organizmy žijúce v životnom prostredí sú vystavované týmto zlúčeninám, ktoré ovplyvňujú ich prirodzený vývin a majú tak negatívny dopad na ich život. Napríklad hmyz čelí expozícii insekticídov, zmesiam agrochemikálií a azolovým fungicídov medzi ktoré patrí aj spomínaný tiabendazol. Ten sa v širokej miere sa strieka na listy ako antifungálna látka. V nedávnej vedeckej štúdií sa testoval efekt insekticídov - neonikotínoidov, ktorý bol podávaný spolu s tiabendazolom crabronidovým osám (*Pemphredon fabricii*). Následne sa sledoval ich synergický účinok na metamorfózu včiel a ôs. Sledovaný synergický efekt mal na metamorfózu výrazné multiplikačné účinky, čo zapríčinilo abnormálny vývoj krídel skúmaného hmyzu [42]. Negatívny vplyv týchto chemických látok má nepriaznivý vplyv na život živočíchov a preto by sa ich použitie v životnom prostredí malo zvážiť.

Neustály vstup liečiv a ich TP do životného prostredia môže viesť k ich zvýšenej chronickej koncentrácií a podporovať nepozorované nepriaznivé účinky na vodné a suchozemské organizmy. Účinky sa môžu pomaly hromadiť až kým sa z nepozorovaných stanú nezvratné. Správanie farmaceutík v životnom prostredí dlho nebolo podrobne študované. V súčasnej dobe sa veterinárne liečivá stali cieľom štúdií hlavne kvôli ich systematickému používaniu a narastajúcej rezistencii [39]. V najbližších rokoch bude dostupnosť novej antihelmintickej liečby zásadná [27].

## 2. Úprava vzorky pred analýzou

Monitorovanie farmaceutík v životnom prostredí si zvyčajne vyžaduje použitie časovo náročných metodík najmä ak sa jedná o zložité vzorky. Súčasťou celého analytického postupu je zabezpečenie kvality každého kroku od odberu vzoriek a skladovania po jeho spracovanie až následnú analýzu [39]. Úprava vzorky pred analýzou je častokrát omnoho náročnejšia než samotná analýza. V mnohých analytických schémach môže čas strávený prípravou vzorky presiahnuť 60 % celkového času, čím stúpa riziko vzniku chýb najmä ak je metodika zameraná na stopovú analýzu [43].

Väčšia časť vzoriek nie je priamo kompatibilná s chromatografickými alebo inými technikami, ktorými sa v záverečnom kroku analyzuje. Je to z dôvodu zložitosti vzorky alebo kvôli vysokému obsahu proteínov a iných balastných látok, ktoré by mohli s hľadanými látkami interferovať a preto môže úprava vzorky vo vysokej miere ovplyvňovať výslednú presnosť a správnosť analýzy [44].

Samotná príprava vzorky pred analýzou je zameraná na izoláciu analytu, odstránenie balastných látok a zakoncentrovanie požadovaných analytov z komplexných matric [43]. V analytickom laboratóriu sú pri bioanalytických metódach uprednostňované klasické konvenčné techniky prípravy vzoriek, ktoré sa využívajú najmä pri metódach rýchlej kvapalinovej chromatografie. Tieto techniky sú dobre optimalizované, reprodukovateľné, dajú sa ľahko automatizovať a sú zároveň najrozšírenejšími metodikami v rutinej praxi [43, 44]. Z praktického hľadiska sú však relatívne časovo náročné s viackrokovým procesom úpravy a využívajú značnú spotrebu rozpúšťadiel. Patrí sem priama extrakcia a úprava extraktu ako napr. Soxhletova extrakcia a superkritická fluidná extrakcia („supercritical fluid extraction“, SFE), filtrácia, proteínová precipitácia („protein precipitation“, PP), extrakcia z kvapaliny do kvapaliny („liquid-liquid extraction“, LLE) a extrakcia na tuhú fázu („solid phase extraction“, SPE) [43, 44].

Pre zjednodušenie úpravy zložitých vzoriek sa neustále pracuje na vývoji moderných techník, ktoré sa snažia predovšetkým skrátiť časový úsek prípravy vzoriek, znížiť spotrebu rozpúšťadiel a množstvo analyzovanej vzorky. Usilujú sa o zvýšenie selektivity extrakcie, zníženie počtu krokov extrakčných metód a predovšetkým možnosť automatizácie. Moderné prístupy sú často založené na princípoch klasických metód LLE. Príkladom môže byť mikroextrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla (SDME) alebo disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny (DLLME), ktoré sa využívajú

predovšetkým vo vedeckých analytických laboratóriách. Iné moderné prístupy vychádzajú z SPE, napr. mikroextrakcia na tuhú fázu (SPME) a mikroextrakcia s využitím špičiek (DPX). Výhodné sú automatické on-line techniky (materiály s obmedzeným prístupom, RAM) alebo aj použitie extrakcií s vysokou selektivitou (molekulárne vtačené polyméry, MIP) [44].

## 2.1. Priama extrakcia do rozpúšťadla

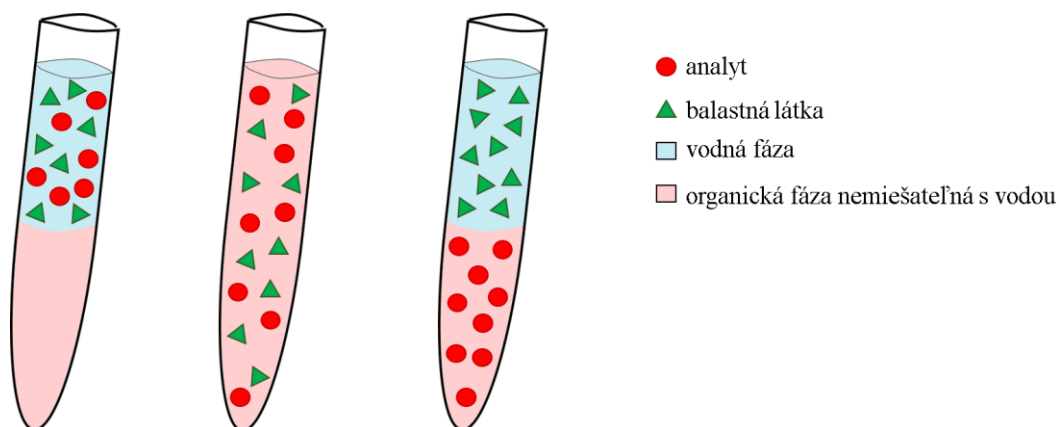
Pri priamej extrakcii dochádza k získaniu analytu väčšinou z tuhej matrice. Najčastejším spôsobom je extrakcia v uzavretej nádobe na horizontálnej laboratórnej trepačke, extrakcia na ultrazvukovej lázni (narušením častíc matrice sa urýchli rozpustenie analytu) alebo s použitím kontinuálneho extraktora (Soxhletov extraktor). Extrakcia je ovplyvňovaná limitujúcimi faktormi, ktoré pôsobia na výťažnosť a rýchlosť extrakcie (vplyv rozpustnosti a prenosu hmoty). Výťažnosť extrakcie, rýchlosť difúzie analytov a rozpúšťacej kapacity rozpúšťadiel sa dá ovplyvniť zvýšením teploty a tlaku [44]. S narastajúcou teplotou dochádza k narušeniu pevných interakcií analytu s matricou, ktoré sú založené prevažne na van der Waalových silách, vodíkových väzbách alebo od dipólovej prítlačivosti, ktorá sa nachádza medzi analytom a aktívnymi centrami tuhej matrice. Pri vyššej teplote extrakčného rozpúšťadla dochádza k zníženiu viskozity kvapaliny, zlepšeniu difúzneho koeficientu rozpúšťadla, čo priaznivo vplyva na účinnosť extrakcie. Zníži sa povrchové napätie, čo umožní lepšiu penetráciu rozpúšťadla do častíc tuhej matrice. Lepšia účinnosť sa dá dosiahnuť úpravou vzorky ešte pred extrakciou a to napr. drvením či mletím vzorky s následnou homogenizáciou, čím sa zvýši povrch pre rozpúšťadlo a umožní jednoduchší prenos hmoty [44, 45].

Dôležitým faktorom je zvolenie si vhodného organického rozpúšťadla, ktoré sa vyberá v závislosti od fyzikálnych a chemických vlastností analytu (robustnosť, disociačná konštanta, rozdeľovací koeficient), podľa typu matrice v ktorej sa daná látka nachádza a ďalšieho postupu prečistenia extraktu [44, 46]. Na extrakciu nepolárnych analytov napríklad lipidov sa používajú nepolárne organické rozpúšťadlá (hexán, cyklohexán, chloroform, dietyléter). Pre polárne látky sa používajú zmesi polárneho organického rozpúšťadla s vodou (methanol (MeOH), ethanol, acetonitril, acetón, tetrahydrofurán). Avšak vo vode rozpustné látky nachádzajúce sa v matrici ako napríklad škrob môžu rušiť analýzu. Preto je dôležité získané extrakty ešte upraviť.

Medzi ďalšie úpravy získaných extraktov patrí centrifugácia, dialýza či ultrafiltrácia alebo filtrácia. K oddeleniu extraktu nachádzajúceho sa v kvapalnej fáze od nerozpustnej pevnej fázy sa najčastejšie používa filtrácia s použitím rôznych poréznych filtrov. Výber použitých filtrov sa riadi podľa chemických vlastností filtrovanej zmesi. Je potrebné aby sledované látky vo filtrovanej zmesi neinteragovali medzi rozpúšťadlom a prechádzajúcim filtrom [44]. Pri použití nevhodného rozpúšťadla, by sa filtre mohli rozpustiť a znečistiť filtrát. Najpoužívanejšie filtre, ktoré sa využívajú najmä pre analýzu kvapalinovou chromatografiou majú veľkosť pórov 0,20 a 0,45  $\mu\text{m}$ . Sú vyrobené z rôznych materiálov ako napríklad regenerovaná celulóza, acetát celulózy, PTFE, nylon a iné. Na filtráciu vzoriek sa používajú filtre, ktoré sú umiestnené v puzdrách a dajú sa jednoducho pripevniť k jednorázovej injekčnej striekačke [47].

## 2.2.Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE)

Jednou z prvých a často používaných techník pre úpravu vzoriek je LLE. Princípom extrakcie je prevedenie analytu z vodnej fázy do organického rozpúšťadla, ktoré je s vodou nemiesiteľné alebo iba čiastočne nemiesiteľné, na základe rozdeľovacieho koeficientu oktanol/voda, ktorý určuje pomer analytov v oboch fázach [44]. Schematické znázornenie princípu LLE s použitím organického rozpúšťadla chloroformu je znázornené na Obr. 5. V polárnej fáze, ktorou môže byť voda alebo vhodné polárne rozpúšťadlo, sa nachádzajú hlavne hydrofilnejšie zlúčeniny, zatiaľ čo zlúčeniny vo vode nerozpustné sa nachádzajú v organickom rozpúšťadle nemiesiteľnom s vodou (rozdeľovací koeficient), ktoré sa následne získajú odparením organického rozpúšťadla v koncentrátore [44, 46].

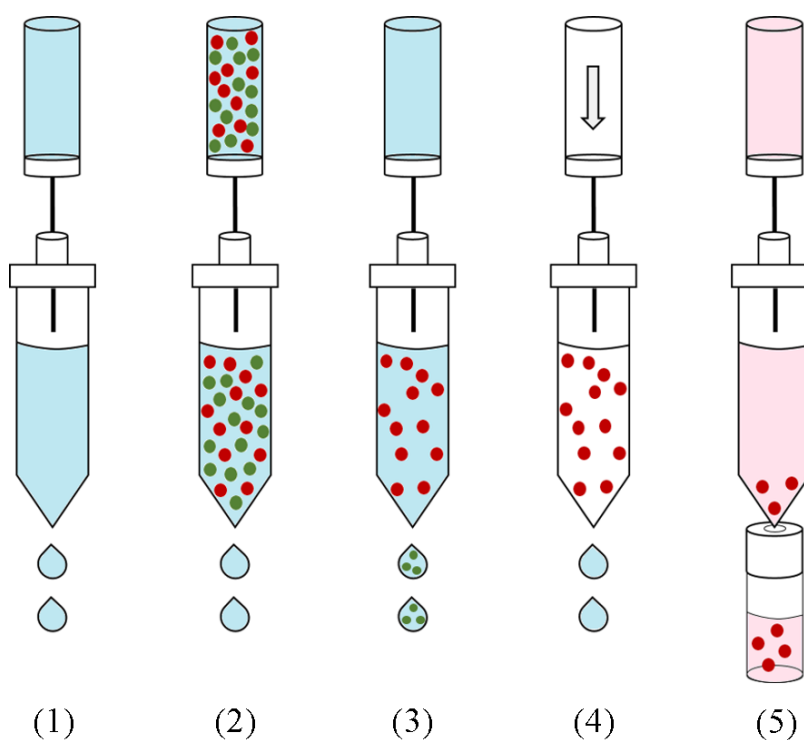


Obr. 5. Princíp LLE s použitím organického rozpúšťadla – chloroform, upravený podľa [44].

Medzi hlavné výhody klasickej LLE patrí jednoduchosť prevedenia a vybavenia ale predovšetkým odstránenie matricových efektov pri následnej analýze extraktu pomocou kvapalinovej chromatografie spojenej s hmotnostným spektrometrom. Na druhej strane medzi hlavné nevýhody použitia metódy LLE patrí časová náročnosť, tvorba emulzií, nedostatočné oddelenie fáz, vysoká spotreba organického rozpúšťadla a z dôvodu jeho nekompatibility s analytickou fázou, je potrebné extrakt odpariť dosucha a rekonštituovať v mobilnej fáze pre analýzu kvapalinovou chromatografiou [44, 46].

### 2.3.Extrakcia na tuhú fázu (SPE)

Metóda SPE patrí medzi popredné techniky úpravy vzorky pred analýzou, ktorá prináša množstvo výhod akými sú vysoká výťažnosť extrakcie, zakoncentrovanie sledovaných látok, pomerne nízka spotreba rozpúšťadiel a v súčasnosti aj automatizácia tejto metódy [44, 46, 48]. Princíp SPE spočíva na interakciách či rozdeľovaní sa látok medzi pevnú fázu (extrakčná kolónka) a fázu kvapalnú (vzorka obsahujúca sledovanú látku). Na SPE kolónkach môžu prebiehať polárne, nepolárne, iónové a afinitné interakcie, ktoré analyt zadržiavajú [44].



**Obr. 6.** Postup SPE: kondicionovanie kolónky (1), nanosenie vzorky na kolónku (2), premytie a vymytie balastných látok (3), vysušenie kolónky (4) a elúcia analytov do vialky. Obrázok upravený podľa [44].

Postup klasickej metódy SPE prebieha v niekoľkých krokoch znázornených na Obr. 6. Prvým krokom je kondicionácia extrakčnej kolónky, ktorá sa premyje vhodným organickým rozpúšťadlom (MeOH, ACN) miešateľným s vodou, aby sa aktivovali funkčné skupiny sorbentu. Roztok vzorky sa naniesie na kolónku, kde dochádza k zadržiavaniu sledovaných látok na stacionárnej fáze, zatiaľ čo zvyšok matrice prechádza kolónkou. Nasleduje vymytie balastných látok vhodným premývacím roztokom najčastejšie rozpúšťadlom, ktoré odstráni nečistoty z extrakčnej kolónky tak, aby sa v ňom nerozpustili sledované analyty. Na odstránenie vo vode rozpustných látok a interferujúcich solí je používaná čistá voda s upraveným pH. Pred elúciou analytu z extrakčnej kolónky je dôležité aby sa kolónka vysušila prúdom vzduchu alebo dusíku pomocou vákua alebo tlaku, aby sa odstránila prebytočná voda. Ďalším krokom je použitie vhodného extrakčného rozpúšťadla kompatibilného s následnou chromatografickou analýzou, kedy sa sledovaný analyt vymyje z kolónky [44, 48, 49].

Výber vhodnej stacionárnej fáze ako náplň do extrakčných kolóniek klasickej SPE je jedným z dôležitých krokov pre úspešnosť extrakcie. V súčasnosti sa využívajú sorbenty od nepolárnych fáz C18 a C8 po často používané polárne fázy na báze oxidu kremičitého, alebo oxidu hlinitého. Retencia analytov podľa ich rôznych fyzikálno-chemických vlastností sa vykonáva na iónovo-výmenných stacionárnych fázach, či rôznych polymérnych materiáloch (PS-DVB = polystyrén-divinylbenzén alebo PMMA = polymethylmethakrylát), ktorých výhodou je lepšia stabilita v rozmedzí pH oproti stacionárnym fázam na báze silikagélu. Výber vhodnej stacionárnej fáze je závislý od chemických vlastností sledovaného analytu (polarita, disociačná konštanta) a vlastností zvoleného organického rozpúšťadla. Pri použití polárneho organického rozpúšťadla v SPE extrakcii sa použije nepolárna stacionárna fáza a naopak [44].

Medzi nevýhody SPE patrí relatívne vysoká spotreba organických rozpúšťadiel a vzorky, či zvýšené ekonomické náklady na SPE kolónky, ktoré sa zväčša vyrábajú na jedno použitie. Z ohľadu reprodukovateľnosti klasickej SPE metódy sa môžu použité kolónky líšiť z rôznych šarží od výrobcu. Medzi ďalšie negatíva patrí viac-krokový postup prečistenia vzorky, nutnosť zakoncentrovania extraktu v koncentrátore a jeho znovu rozpustenia v mobilnej fázi [44].



### 2.3.1. Disperzná extrakcia na tuhú fázu (QuEChERS)

Táto metóda bola vyvinutá nemeckým chemikom Michelangelom Anastassiadom spolu s americkým vedcom Stevenom J. Lehorayom v rokoch 2001 -2002 za účelom zjednodušenia komplikovaného a časovo náročného analytického postupu pri úprave vzorky. Umožňuje tak rýchlu analýzu aj pri väčšom počte vzoriek s použitím menšieho množstva organického rozpúšťadla akým je prevažne ACN [50, 51, 52]. Technika extrakcie je navrhnutá tak, aby sa dosiahol maximálny výťažok analytov zo základnej matrice [53]. Mnoho analytických laboratórií ju využíva hlavne kvôli jej výhodám ktoré vyplývajú aj z jej názvu: rýchla, ľahká, lacná, efektívna, odolná a bezpečná („**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe“, QuEChERS) [54, 52].

Metodika sa vyvinula pôvodne pre analýzu veterinárnych liečiv a to prevažne anthelmintík a tyreostatík v zvieracích tkanivách [51]. V súčasnosti sa využíva predovšetkým na extrakciu polárnych a zásaditých zlúčenín, rezíduí pesticídov, potravín ale aj na analýzu ďalších skupín zlúčenín vrátane farmaceutík, mykotoxínov a polycyklických aromatických uhlíkovodíkov v širokej škále zložitých matric akými sú napríklad mäso, ryby, plná krv, víno či pôda [54, 51, 55].

Vývoj metódy QuEChERS bol prevratný a preto sa postupne optimalizoval tak, aby vždy zahŕňal používané tlmivé roztoky počas extrakcie a zároveň tak, aby sa zlepšila stabilita analytu a kvalita extraktu. V súčasnosti existujú dve bežne používané metódy medzi ktoré patrí metóda s označením: EN 15662 : 2008, ktorá používa na extrakciu citrátový tlmivý roztok a druhá metóda: AOAC 2007.01, ktorá v extrakčnom kroku používa tlmivý roztok s kyselinou octovou [56, 53]. Používané množstvo vzorky, organického rozpúšťadla a extrakčných zmesí v najviac používaných QuEChERS metódach je znázornené v Tab. 2 [56].

**Tab. 2.** QuEChERS metódy s používaným množstvom vzorky, organických rozpúšťadiel a extrakčných zmesí upravené podľa [56].

Metóda	Množstvo vzorky	Organické rozpúšťadlo	Extrakčná zmes
AOAC 2007.01	15 g	15 ml 1 % kyseliny octovej v ACN	6 g bezvodý síran horečnatý, 1,5 g octan sodný
EN 15662:2008	10 g	10 ml ACN	4 g bezvodý síran horečnatý, 1 g chlorid sodný, 1 g citrát sodný dihydrát, 0,5 g citrát sodný seskvihydrát

Metóda EN 15662:2008 je podobná pôvodnému postupu metódy QuEChERS z roku 2003, len je doplnená o citrátové soli, ktoré sa pridajú do skúmavky počas extrakcie. Na prečistenie pomocou disperznej SPE sa zvyčajne používa 1 ml ACN extraktu so 150 mg bezvodého síranu horečnatého a 25 mg primárneho sekundárneho amínu (PSA) na gram vzorky [56].

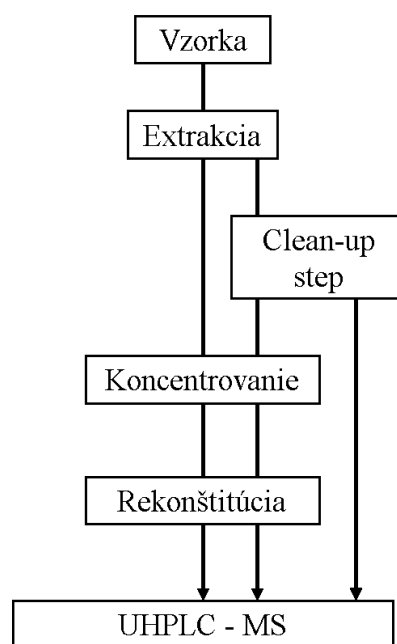
V súčasnosti však existuje množstvo modifikácií QuEChERS metódy v závislosti od analyzovaných vzoriek a použitých matric. Mení sa množstvo a typ použitej vzorky, zvoleného rozpúšťadla a pridaných extrakčných solí. V prípade suchých matric je vhodné do extrakcie pridať určité množstvo vody. Ďalej sa upravuje pH, technika trepania, či miešania a ďalej aj samotná doba extrakcie [55].

Postup QuEChERS extrakcie spočíva v nasledujúcich krokoch zobrazených aj na Obr.7 [50]:

- Extrakcia sledovaných látok do organického rozpúšťadla – najčastejšie ACN alebo ethyl acetát, či acetón.
- Oddelenie jednotlivých fáz pridaním bezvodého síranu horečnatého a inými soľami ako napríklad chloridu sodného, či octanu sodného. Bezvodý síran horečnatý odstraňuje zvyškovú vodu a pri jeho hydratácii dochádza k exotermickej reakcii (teplota vzorky sa môže zvýšiť až na 40 °C), čo môže zvýšiť účinnosť extrakcie [52].
- Trepanie na trepačke a centrifugácia.

- Clean-up step: prečistenie supernatantu sa vykonáva pomocou disperznej SPE a to pridaním PSA alebo pomocou sorbentu C18, grafitizovanej sadze („graphitized carbon black“, GCB), či Z-Sep s cieľom vylúčenia možných interferujúcich zlúčenín ako sú napríklad organické kyseliny, lipidy, určité polárne pigmenty, karotenoidy, bielkoviny, chlorofyl alebo cukry [53].
- Centrifugácia.
- Analýza prečisteného extraktu pomocou kvapalinovej, či plynovej chromatografie zvyčajne v spojení s hmotnostným spektrometrom alebo UV detektorom [39].

V prípade, že sa analýza neuskutoční hneď po extrakcii, vzorky sa odparia do sucha v koncentrátore a pred plánovanou analýzou sa rekonštituujú v mobilnej fáze kompatibilnej s použitým analytickým systémom [39].



**Obr. 7.** Postup analýzy vzorky metódou QuEChERS upravené podľa [39].

Výber vhodného sorbentu na prečistenie extraktu sa volí na základe vlastností použitej vzorky, ktoré by mohli rušiť analýzu. Najčastejšie využívaným sorbentom je PSA, ktorý odstraňuje najbežnejšie zložky matrice ako mastné kyseliny, cukry a niektoré iónové lipidy, vďaka čomu je jeho použitie výhodné pri analýze rastlinných produktov [56, 53].

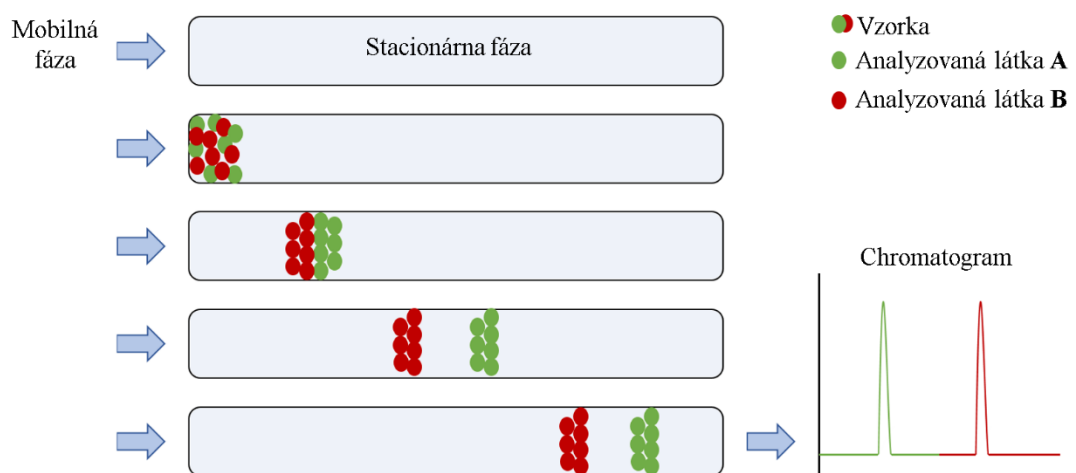
Avšak niektoré druhy ovocia a zeleniny majú vysoký obsah nepolárnych pigmentov (karotenoidy, chlorofyl), alebo obsahujú veľké množstvo tuku a preto sa vyžaduje ďalšie

špecifické prečistenie pomocou GCB. GCB patrí medzi dobrý retenčný sorbent, ktorý je vysokoúčinný pri odstraňovaní pigmentov a preto sa často pridáva spolu s PSA a síranom horečnatým ako súčasť čistiaceho kroku disperznej SPE. Okrem nežiadúcich pigmentov môže nechcene zadržať aj sledované analyty predovšetkým určité pesticídy (cyprodinil, tiabendazol, hexachlórbenzén). Jeho použitie pri príprave vzoriek sa využíva najmä pri analýze plynovou chromatografiou. Dôvodom je hromadenie sa látok s vyššou molekulárnou hmotnosťou v injekčnom porte a na čele kolóny, čo si vyžaduje častejšiu údržbu chromatografického prístroja. Sorbent C18 sa využíva prevažne na prečistenie extraktu v matriciach neobsahujúcich lipidy. Pri látkach s vysokým obsahom lipidov môže dôjsť k zníženiu výťažnosti [56]. Na druhej strane sa sorbent Z – Sep odporúča na analýzu hydrofóbných analytov v matriciach obsahujúcich > 15 % lipidov [53].

### **3. Kvapalinová chromatografia**

V súčasnosti patrí kvapalinová chromatografia („liquid chromatography“, LC) medzi jednu z najrozšírenejších separačných techník v rutinej ale i vedeckej praxi [44]. Princípom tejto separačnej metódy je oddeľovanie zložiek v analyzovanej zmesi na základe mnohonásobného opakovaného ustáľovania rovnováhy medzi dvoma nemiesiteľnými fázami – stacionárna (SF) a mobilná (MF). Nepohyblivou fázou je SF, ktorá je ukotvená na tuhom nosiči v chromatografickej kolóne vo forme sorbentu. V LC je MF kvapalina, ktorá cez sorbent preteká a so sebou unáša aj jednotlivé látky. Tieto zložky sa odseparujú na základe odlišných interakcií prebiehajúcich na SF a MF. Separácia dvoch analyzovaných látok A, B zo vzorky pomocou LC je znázornená na Obr. 8 [57, 58].

Elúcia jednotlivých zložiek zmesi sa môže uskutočniť za použitia izokratickej elúcie (rovnaká elučná sila), alebo gradientovej elúcie, čo znamená, že zloženie MF sa behom elúcie mení v prospech silnejšej elučnej zložky. Detekcia separovaných látok vychádzajúcich z analytickej kolóny sa detekuje vo vhodnom detekčnom systéme a nameraný signál je prevedený do podoby chromatografického záznamu – chromatogramu, ktorý je charakteristický elučnými krivkami gaussovského tvaru – píky [57, 58].



**Obr. 8.** Separácia dvoch analyzovaných látok A, B zo vzorky v chromatografickom systéme upravené podľa [57].

Najčastejším usporiadaním LC je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia („high performance liquid chromatography“, HPLC), ktorá sa skladá z nasledujúcich častí: [57]

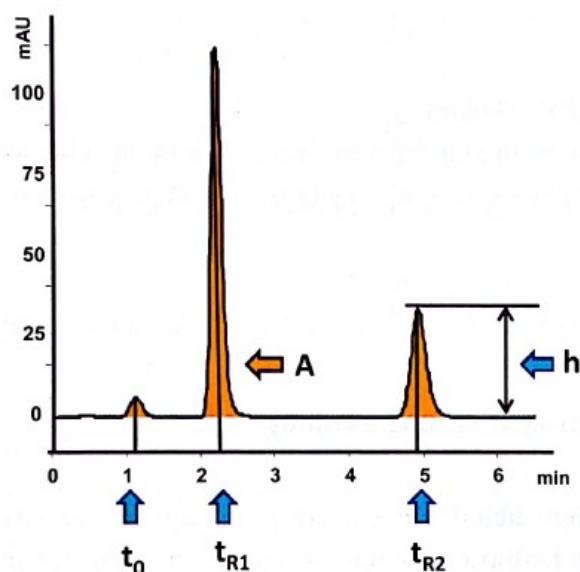
- Zásobníky MF.
- Degasér (odplyňovač) - jeho úlohou je odstrániť rozpustené plyny nachádzajúce sa v MF, ktoré by mohli tzv. zavzdušniť vysokotlakové pumpy a spôsobiť tak kolísanie tlaku v systéme.
- Vysokotlakové čerpadlo – umožňuje prenos MF do chromatografického systému za určitého tlaku.
- Dávkovač vzorky (autosampler) – nadávkuje množstvo vzorky.
- Chromatografická kolóna na ktorej prebieha samotná separácia látok, umiestnená v termostate.
- Detektor.
- Počítač a vyhodnocovací software.

Analýza cieľových farmaceutík v získaných extraktoch sa zvyčajne uskutočňuje pomocou HPLC, ktorá je preferovaná pred plynovou chromatografiou („gas chromatography“, GC), pretože mnoho z liečiv je termolabilných. Separácia hľadaných liečiv sa vo väčšine prípadov vykonáva na SF - C18 s reverznou fázou s použitím rôznych typov MF [39]. V súčasnej dobe však vývoj chromatografických techník smeruje k rýchlejšim separáciám so zachovaním alebo zlepšením ich účinnosti,

rozlíšenia alebo citlivosti daného merania. Pre získanie takejto separácie sa pracovalo na zmenšovaní častíc chromatografického sorbentu, čo však so sebou prinášalo spätné zvyšovanie tlaku v systéme a preto sa v roku 2004 vyvinula nová inštrumentálna metóda akou je ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia („ultra-high performance liquid chromatography“, UHPLC). Táto separačná metóda využíva pre zvýšenie účinnosti separácie a skrátenie času analýzy analytické kolóny s časticami menšími než 2  $\mu\text{m}$ . V porovnaní s HPLC sa veľkosť častíc pohybuje od 2,5 – 5  $\mu\text{m}$ . Kvôli vysokým spätným tlakom v UHPLC systéme musí prístroj pracovať s tlakom vyšším ako 100 MPa, či 1000 bar, na rozdiel od HPLC, kde chromatografický prístroj pracuje s tlakom okolo 40 MPa, či 4000 bar. Z dôvodu vyšších tlakov v UHPLC systéme sa kladie dôraz na častú výmenu komponentov prístroja, čo je ekonomicky náročné. Výhodou UHPLC, ktorá na druhej strane prispieva k nižším nákladom na separáciu patrí menšia spotreba MF a to z dôvodu jej nižšieho prietoku [57, 59, 60].

### 3.1. Kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie

Medzi charakteristické veličiny pre každú separovanú látku patrí elučný (retenčný) čas -  $t_R$ , a elučný (retenčný) objem -  $V_R$ . Elučný čas separovanej látky je doba, ktorá prejde od nástreku analyzovanej vzorky na analytickú kolónu, až po dosiahnutie maximálnej elučnej krivky (vrcholu píku) [57, 61].



**Obr. 9.** Kvantitatívne a kvalitatívne hodnotenie separovaných látok.  $t_R$  – elučný čas separovanej látky,  $t_0$  – elučný čas nezadržovanej zložky (mŕtvy elučný čas), A – plocha píku, h – výška píku. Na osi y je znázornená odozva UV detektoru v jednotkách mAU. Obrázok bol prevzatý od [57].

Elučný objem je objem MF, ktorá za tento čas pretečie analytickou kolónou. Mŕtvy elučný čas -  $t_0$  je čas nezadržovanej zložky (inertnej látky) na analytickej kolóne, ktorá sa pohybuje rovnakou rýchlosťou ako MF. Spomenuté elučné časy, plocha pod píkom (A) a výška píku (h) sú znázornené na Obr.9 [54].

### Kvalitatívne hodnotenie

Na identifikáciu separovaných látok v HPLC sa používajú  $t_R$  a  $V_R$ . Tieto údaje sa získajú integráciou píku za pomoci chromatografických vyhodnocovacích softwarov. Ďalšou možnosťou akou je možné identifikovať látky v zmesi je použitie špecifických detektorov akými je napríklad nukleárna magnetická rezonancia („nuclear magnetic resonance“, NMR) či hmotnostný spektrometer („mass spectrometry“, MS).

NMR poskytuje presné, detailné údaje o štruktúre molekuly, zatiaľ čo získané spektrá MS poskytujú údaje o molekulovej hmotnosti, izotopickom zastúpení, či fragmentoch molekúl (MS/MS). Princípom je identifikácia spektier štandardných látok so spektrami neznámych vzoriek, ktoré sa analyzovali za rovnakých chromatografických podmienok alebo sa porovnávajú s vytvorenou knižnicou spektier [44].

### Kvantitatívne hodnotenie

Kvantitatívnym hodnotením separovanej látky je vzťah medzi plochou pod píkom (A) alebo výškou píku (h) a množstvom eluovanej látky. Vyhodnotenie píkov prebieha pomocou chromatografických softwarov. Pri vyhodnocovaní sa dbá na správne určenie začiatku a konca píku, určení základnej línie na chromatograme a určení plochy (výšky) píku. Metóda, ktorá sa používa pre vyhodnotenie plochy (výšky) štandardu sa použije na vyhodnotenie plochy alebo výšky stanovovanej zlúčeniny. Závislosť medzi nameranou plochou (výškou) píku a neznámou koncentráciou sledovanej látky sa určí za pomoci štandardov [44].

Z oblasti inštrumentálnej analýzy sú používané najmä klasické metódy ako napríklad:

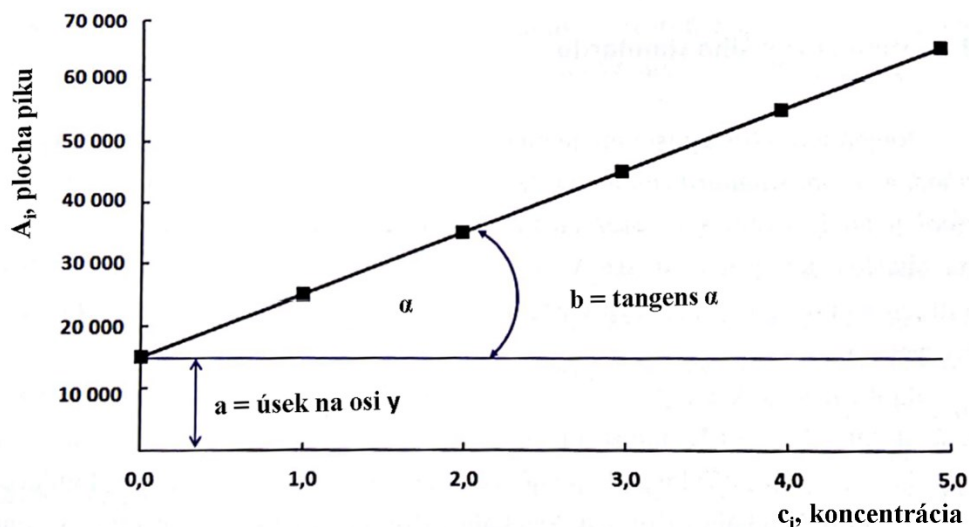
- Metóda vonkajšieho štandardu.
- Metóda prídavku štandardu.
- Metóda vnútorného štandardu s využitím kalibračnej krivky [44, 62].

### Metóda vonkajšieho štandardu

Kvantitatívne hodnotenie pomocou metódy vonkajšieho štandardu je v laboratórnej praxi najtypickejšie, pretože patrí medzi najjednoduchšie spôsoby vyhodnotenia neznámych látok. Používa sa v prípade, ak sú všetky vzorky a štandardy svojimi vlastnosťami rovnocenné o presne známej čistote [44, 63]. K vyhodnoteniu používa kalibračnú krivku, ktorá sa zostrojí za pomoci 5 až 7 kalibračných štandardov o známej koncentrácii. Toto meranie sa opakuje 2 až 3 krát. Najvýhodnejšie krivkou je lineárna kalibračná krivka, pretože umožňuje najspoľahlivejšie výsledky [44]. Neznáme množstvo látky je určené pomocou vyhodnocovacej analytickej funkcie:

$$x_i = a + bc_i$$

kde  $x_i$  je hodnota veličiny  $X$  pre koncentráciu  $c_i$ ,  $b$  je smernica kalibračnej priamky, ktorá vyjadruje citlivosť metódy,  $a$  je posunutie (úsek) na osi  $y$  znázornené na Obr. 10 [44].



Obr. 10. Kalibračná krivka s vyjadrením závislosti plochy píku na koncentrácii analytu upravené podľa [44].



### Metóda prídavku štandardu

Používa sa pri analýze zložitejších vzoriek. Porovnáva analytický signál vzorky so získaným signálom po pridaní známych štandardov rovnakého druhu ako je stanovovaná látka [44].

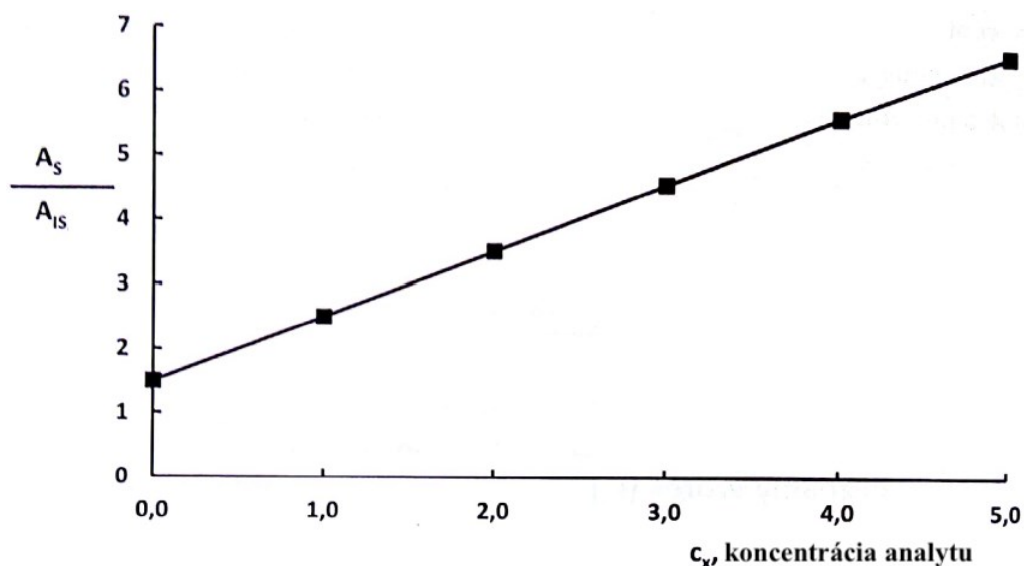
### Metóda vnútorného štandardu s využitím kalibračnej krivky

Výhodou tejto metódy kvantitatívneho hodnotenia je uskutočnenie celej analýzy v jednom nástreku vzorky na kolónu. Známa koncentrácia roztoku vnútorného štandardu („internal standard“, IS) je pridané k analyzovanému roztoku neznámej vzorky a analyzovanému roztoku štandardu. IS je vhodné pridať na začiatku analytického postupu z dôvodu možného ovplyvnenia stanovovanej látky alebo štandardu rôznymi zmenami pracovných podmienok. V takomto prípade sú IS a stanovovaná látka ovplyvňované rovnako [44].

Vhodne zvolený IS pre kvantitatívnu analýzu by mal spĺňať nasledujúce kritériá:

- oddeliť sa od všetkých zložiek analyzovanej vzorky,
- elúcia v blízkosti sledovanej látky,
- odlišná molekulová hmotnosť od molekulovej hmotnosti analytu,
- podobné fyzikálne a chemické vlastnosti s analyzovanou látkou,
- IS by sa nemal nachádzať v pôvodnej vzorke a ovplyvňovať analýzu [44, 64].

Metóda IS využíva metódu kalibračnej krivky, kedy sa k štandardným roztokom analytov pridá konštantný objem IS o známej koncentrácii. Rovnaký postup platí aj pri analýze neznámych vzoriek. Zmeria sa kalibračná krivka, ktorá znázorňuje závislosť koncentrácie analytu ( $c_x$ ) na pomere plochy analytu ( $A_S$ ) a IS ( $A_{IS}$ ) (viď Obr.11). Z vytvorenej kalibračnej krivky sa vypočíta neznáma koncentrácia analytu [44].

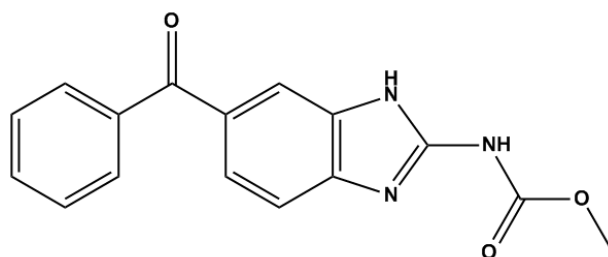


**Obr. 11.** Metóda vnútorného štandardu s využitím kalibračnej krivky upravené podľa [44].

Dobre zavedená a interpretovaná kalibračná krivka je nevyhnutná pre správnu kvalitu získaných údajov. Dva najbežnejšie používané regresné modely pre kalibračné krivky sú lineárne a kvadratické regresie pomocou neváženého a váženého regresného algoritmu najmenších štvorcov. Správne zvolený váhový faktor je určený vzťahom medzi štandardnou odchýlkou reakcií prístroja a koncentraciami ( $x$ ). Môže sa tak zvoliť váhový faktor 1,  $1/x$  alebo  $1/x^2$ , ktorý vyrovná nepresnosti medzi bodmi kalibračnej krivky. Významná odchýlka od linearitu o jeden najvyšší bod kalibračnej krivky môže dominovať všetkým ostatným bodom vo výpočtoch. Pre kvantitatívne bioanalytické analýzy je vhodné použiť váhový faktor  $1/x^2$ , pretože medzi koncentraciou a odchýlkou reakcií prístroja existuje lineárny vzťah [65].

### 3.1.1. Vybraný interný štandard

Na základe spomínaných kritérií bol pre tento experiment ako IS zvolený mebendazol (MEB), ktorý podobne ako ABZ patrí do skupiny benzimidazolových antihelmintík. Má veľmi podobné fyzikálno - chemické vlastnosti ako parentná látka a nie je zložkou nachádzajúcou sa v analyzovanej matrici. MEB s  $t_R = 7,426$  min. eluuje v blízkosti ABZ s  $t_R = 7,224$  min. Chemická štruktúra MEB je znázornená na Obr. 12 [66, 44].



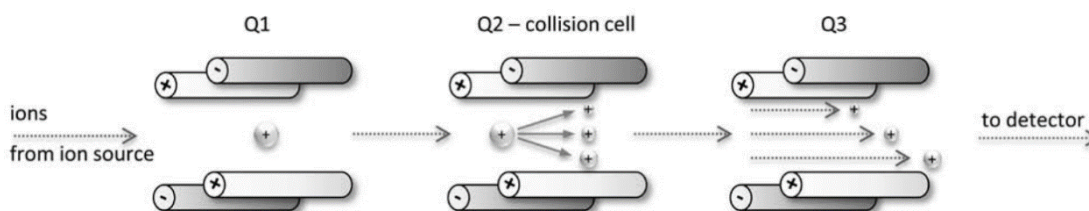
Obr. 12. Chemická štruktúra MEB upravená v Chemdraw podľa [66].

#### 4. Kvantifikácia látok pomocou LC-MS

Analýza sledovaných látok pomocou LC-MS prináša mnohé výhody akými sú napríklad vysoká citlivosť analýzy, selektivita, rýchlosť, spoľahlivosť či možnosť automatizácie. Princípom MS je prevedenie sledovaných molekúl na ióny pomocou iónového zdroja, rozdelenie vzniknutých iónov podľa ich pomeru hmotnosti a náboja ( $m/z$ ) pomocou vhodného analyzátoru a nakoniec meranie ich množstva prostredníctvom detektoru [67, 44, 68].

Kľúčovou súčasťou MS je analyzátor, v ktorom dochádza v prostredí vákua k separácii iónov. Najviac rozšíreným vďaka svojej cenovej dostupnosti, vysokej citlivosti, robustnosti a špecificite je trojitý kvadrupólový analyzátor (QqQ). Jeho uplatnenie je prevažne pri analýze pesticídov alebo v rutínnej kvantitatívnej analýze diagnostických biochemických markerov. QqQ pracuje v štyroch režimoch akými sú sken produktových iónov, sken prekursorových iónov, sken neutrálnych strát a sledovanie rozpadu iónov [44, 69, 67].

##### Sken produktových iónov

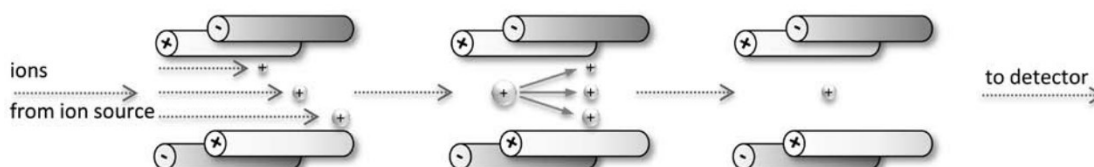


Obr. 13. Sken produktových iónov. Obrázok prevzatý od [67].

Skenovaním sa získavajú kompletne informácie o fragmentácii vybraného iónu. Využíva sa pre identifikáciu látok alebo na určenie vhodných prechodov pre kvantifikáciu

v monitorovaní vybranej reakcie („selected reaction monitoring“, SRM). Princíp skenovania produktových iónov je zobrazený na Obr. 13, kedy Q1 vyberá ión s definovanou hodnotou  $m/z$ , ktorý sa fragmentuje v kolíznej celi Q2 a následne pracuje v režime skenovania Q3 v definovanom rozsahu  $m/z$  [67, 44].

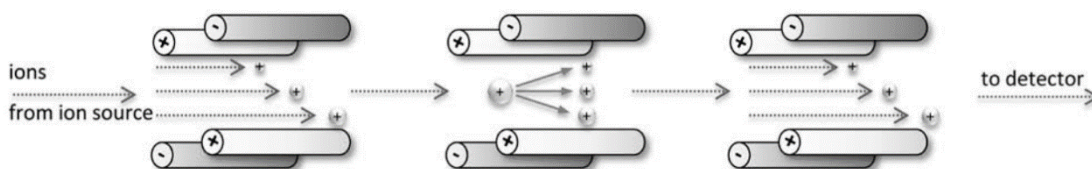
### Sken prekurzorových iónov



**Obr. 14.** Sken prekurzorových iónov. Obrázok prevzatý od [67].

Jeho použitie spočíva v sledovaní molekúl s rovnakou funkčnou skupinou s typickou fragmentáciou iónov. V porovnaní so skenovaním produktových iónov, pracuje Q1 v režime skenovania iónov s určitým  $m/z$ , čím do kolíznej celi Q2 postupne prepúšťa ióny so zvyšujúcou sa hodnotou  $m/z$ , ktoré sú následne fragmentované. Q3 prepustí len špecifický fragment iónu, ktorý je následne detekovaný (viď Obr.14) [67]. Pre kvantifikačné experimenty je výber správneho prekurzorového a produktového iónu podstatný. Zvolené ióny by mali mať v spektre vysokú intenzitu. Ďalej by mali vznikáť len ionizáciou príslušného analytu, tak aby bola zaistená dostatočná špecifita analýzy [44, 70, 68]

### Sken neutrálnych strát

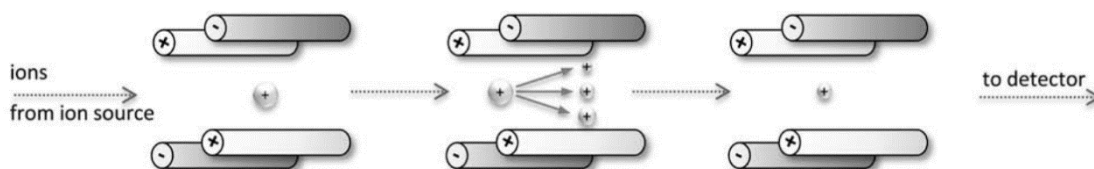


**Obr. 15.** Sken neutrálnych strát. Obrázok prevzatý od [67].

Aj v tomto režime sa sledujú molekuly s rovnakou štruktúrou. Skenovanie neutrálnych strát sa využíva v prípade derivatizácie, kedy naviazané funkčné skupiny látok zvyšujú ionizáciu a pri fragmentácii poskytujú neutrálny fragment. Q1 a Q3 skenujú ióny súčasne

s konštantnou diferenciou  $m/z$ , ktorá predstavuje neutrálny fragment, ktorý vznikol v kolíznej cele (viď Obr. 15) [67, 68].

### Sledovanie rozpadu iónov



**Obr. 16.** Monitorovanie vybranej reakcie - SRM. Obrázok prevzatý od [67].

Na Obr. 16. je znázornené ako Q1 vyberá prekursorový ión, ktorý sa v kolíznej cele Q2 fragmentuje za optimálnych podmienok kolíznej energie na najintenzívnejší produkt, ktorý je vybraný pomocou Q3 a následne detekovaný. SRM patrí medzi veľmi citlivý, špecifický a vysoko selektívny mód využívaný pri kvantifikácii analyzovaných látok. Dokáže kvantifikovať vopred známe alebo očakávané zlúčeniny a to s pomocou vhodného nastavenia SRM prechodu. Hmotnostný prechod určuje kvalitu analýzy a je definovaný dvoma hodnotami  $m/z$ , ktoré zodpovedajú prekursoru a produktu. Výhodami SRM je vysoká rýchlosť merania jedného bodu príslušného hmotnostného prechodu, čo znamená, že v jednej analýze pomocou SRM sa dokáže zmerať stovka analytov, čo sa označuje aj ako monitorovanie viacerých reakcií („multiple reaction monitoring“, MRM) [44, 67, 68].

Pre kvantifikáciu s pomocou LC-MS sa najčastejšie využíva metóda IS, ktorý slúži ako korekčný faktor metódy ale aj možnej straty vzorky počas jej úpravy [44, 70]. Pred uskutočnením kvantifikácie sledovaných látok v zložitých maticiach je potrebné vykonať validáciu metódy, aby sa zaistila jej presnosť, správnosť a spoľahlivosť [44, 64].

## 5. Ciele práce

Zámerom tejto diplomovej práce bolo monitorovanie šírenie ABZ a jeho vybraných TP - ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> z výkalov oviec (ošetrených ABZ) v poľnohospodárskej pôde.

Cieľom bolo:

1. Sledovanie do akej vzdialenosti (10, 25, 30, 40, 60, 75 cm) a do akej hĺbky od ovčieho trusu (v dvoch rôznych gramážach 35 g a 105 g) na poľnohospodársku pôdu, sa rozšíri parentná látka a jej TP v priebehu 13 týždňov od aplikácie trusu.
2. Kvantifikácia vybraných TP a parentnej látky v poľnohospodárskej pôde s pomocou LC-MS.

# EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

## 6. Použité chemikálie, prístrojové vybavenie a pracovné pomôcky

Dostupnosť materiálu pre tento experiment bola zaistená katedrou biochemických vied Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové.

### 6.1. Chemikálie

Aldifal – Mikrochem s.r.o. Pezinok, SR

Albendazol - Sigma-Aldrich Praha, ČR

Albendazol sulfoxid - Sigma-Aldrich Praha, ČR

Albendazol sulfón - Sigma-Aldrich Praha, ČR

Mebendazol – Sigma-Aldrich Praha, ČR

Acetonitril – v UHPLC-MS kvalite od VWR International s.r.o. Praha, ČR

Kyselina mravčia – LC-MS LiChropur™, 97,5 - 98,5 % od Sigma-Aldrich Praha, ČR

Amoniak – Penta, Praha, ČR

Etanol - Penta, Praha, ČR

Ultračistá voda – pripravená z deionizovanej vody systémom Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA

Citronan sodný dihydrát p.a. – Lach:ner, Praha, ČR

Síran horečnatý bezvodý č. – Lach:ner, Penta, Praha, ČR

Citronan sodný seskvihydrát – ROTH, Praha, ČR

Chlorid sodný p.a. – Penta, Praha, ČR

### 6.2. Prístrojové vybavenie

Analytické váhy – Sartorius CP225D

Laboratórne váhy – Kern 440-43N

Trepačka – Heidolph Multi Reax

Vortex - V-1 PLUS, BIOSAN

Roler – Dlab MX-T6-S

Centrifúga – Eppendorf 5810 R

Vákuový koncentrátor – Concentrator 5301, Eppendorf  
Systém čistenia vody – Millipore, Milli Q  
Ultrazvukový kúpeľ – K10, Kraintek, SR  
Hlbokomraziaci box (-20 °C) - Liebherr  
Kvapalinový chromatograf – UHPLC Shimadzu Nexera, Japonsko  
Hmotnostný spektrometer – Shimadzu 8030 Triple Quadrupole, Japonsko

### **6.3. Pracovné pomôcky**

V experimentálnej časti boli použité: stojany na skúmavky a mikroskúmavky, laboratórne sklo (odmerný valec, fľaše so závitom (číre, hnedé sklo, kadička), keramická miska s tlčíkom, sito s veľkosťou oka 2 mm, obojstranná chemická lyžička, manuálny dávkovač s nastaviteľným objemom, skúmavky Eppendorf (5 ml, 15 ml, 50 ml), nesterilné pipetovacie špičky Eppendorf, nitrilové rukavice, sklenené vialky, inzerty, jednorazové filtre (LUT Syringe Filters PTFE, 4 mm, 0,22 µm, pk/1000 Labstore/European Laboratory Footprint), jednorazové sterilné trojdielne striekačky 1ml (Medilab ČR), automatické pipety (Research Plus, Eppendorf).

### **6.4. Príprava mobilnej fáze, príprava štandardov, organického rozpúšťadla, extrakčnej zmesi, kalibračných kriviek a ich rozsah.**

#### **6.4.1. Príprava mobilnej fáze**

MF bola pripravená z chemikálií s vyhovujúcou analytickou kvalitou a čistotou pre použitie na analýzu pomocou LC-MS. Pre tento experiment bola použitá gradientová elúcia MF skladajúca sa z dvoch zložiek (A) a (B).

Zložka (A) sa pripravila pridaním 0,1 % kyseliny mravčej k objemu ultračistej vody. Zložka (B) sa pripravila pridaním 0,1 % kyseliny mravčej k ACN.



#### **6.4.2. Príprava zásobných roztokov štandardov**

Zásobné štandardné roztoky ABZ (0,2653 mg/ml), ABZSO (0,2813 mg/ml), ABZSO<sub>2</sub> (0,2973 mg/ml) a MEB (0,2953 mg/ml) boli pripravené rozpustením každej zlúčeniny v dimetylsulfoxide (DMSO). Takto pripravené štandardné roztoky sa skladovali pri 4 °C.

#### **6.4.3. Príprava pracovných roztokov štandardov**

Pracovné roztoky boli pripravené nariadením zásobných roztokov štandardov 10-krát a 100-krát v ACN pre konštrukciu kalibračných kriviek.

#### **6.4.4. Príprava organického rozpúšťadla**

Na prípravu 500 ml organického rozpúšťadla (ACN s prídavkom 1 % amoniaku) použitého pri QuEChERS extrakcii sa do odmerného valca pridalo 495 ml ACN. Následne sa v digestore dopitetoval objem 5 ml amoniaku. Vzniknutý roztok organického rozpúšťadla sa uchovával na tmavom a suchom mieste.

#### **6.4.5. Príprava extrakčnej zmesi**

Extrakčná zmes sa pripravila navážením:

- 136 g síranu horečnatého bezvodého,
- 34 g chloridu sodného,
- 34 g citronanu sodného dihydrátu,
- 17 g citronanu sodného seskvihydrátu.

Takto navážená zmes sa dobre premiešala a uskladňovala v uzavretej tmavej sklenenej nádobe na suchom mieste. Na extrakciu jednej vzorky pôdy pomocou modifikovanej QuEChERS metódy bolo použitých 6,5 g extrakčnej zmesi. Preto sa z vytvorenej zmesi do 15 ml eppendorfiiek navážilo po 6,5 g extrakčnej zmesi. Takýmto spôsobom vzniklo presne 34 extrakčných zmesí, ktoré boli použité pre jednotlivé extrakcie pôdy.

#### 6.4.6. Príprava kalibračných kriviek a ich rozsah

Pripravil sa celkom 8 kalibračných roztokov v triplikáte o danej koncentrácii sledovaných analytov (ABZ, ABZSO, ABZSO<sub>2</sub> a MEB), kde koncentrácia IS - MEB bola v každom bode kalibračnej krivky rovnaká (vid'. Tab. 3). Kalibračné krivky sa zostrojili ako v MF tak aj pre slepú maticu, aby sa zabránilo účinkom matice.

Tab. 3. Jednotlivé body kalibračnej krivky a ich koncentrácie sledovaných analytov.

Bod kalibračnej krivky	Analyt			
	ABZSO (µg/ml)	ABZSO <sub>2</sub> (µg/ml)	ABZ (µg/ml)	MEB (µg/ml)
1.	0,002813	0,002973	0,002653	1.47650
2.	0,014065	0,014865	0,013265	1.47650
3.	0,022504	0,023784	0,021224	1.47650
4.	0,028130	0,029730	0,026530	1.47650
5.	0,140650	0,148650	0,132650	1.47650
6.	0,281300	0,297300	0,265300	1.47650
7.	0,703250	0,743250	0,663250	1.47650
8.	1,406500	1,486500	1,326500	1.47650

#### 7. Priebeh experimentu

Pôdny experiment prebiehal za prirodzených podmienok na poľnohospodárskom družstve v Býšti (Zemědělská akciová společnost Býšť, 533 22 Býšť 169).

Keďže experiment prebiehal v prirodzenom prostredí, bol sledovaný aj mesačný úhrn zrážok, ktorý by mohol mať vplyv na namerané koncentrácie sledovaných látok.

Poľnohospodárske družstvo v Býšti sa nachádza na území Pardubického kraja, kde za rok 2020 napadlo 898 mm zrážok. Podľa dát z Českého hydrometeorologického ústavu napadli zrážky v Pardubickom kraji prevažne vo februári, letných mesiacoch (jún, august) a septembri. Experiment prebiehal v časovom rozmedzí od marca do konca mája 2020 a zrážky napadané v týchto mesiacoch sú zvýraznené v Tab. 4. [71].

Tab. 4. Územné zrážky v roku 2020 upravené podľa [71].

ÚZEMNÉ ZRÁŽKY V ROKU 2020			
KRAJ	Úhrn zrážok za mesiac (v mm)		Úhrn zrážok za rok (v mm)
Pardubický	január	19	898
	február	96	
	<b>marec</b>	<b>39</b>	
	<b>apríl</b>	<b>17</b>	
	<b>máj</b>	<b>67</b>	
	jún	216	
	júl	63	
	august	128	
	september	89	
	október	108	
	november	28	
	december	26	

## 7.1. Podanie albendazolu a odber vzoriek trusu

Ovčí trus použitý v tomto experimente má charakter zmesi a pochádza od 10 ovci domácich, ktorým bola podávaná suspenzia ABZ (Aldifal) v preventívnej dávke 10 mg/kg živej hmotnosti. V tomto experimente boli ABZ liečení samci do 1 roku. Ovce boli samostatne ustajnené a trus im bol zbieraný po dobu 24 hodín od podania z dôvodu kinetiky liečiva. Celková hmotnosť nazbieraného trusu presahovala 5 kg.

Pomocou metódy kvartácie bola zvolená reprezentatívna vzorka trusu 1500 g z ktorej prevažná časť bola aplikovaná na experimentálne pole. Zbytok ovčieho trusu bol použitý pre kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu obsahu sledovaných látok pre neskoršie porovnávanie výsledkov.

## 7.2. Aplikácia trusu na experimentálne pole

Podľa výskumného ústavu rastlinnej výroby je vhodné hnojiť poľnohospodársku pôdu maštaľným hnojivom na jar pred vegetačným obdobím, a preto bol začiatok poľného experimentu smerovaný na začiatok marca 2019. Experiment bol zopakovaný na jar o rok neskôr za rovnakých podmienok.

Reprezentatívne vzorky zbieraného ovčieho trusu boli aplikované na povrch poľnohospodárskej pôdy, rozdelenej na dve časti v tesnej blízkosti 16 hlavných rastlín. Z týchto rastlín bolo pohnojených 8 rastliniek ďateliny lúčnej (*Trifolium pratense*), ktoré sa označili červenou vlajkou a 8 rastliniek lucerny siatej (*Medicago sativa*) označených žltou vlajkou (viď Obr. 17). Obe z týchto zvolených rastlín patria medzi bežné krmoviny pasúcich sa zvierat [40].

Monitorovaním koncentrácií vybraných TP v rastlinkách sa zaoberá ďalšia diplomová práca na Katedre biochemických vied v Hradci Králové.



Obr. 17. Aplikácia ovčieho trusu na experimentálne pole.

Ovčí trus bol aplikovaný v blízkosti rastlín v množstve 35 g a 105 g. Tieto gramáže aplikovaného trusu boli zapísané na bielu značku, ktorá bola zapichnutá v mieste pohnojenej pôdy. Štyri rastliny d'ateliny lúčnej sa pohnojili 35 g ovčieho trusu a zvyšné štyri sa pohnojili 105 g ovčieho trusu liečených zvierat. Rovnaký postup hnojenia bol použitý aj pre hnojenie lucerny siatej.

Týmto spôsobom hnojenia tak vznikli 4 skupiny :

1. Štyri rastliny d'ateliny lúčnej pohnojenej 35 g ovčieho trusu.
2. Štyri rastliny d'ateliny lúčnej pohnojenej 105 g ovčieho trusu.
3. Štyri rastliny lucerny siatej pohnojenej 35 g ovčieho trusu.
4. Štyri rastliny lucerny siatej pohnojenej 105 g ovčieho trusu.

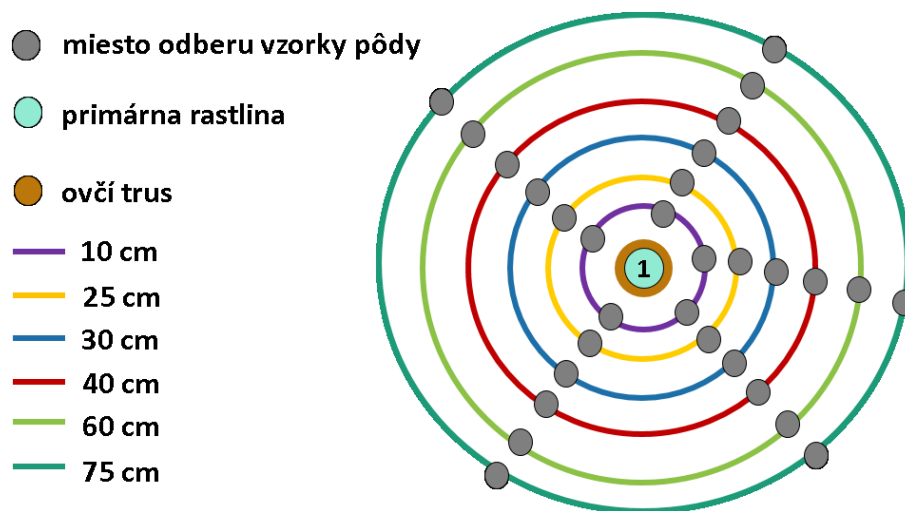
Množstvo ABZ, ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> nachádzajúcich sa v ovčom truse, ktorý bol aplikovaný na experimentálne pole je vyjadrené v Tab 5. Jednotlivé miesta hnojenia rastlín boli vybrané na základe budúceho odberu vzoriek pôdy tak, aby kôpky ovčieho trusu boli od seba dostatočne vzdialené.

**Tab. 5.** Množstvo TP nachádzajúcich sa v jednotlivých gramoch trusu aplikovaných na experimentálne pole.

	Pohojená rastlina	Hmotnosť trusu (g)	Koncentrácia ABZ (μg)	Koncentrácia ABZSO (μg)	Koncentrácia ABZSO <sub>2</sub> (μg)
1.skupina	d'atelina lúčna	35	14	499	42
2.skupina	d'atelina lúčna	105	40	1496	126
3.skupina	lucerna siata	35	14	499	42
4.skupina	lucerna siata	105	40	1496	126

### 7.3. Odber vzoriek pôdy

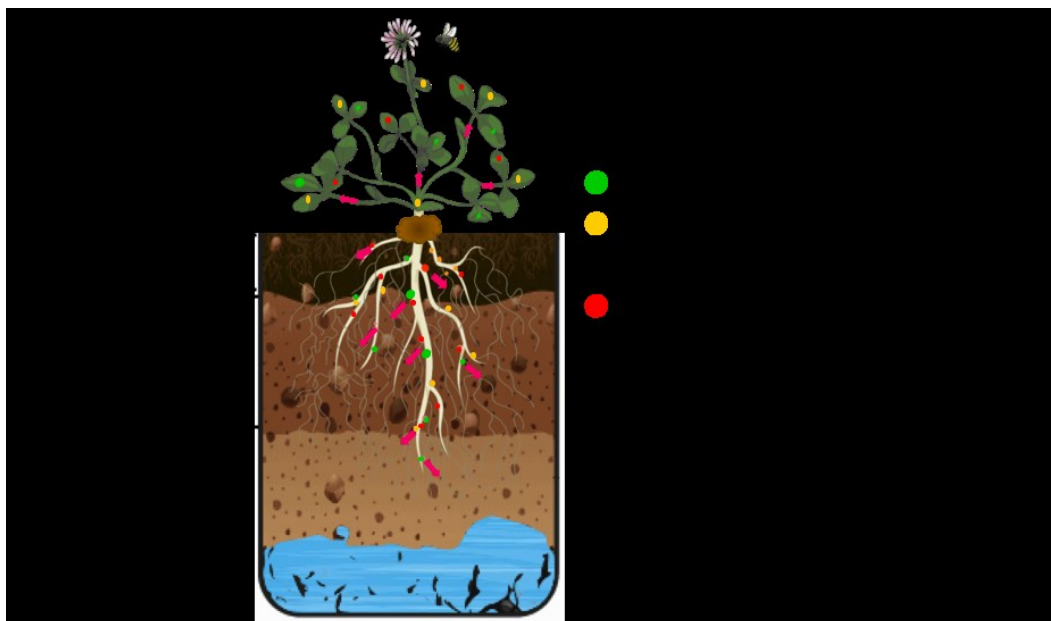
Odber vzoriek pôdy prebiehal v časových rozstupoch a to 2, 3, 5, 8 a 13 týždňov od aplikácie ovčieho trusu liečených zvierat na poľnohospodársku pôdu. Od pohnojovaných rastlín bol vymedzený rádius 75 cm, v ktorom sa odoberali jednotlivé vzorky pôdy vo vzdialenostiach 10, 25, 30, 40, 60, 75 cm znázornených na Obr. 18. Smer odberu vzoriek pôdy bol vykonávaný v smere hodinových ručičiek.



**Obr. 18.** Grafické znázornenie odberu vzoriek pôdy z jednotlivých vzdialeností od aplikácie ovčieho trusu k primárnej rastline.

Zároveň bola odobraná vzorka pôdy v dvoch rozdielnych hĺbkach 0-1 cm a 1-5 cm ako je znázornené na Obr. č.19., a to pomocou špeciálnej odberovej súpravy určenej pre zemín. Z dôvodu nenahraditeľnosti miesta daného pôdneho profilu bol odber vzoriek vykonávaný z jednotlivých polomerov za sebou.

V určený deň odberu (napr. 2. týždeň od aplikácie trusu) sa vykonali odbery pôdy vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastliny v prvej a druhej hĺbke, ďalej vo vzdialenosti 25 cm v prvej a druhej hĺbke a takto sa pokračovalo v odberoch zo všetkých určených vzdialeností od primárnej rastliny.

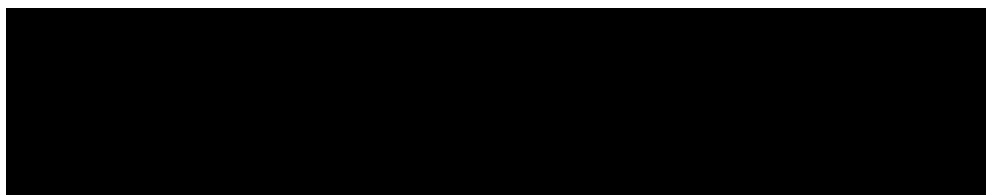


**Obr. 19.** Jednotlivé hĺbky odberu vzoriek poľnohospodárskej pôdy a cirkulácia parentnej látky, jej metabolitov vytvorených rastlinou alebo ovcou domácou z trusu liečených zvierat.

#### 7.4. Úprava vzoriek pôdy pred extrakciou

Správne označené a odobraté vzorky pôdy z jednotlivých časových intervalov, stanovených vzdialeností od primárnej rastliny a dvoch hĺbok boli pokladané na ľad. Všetky odobraté vzorky boli pred plánovanou extrakciou sušené v sušiarňi pri teplote 30 °C po dobu 12 hodín, aby sa zabránilo degradácií sledovaných zlúčenín.

Z troch vzoriek, ktoré sa už ďalej nepoužívali sa stanovil obsah pôdnej vlhkosti. Tieto vzorky boli zvažované a sušené v peci pri teplote 110 °C do konštantnej hmotnosti. Následne sa v týchto vzorkách vypočítal obsah pôdnej vlhkosti, ktorý udáva, koľko gramov vody sa nachádza v 100 g analyzovanej vzorky [72]. Vzorec na výpočet obsahu vlhkosti v pôde je znázornený na Obr. 20.



**Obr. 20.** Výpočet obsahu vlhkosti v pôde upravené podľa [72].

Vzorky vysušenej pôdy sa zomleli v keramickej miske tláčikom a preosiali sa cez sito s veľkosťou oka 2 mm. Z pôdy zomletej na jemný prášok sa pripravili zmesi. Zmes pôdy pre prvú hĺbku sa pripravila navážením približne 20 g vzorky pôdy odobratej z miesta 1. skupiny (4 rastlinky ďateliny lúčnej pohnojenej 35 g ovčieho trusu) s 20 g vzorky pôdy z miesta 3. skupiny (4 rastlinky lucerny siatej pohnojenej 35 g ovčieho trusu). Rovnako sa pripravila zmes pôdy pre 105 g ovčieho trusu a to zmiešaním odobratých vzoriek z 2. a 4. skupiny. Celý tento postup sa zopakoval aj pre vzorky pôdy odobratej z druhej hĺbky. Týmto zmiešaním pôdy nám vznikli 4 základné zmesi pôdy znázornené v Tab.6.

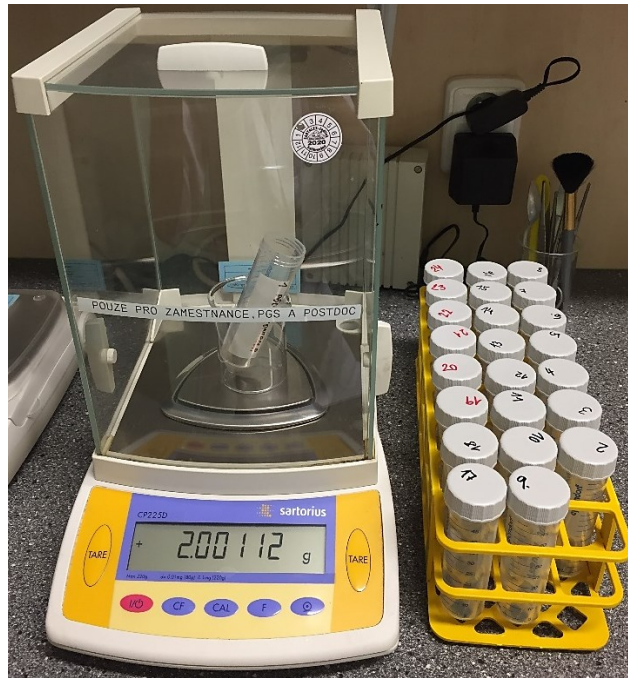
**Tab. 6.** Vytvorené zmesi pôdy (I-IV) z dvoch odobratých hĺbok od primárnych pohnojených rastlín.

Zmes pôdy	Hĺbka	Pohnojené rastliny
I.	1.	ďatelina (35 g) + lucerna (35 g)
II.	1.	ďatelina (105 g) + lucerna (105 g)
III.	2.	ďatelina (35 g) + lucerna (35 g)
IV.	2.	ďatelina (105 g) + lucerna (105 g)

Každá z vytvorených zmesí pôdy (I-IV) bola odobratá z každej vzdialenosti od primárnej rastliny pohnojenej ovčím trusom a to z 10 cm, 25 cm, 40 cm, 60 cm a 75 cm. To znamená, že každá vytvorená zmes I-IV je špecifická pre odobratú vzdialenosť a hĺbku vzorky pôdy.

Následne sa z týchto vzniknutých zmesí pôdy navážili pomocou analytických váh triplikáty s 2,0 g pôdy do 50 ml skúmaviek Eppendorf s kónickým dnom, ako je znázornené na Obr. 21. Takto pripravené triplikáty pôdy sa pred extrakciou uskladnili v mraziacom boxe pri teplote -20 °C.





Obr. 21. Váženie vzorky pôdy na analytických váhach.

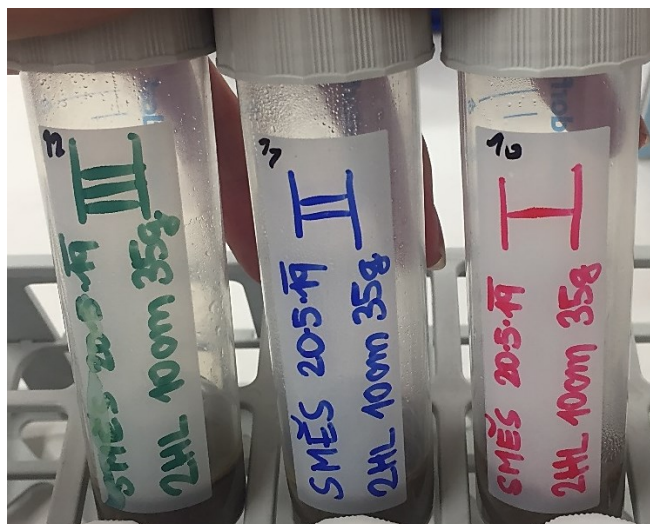
## 7.5.Extrakcia sledovaných látok z pôdy

Hľadané látky boli z pôdy extrahované pomocou modifikovanej metódy QuEChERS (EN15662 :2008).

Postup sa skladá z nasledujúcich krokov:

- extrakcia sledovaných látok s vynechaním prečisťovacej fáze,
- zakoncentrovanie sledovaných látok,
- rekonštitúcia v MF.

Pracovalo sa s vopred naváženou zmesou pôdy (2,0 g) označenou na skúmavkách ako ZMES I,II,III, pretože každá vzorka pôdy sa extrahovala v triplikáte ako môžeme vidieť na Obr. 22. Pre lepšiu orientáciu pri extrakcii bola každá zo vzoriek označená arabskou číslicou, s ktorou sa pracovalo po celý čas extrakcie.



Obr. 22. Navážené a označené vzorky pôdy v triplikáte.

### Extrakcia sledovaných látok s vynechaním prečist'ovacej fázy

Do pripravených 50 ml skúmaviek s naváženou pôdou (2,0 g) sa pridalo 5 ml ultračistej vody a následne sa napipetovalo 20  $\mu$ l (0,0295 mg/ml) IS. Ďalej sa pomocou manuálneho dávkovača s nastaviteľným objemom pridalo 10 ml ACN s prídavkom 1 % amoniaku. Jednotlivé roztoky sa zľahka krúživým pohybom premiešali. Nasledovalo pridanie extrakčnej zmesi (6,5 g), ktorá sa do 50 ml skúmaviek pridávala na dvakrát z dôvodu lepšieho premiešania sa s pôdou a pridanými roztokmi. To znamená, že polovica extrakčnej zmesi sa vysypala do 50 ml skúmavky s pôdou, jemne sa premiešala a následne sa dosypal zvyšok extrakčnej zmesi.

Táto zmes sa spolu s pôdou a roztokmi na minútu premiešala pomocou vortexu. Miešaním vznikla exotermická reakcia, ktorá vzorky pôdy zahriala na vysokú teplotu, preto sa na pár minút vložili do nádoby s ľadovou drťou ako je znázornené na Obr. 23. Nasledovalo pretrepanie vzoriek na trepačke s časom trepania 30 min, pri vyššej rýchlosti ako je znázornené na Obr. 24.

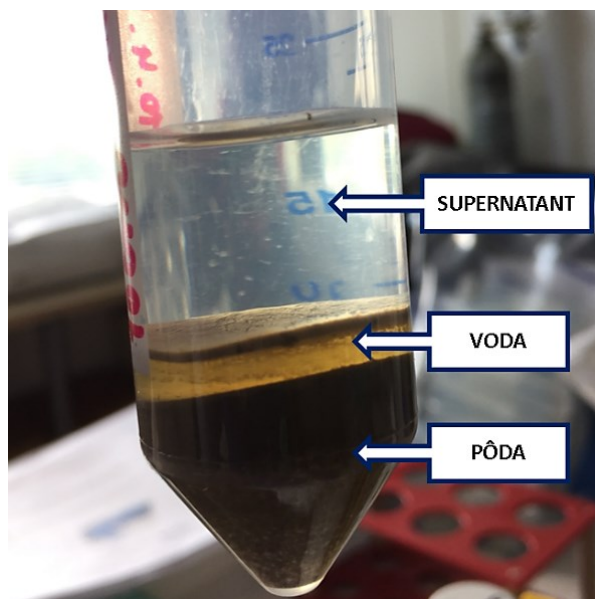
Po pretrepaní vzoriek na trepačke nasledovala centrifugácia vzoriek pri 3000 x g na 18 min. Scentrifugovaním sa zložky oddelili do jednotlivých fáz znázornených na Obr. 25.



Obr. 23. Vzorok pôdy chladené ľadovou drťou.



Obr. 24. Pretrepanie vzoriek pôdy na trepačke.



**Obr. 25.** Rozdelenie fáz extrakcie.

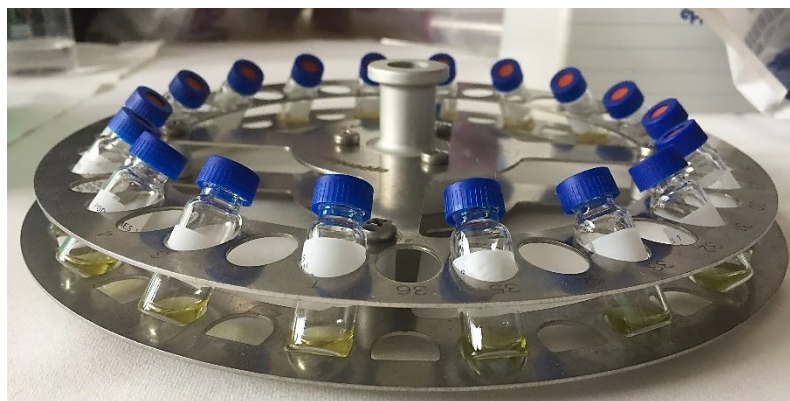
### Zakoncentrovanie sledovaných látok

Prvé množstvo supernatantu (4 ml) sa opatrne odpipetovalo do 5 ml skúmavky Eppendorf. Toto množstvo sa dalo odparovať do koncentrátoru na približne 2 – 3 hodiny pri 30 °C (V-AL).

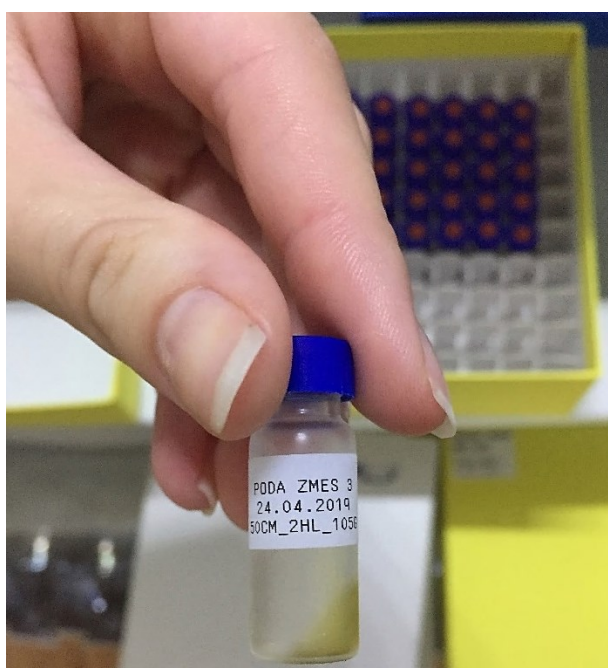
Po odparení sa do skúmaviek pridalo druhé množstvo supernatantu (4 ml) a opäť sa za rovnakých podmienok odparilo dosucha v koncentrátoře. Celkový objem odpareného supernatantu z každej vzorky bol 8 ml.

Po zakoncentrovaní vzoriek v koncentrátoře sa do 5 ml skúmaviek pridalo 200  $\mu$ l ACN s prídavkom 1 % amoniaku. Nasledovalo pretrepanie na trepačke počas 30 minút pri vyššej rýchlosti. Následne sa skúmavky vložili do ultrazvuku na dobu 10 – 15 minút. Po vytiahnutí z ultrazvuku sa ešte raz pretrepali v trepačke na približne 5 – 10 minút. Takto rozpustený odparok sa prepipetoval do pripravených a označených vialiek, ako je zobrazené na Obr. 26 a bez vrchnáčikov sa dal odparovať do koncentrátoře pri 30 °C na 60 minút.

Zakoncentrované vzorky pôdy vo vialkách sa pripravili na rekonštitúciu v minimálnom objeme MF. Analýza pomocou LC sa uskutočnila, až keď boli všetky vzorky vyextrahované a pripravené. Preto sa pred uskladnili v hlbokomraziacom boxe pri - 20 °C ako je znázornené na Obr.27.



**Obr. 26.** Rozpustený odparok pripravený na zakoncentrovanie v koncentrátore.



**Obr. 27.** Zakoncentrované vzorky pôdy uskladnené v hlbokomraziacom boxe pred rekonštitúciou v MF.

### Rekonštitúcia v MF

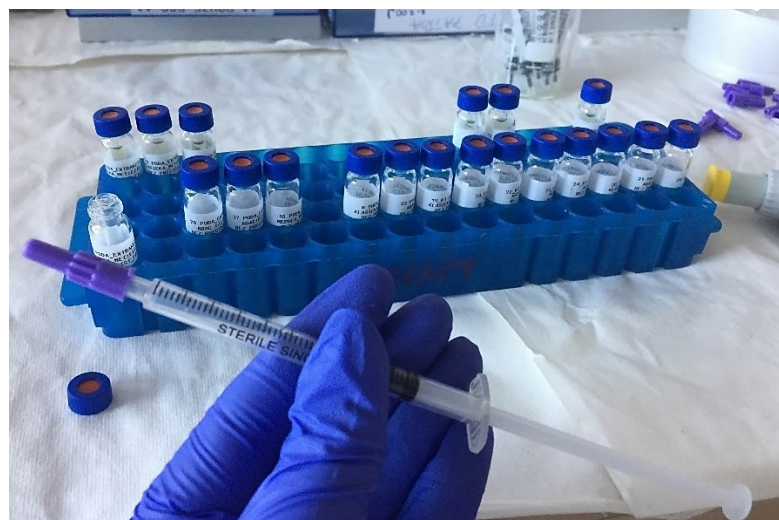
Vysušené extrakty pôdy skladované pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v hlbokomraziacom boxe sa rekonštituovali v minimálnom objeme MF. Do vialiek sa napipetovalo  $30\text{ }\mu\text{l}$  ACN a následne sa vialky vložili na 10 minút do ultrazvuku. Po pôsobení ultrazvuku sa vialky umiestnili na roler, kde sa ešte cca 10 minút premiešavali, ako je zachytené na Obr.28. Nasledovalo prídanie  $70\text{ }\mu\text{l}$  ultračistej vody a postup s pôsobením ultrazvuku a premiešavaním na roleri sa zopakoval.

Rozpustené extrakty sa prefiltrovali cez jednorázové filtre PTFE s veľkosťou pórov  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  pomocou jednorázových injekčných striekačiek do vialiek

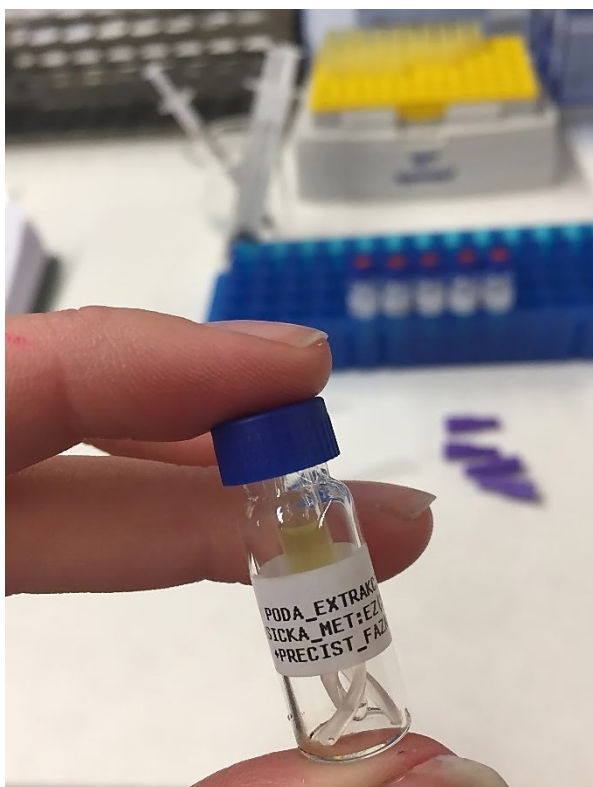
so sklenenými inzertmi. To umožňuje jednoduchšie nasatie vzorky a tým aj lepší nástrek na analytickú kolónu. Filtrácia extraktov pred samotnou analýzou je znázornená na Obr. 29. Prefiltrovaná vzorka pôdy pripravená na analýzu pomocou LC-MS je znázornená na Obr. 30.



**Obr. 28.** Premiešavanie rekonštituovaných extraktov pôdy na roleri.



**Obr. 29.** Filtrácia extraktov pôdy pomocou jednorázových PTFE filtrov a sterilných striekačiek do sklenených vialiek.



**Obr. 30.** Prefiltrovaný extrakt pripravený na analýzu pomocou LC-MS.

## **8. Stanovenie analytov pomocou LC/MS**

Analýza vzoriek sa uskutočňovala pomocou UHPLC prístroja s použitím trojitého kvadrupólového hmotnostného analyzátoru. Všetky merania sa uskutočňovali v režime ionizáciou elektrosprejom („ElectroSpray Ionization“, ESI) v pozitívnom móde, pretože tento režim poskytoval lepšiu citlivosť pre sledované zlúčeniny. Hmotnostný spektrometer bol v režime SRM so sledovaním vybraných prechodov iónov. Špecifické podmienky SRM sa optimalizovali priamym nástrekom štandardných roztokov ABZ, ABZSO, ABZSO<sub>2</sub> a MEB do prístroja. Pre kvantitatívnu analýzu bol ako IS použitý MEB so sledovaním jeho relatívnych plôch pík (plocha píku hľadanej zlúčeniny / plocha píku IS) a na korekciu vzniknutých chýb v krokoch prípravy vzorky na analýzu.

Získané dáta sa analyzovali pomocou softvéru LabSolution LC-MS ver. 5.93 (Shimadzu, Japonsko). Údaje sa uvádzali ako aritmetický priemer  $\pm$  SD (n=3) z pripravených a analyzovaných triplikátov.

## 8.1. Chromatografické podmienky

Podmienky za ktorých sa vykonávala chromatografická analýza v tomto experimente sú znázornené v Tab. 7. Ako SF bola použitá analytická kolóna Zorbax vhodná na separáciu kyslých zásaditých a iných vysoko polárnych zlúčenín pomocou HPLC s reverznou fázou. MF pozostávala z dvoch zložiek s použitím lineárneho gradientu.

Tab. 7. Použité chromatografické podmienky.

<b>CHROMATOGRAFICKÉ PODMIENKY</b>	
<b>Analytická kolóna</b>	Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (150x2.1 mm, 1.8 $\mu$ m) - (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko)
<b>MF</b>	Pozostáva z dvoch zložiek: A – ultračistá voda s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej B – ACN s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej
<b>Rýchlosť prietoku MF</b>	0,4 ml/minútu
<b>Gradient MF</b>	0 minúta – 15 % B, 8 minúta – 40 % B, 10 minúta – 95 % B. Potom nasledovala 1 minúta izokratického vymývania.
<b>Nástrek na analytickú kolónu</b>	1 $\mu$ l
<b>Teplota kolónového priestoru</b>	40 °C
<b>Analyzátor</b>	Trojité kvadrupól (QqQ)

### Kalibračná krivka

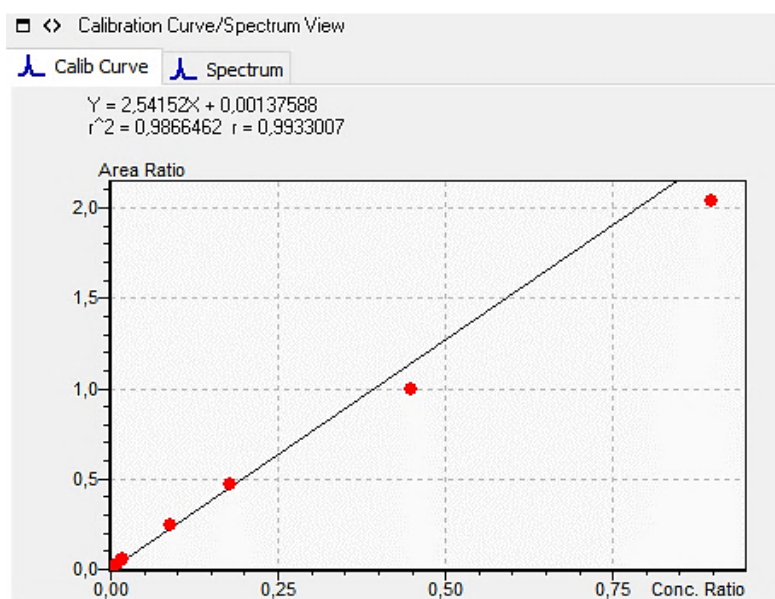
Pre kvantitatívne vyhodnotenie analyzovaných vzoriek bola použitá metóda IS s využitím kalibračnej krivky. Kalibračná krivka bola vytvorená z 8 bodov o zvyšujúcej sa koncentrácii v  $\mu$ g/ml sledovaných zlúčenín ako bolo znázornené v Tab.3. v kap. 6.4.6.



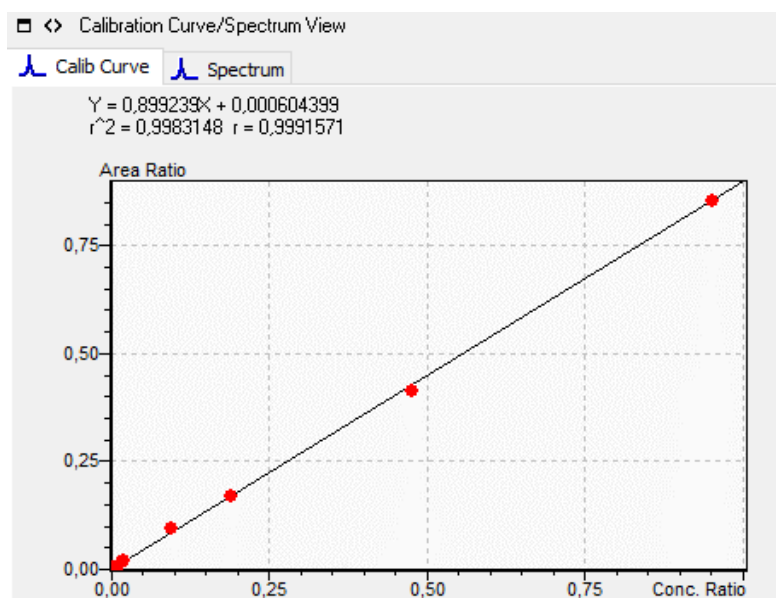
Pri zostrojení kalibračnej krivky zmeranej v matici bol použitý váhový faktor  $1/x^2$ . Vzorce kalibračných kriviek jednotlivých TP sú uvedené v Tab. 8. Kalibračné krivky pre jednotlivé TP sú znázornené na Obr. 31 – Obr. 33.

**Tab. 8.** Vzorce kalibračných kriviek pre jednotlivé TP.

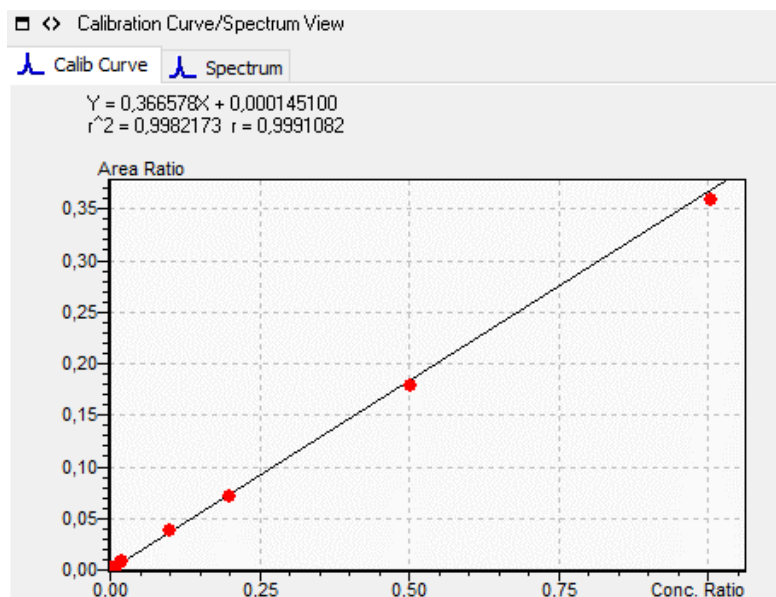
ANALYT	VZOREC KALIBRAČNEJ KRIVKY
ABZ	$y = 2,54152 x + 0,00137588$ $r^2 = 0,9866462$ $r = 0,9933007$
ABZSO	$y = 0,899239 x + 0,0006043999$ $r^2 = 0,9983148$ $r = 0,9991571$
ABZSO <sub>2</sub>	$y = 0,366578 x + 0,000145100$ $r^2 = 0,9982173$ $r = 0,9991082$



**Obr. 31.** Kalibračná krivka – ABZ



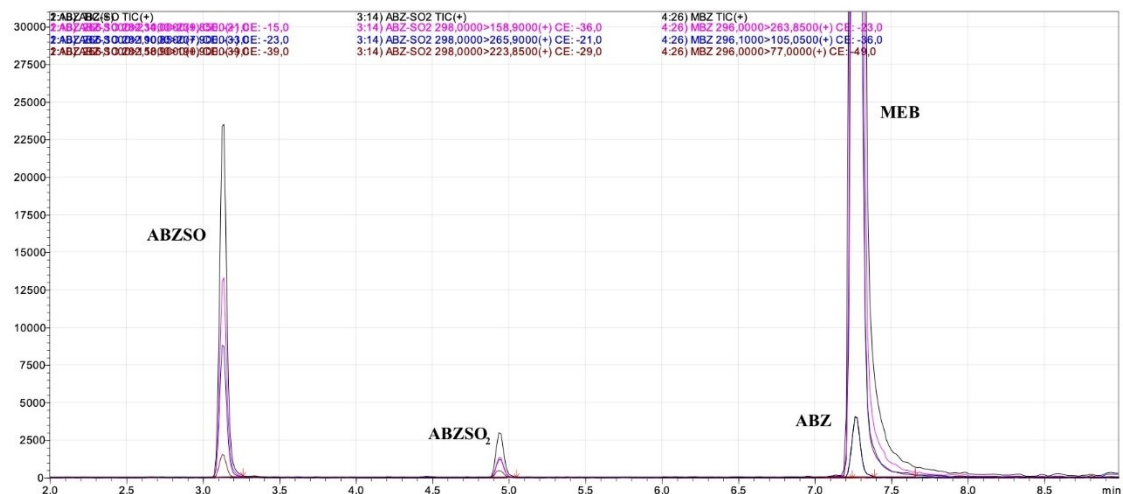
**Obr. 32.** Kalibračná krivka – ABZSO



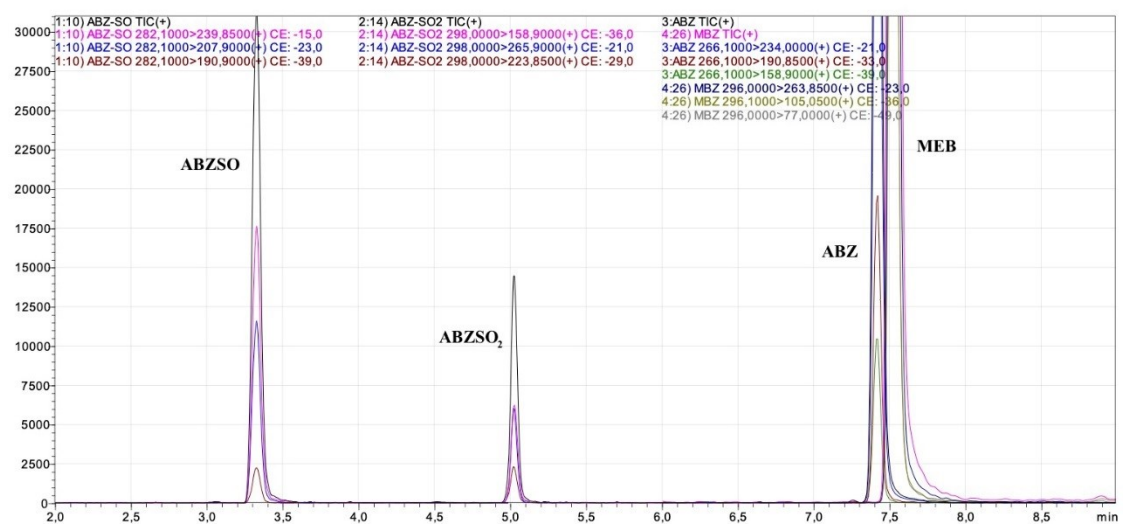
**Obr. 33.** Kalibračná krivka - ABZSO<sub>2</sub>

## Chromatogramy

Na Obr. 34 je znázornený SRM prechod reálnej vzorky pôdy s  $t_R$  sledovaných látok – ABZSO, ABZSO<sub>2</sub>, ABZ a IS. Na nasledujúcom chromatograme (vid' Obr. 35) sú znázornené namerané píky štandardných roztokov sledovaných zlúčenín v 5. bode kalibračnej krivky.



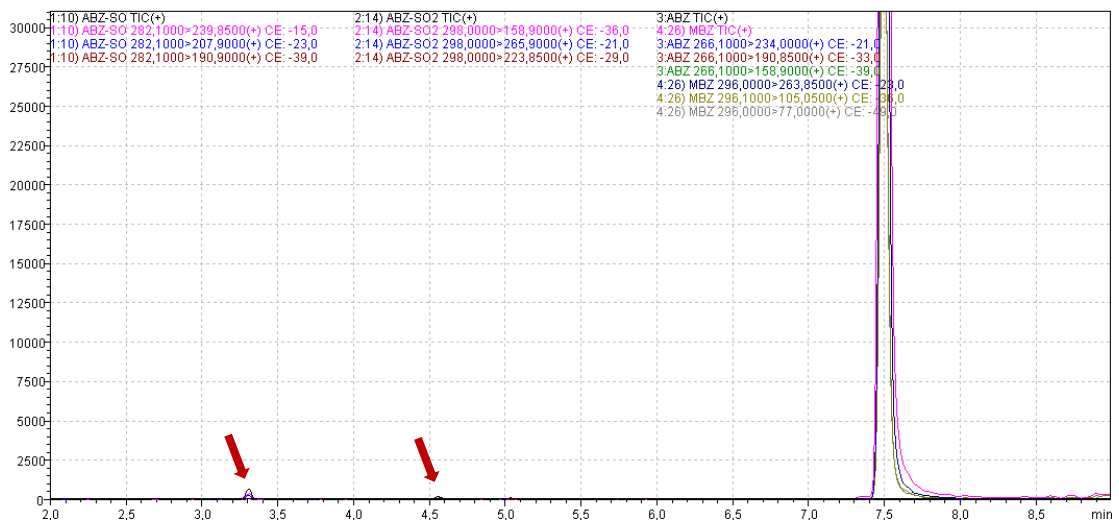
Obr. 34. SRM prechod sledovaných zlúčenín a IS.



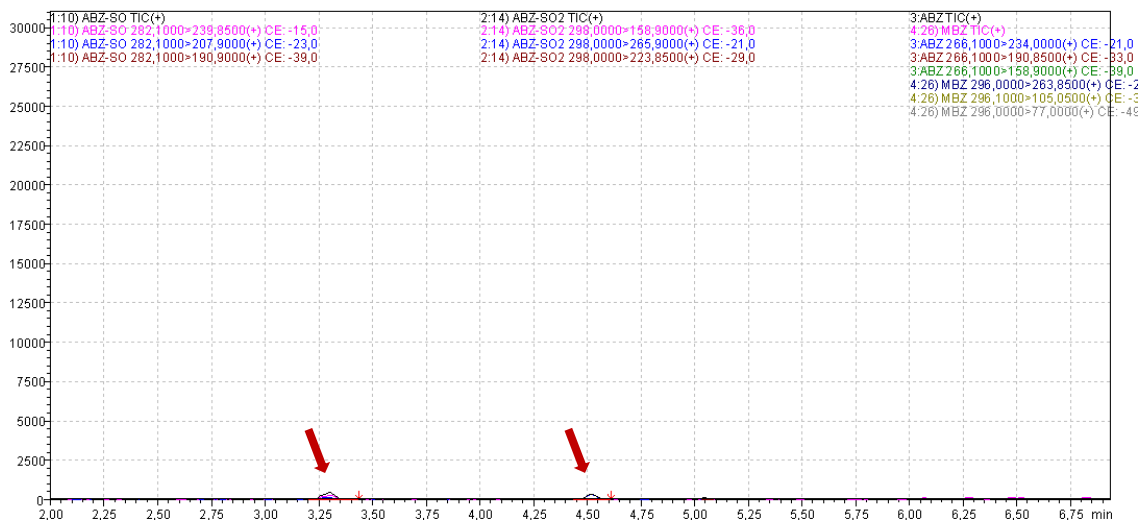
Obr. 35. Chromatogram štandardných roztokov sledovaných zlúčenín v 5. bode kalibračnej krivky.

Pomocou chromatografického prístroja UHPLC boli zmerané a vyhodnotené chromatogramy slepých vzoriek s použitím IS a bez IS, ktorým bol MEB. Slepé vzorky určené na kontrolu boli odpočítané od vzoriek pôdy.

Nízke píky sledovaných zlúčenín - ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> boli namerané aj v týchto kontrolných slepých vzorkách ako je znázornené na Obr. 36 a Obr. 37 na chromatografoch slepej vzorky s IS a bez IS.

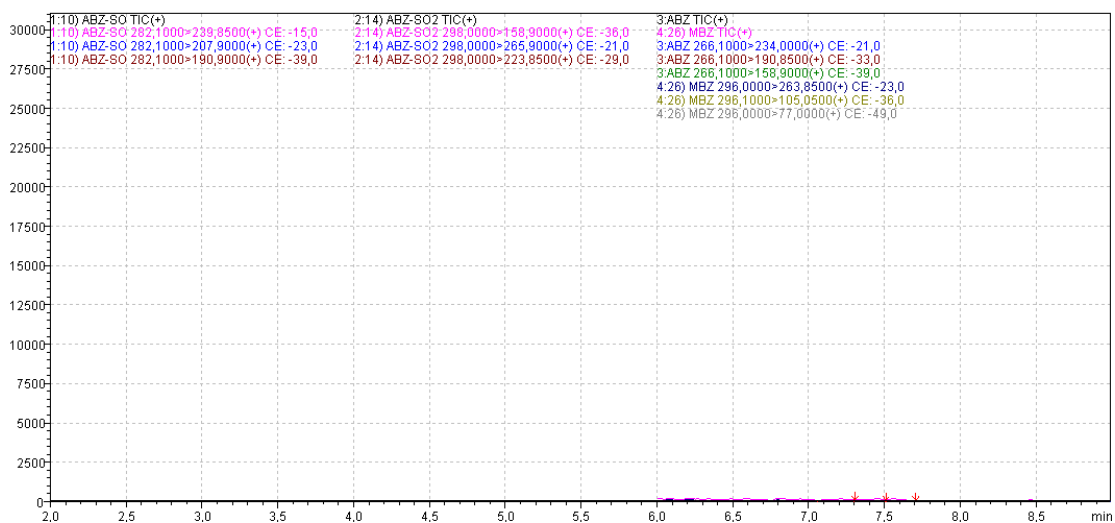


Obr. 36. Chromatogram slepej vzorky s IS.



Obr. 37. Chromatogram slepej vzorky bez IS.

Chromatogram zobrazujúci nástrek 10 µl MF (30 %ACN) je znázornený na Obr. 38.



Obr. 38. Chromatogram znázorňujúci nástrek 10 µl MF (30 %ACN).

## 8.2. Podmienky hmotnostného analyzátoru

Podmienky, ktoré boli použité na analýzu pomocou hmotnostného analyzátoru ako napríklad ESI +, použitie dusíka ako sušiaceho a nebulizačného plynu,  $t_R$ , hodnoty  $m/z$  iónov, či sledovanie vybraných reakcií pomocou SRM módu sú znázornené v Tab. 9 a Tab. 10.

Tab. 9. Použité podmienky hmotnostného analyzátoru.

PODMIENKY HMOTNOSTNÉHO ANALYZÁTORU	
Ionizácia	ESI v pozitívnom móde
Napätie na kapiláre	4,5 kV
Teplota	400 °C
Nebulizačný plyn	dusík
Prietok nebulizačného plynu	2,5 l/min.
Sušiaci plyn	dusík
Prietok sušiaceho plynu	12 l/min.
Kolízny plyn	argón
Režim	SRM

**Tab. 10.** Retenčný čas, molekulárna hmotnosť, molekulárny vzorec a vybrané produktové ióny analyzovaných zlúčenín.

zlúčenina	$t_R$ [min]	$m/z$ hodnoty iónov, $[M+H]^+$	molekulárny vzorec	Produktový ión $[M+H]^+$ , $m/z$ (kolízna energia [eV])
ABZSO	3,259	282,10	$C_{12}H_{15}N_3O_3S$	239,85 (-15), 207,90 (-23), 190,90 (-39)
ABZSO <sub>2</sub>	5,093	298,00	$C_{12}H_{15}N_3O_4S$	158,90 (-36), 265,90 (-21), 223,85 (-29)
ABZ	7,224	266,10	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	234,00 (-21), 190,85 (-33), 158,90 (-39)
MEB	7,426	269,00	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	263,85 (-23), 105,05 (-36), 77,00 (-49)

**Tab. 11.** Ďalšie parametre stanovené s pomocou UHPLC - MS/MS.

	Koncentrácia $\mu\text{g/ml}$	ABZ		ABZSO		ABZSO <sub>2</sub>	
		správnosť (%)	presnosť (%)	správnosť (%)	presnosť (%)	správnosť (%)	presnosť (%)
ULOQ	1,32650	99 ± 9	0.9	100 ± 4	1.5	100 ± 5	0.8
stredná QC (50 %)	0,66325	109 ± 4	0.5	98 ± 5	1.2	99 ± 3	2.5
stredná QC (30 %)	0,26530	111 ± 2	9.0	95 ± 3	1.4	117 ± 3	2.9
LLOQ	0,02653	125 ± 3	3.0	112 ± 4	6.0	59 ± 7	14.0

### 8.3. Validácia metódy

Validačné parametre dôležité pre validáciu metódy zahrňujúce linearitu, smernicu kalibračnej krivky, medzu detekcie („limit of detection“, LOD), medzu stanoviteľnosti („limit of quantification“, LOQ) a výťažnosť v % sú znázornené v Tab. 11. Najnižší bod kalibrácie v kalibračnom rozmedzí kalibračnej krivky, ktorým je dolná medza stanoviteľnosti („lower limit of quantification“, LLOQ) a najvyšší bod kalibračného rozmedzia akým je horná medza stanoviteľnosti („upper limit of quantification“, ULOQ) pre jednotlivé TP sú znázornené v Tab. 12.

**Tab. 12.** Validačné parametre pre vzorky pôdy analyzované s pomocou UHPLC - MS/MS.

ANALYT	ABZ	ABZSO	ABZSO <sub>2</sub>
rozsah linearity	0,0026 – 1,3260	0,0028 – 1,4065	0,0029 – 1,4865
smernica	2,5415	0,8992	0,3665
priesečník kalibračnej krivky na osi y	0,0014	0,0006	0,0001
korelačný koeficient ( $r^2$ )	0,9965	0,9996	0,9998
LOD $\mu\text{g/ml}$	0,0020	0,0020	0,0020
LOQ $\mu\text{g/ml}$	0,0026	0,0028	0,0029
výťažnosť (%)	45 – 93	87 – 112	47 – 54

## 9. VÝSLEDKY

Tato práca bola zameraná na monitorovanie rozšírenia ABZ a jeho TP - ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> z výkalov ošetrovaných oviec domácich v poľnohospodárskej pôde. Ovce boli ošetrované doporučenou dávkou ABZ (10 mg/kg živej hmotnosti). Sledovalo sa rozšírenie ABZ a jeho TP z rôznych gramáží (35 g a 105 g) ovčieho trusu do poľnohospodárskej pôdy v rôznej vzdialenosti (10 cm až 75 cm) a hĺbke (1. a 2. hĺbka) v priebehu 13 týždňov od aplikácie trusu.

Vo vzorkách pôdy v prvých dvoch vzdialenostiach – 10 cm a 25 cm od pohnojenej primárnej rastlinky boli vyhodnotené výsledné koncentrácie na základe vytvorených kalibračných kriviek. Zo získaných koncentrácií jednotlivých triplikátov vzoriek bol vypočítaný aritmetický priemer a smerodajná odchýlka  $\pm$  SD (n=3), ktoré sa prepočítali na  $\mu\text{g}/1 \text{ kg}$  pôdy.

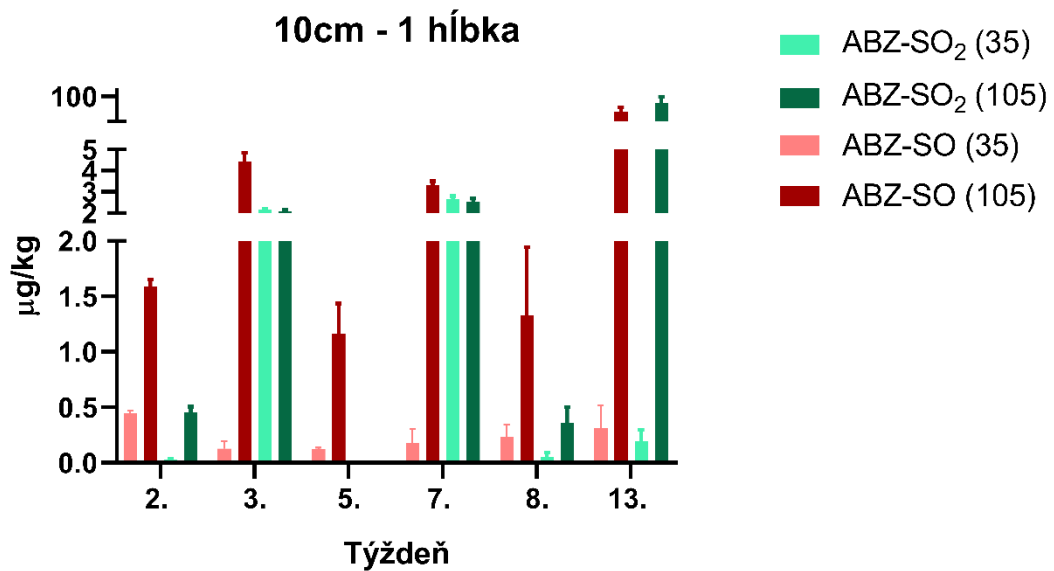
Vo vzorkách pôdy vo vyšších vzdialenostiach, kde množstvo ABZ a TP bolo pod limitom kvantifikácie, bolo vykonané semikvantitatívne vyhodnotenie (plocha píku sledovanej látky/ plocha píku IS). Namerané hodnoty ABZ sa na základe jeho relatívnych plôch pod píkom  $<$  LOD nevyhodnocovali.

Namerané plochy pod píkom analyzovaných vzoriek boli vyhodnotené pomocou analytického software – u LabSolution LC-MS verzia 5.93. Aritmetický priemer a smerodajná odchýlka získaných hodnôt sa vypočítala v aplikácii Microsoft Office – Excel. Získané výsledky sa graficky spracovali pomocou software - u: GraphPad Prism 8.

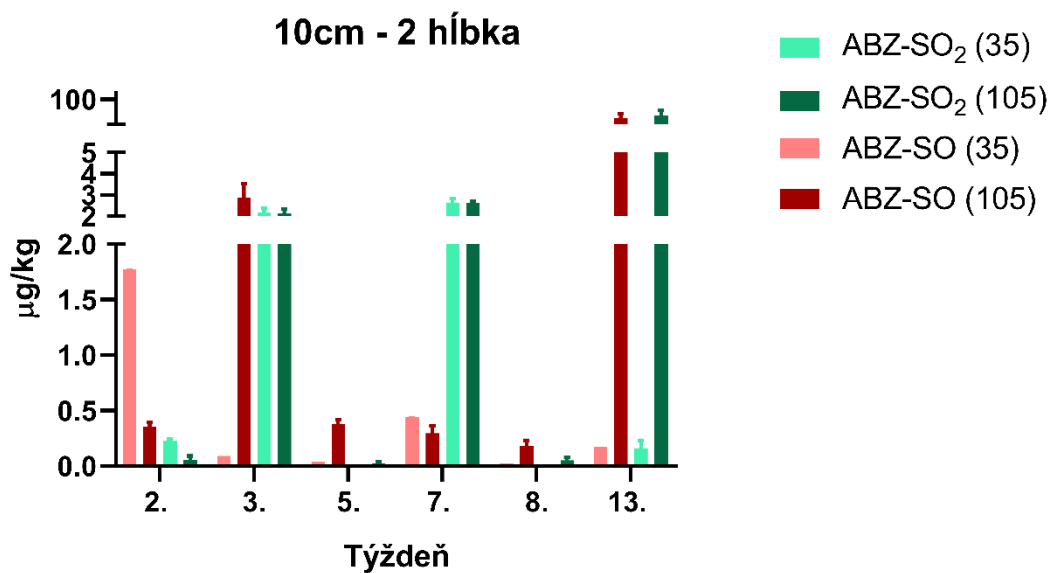
### 9.1. Kvantitatívne vyhodnotenie

Namerané koncentrácie TP v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  v závislosti od časového intervalu odberu vzoriek pôdy v priebehu 13. týždňoch sú graficky znázornené na Obr. 39 – Obr.42 . Po 2. týždňoch od aplikácie ovčieho trusu sa uskutočnil prvý odber vzoriek pôdy, ktorý sa uskutočnil začiatkom marca. Posledný odber vzoriek pôdy sa uskutočnil v 13. týždni od aplikácie ovčieho trusu, čo vychádzalo na koniec mája.





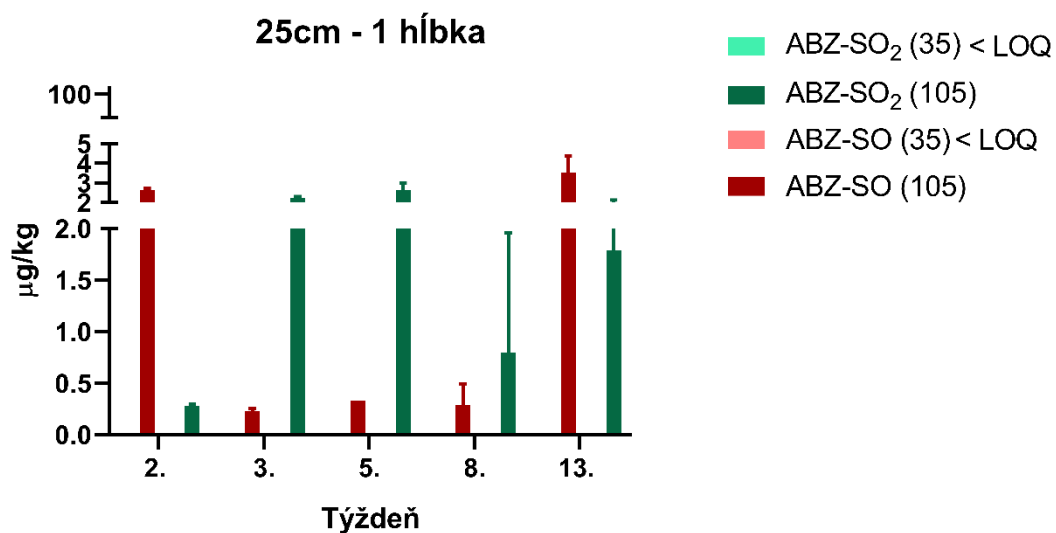
**Obr. 39.** Rozšírenie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.



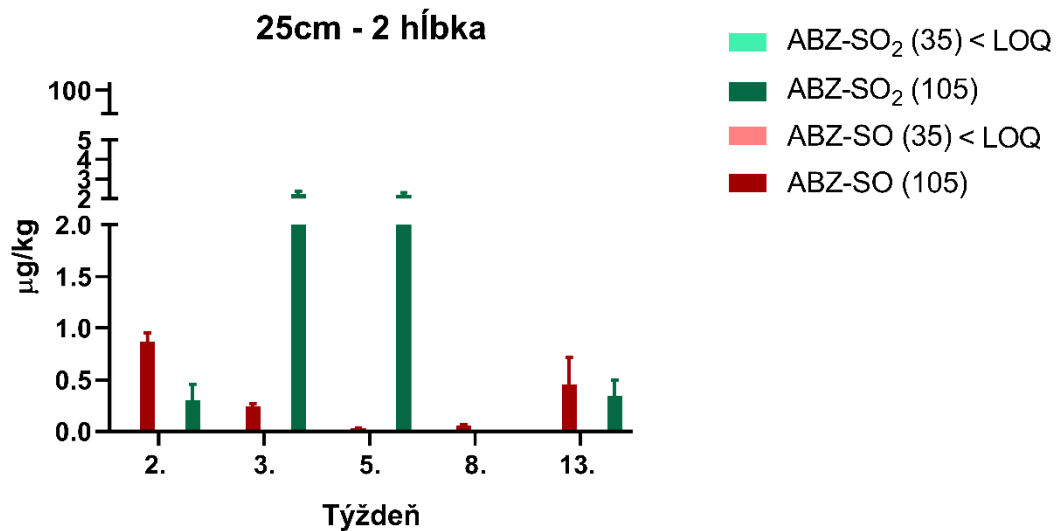
**Obr. 40.** Rozšírenie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

Namerané koncentrácie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> v analyzovanej pôde vzdialenej 10 cm od pohnojenej primárnej rastliny v dvoch rozdielnych množstvách ovčieho trusu (35 g a 105 g) a odobratej z 1. hĺbky zeminy sa pohybovali v rozmedzí od 0,031 do 78,57 µg/kg (viď Obr. 39). Koncentrácie ABZSO z pôdy pohnojenej 35 g trusu sa pohybovali od 0,1219 µg/kg v 5. týždni odberu až do 0,4492 µg/kg nameraných v 2. týždni. Pri stanovení ABZSO z pôdy pohnojenej 105 g ovčieho trusu boli namerané koncentrácie vyššie a to v rozmedzí od 1,1611 µg/kg v 5. týždni až do 51,0671 µg/kg v 13. týždni odberu. Koncentrácie TP zo 105 g ovčieho trusu v 1. sledovanej hĺbke boli najvyššie v poslednom meranom týždni.

Na Obr. 40 sú znázornené koncentrácie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> namerané v 10 cm a v 2. hĺbke od primárnej rastliny. Podobne ako aj v 1. (viď Obr. 39) tak aj v 2. hĺbke sa v 3. týždni namerali mierne zvýšené koncentrácie TP do < 5 µg/kg a v nasledujúcom sledovanom týždni namerané koncentrácie TP klesli <1,5 µg/kg.



**Obr. 41.** Rozšírenie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

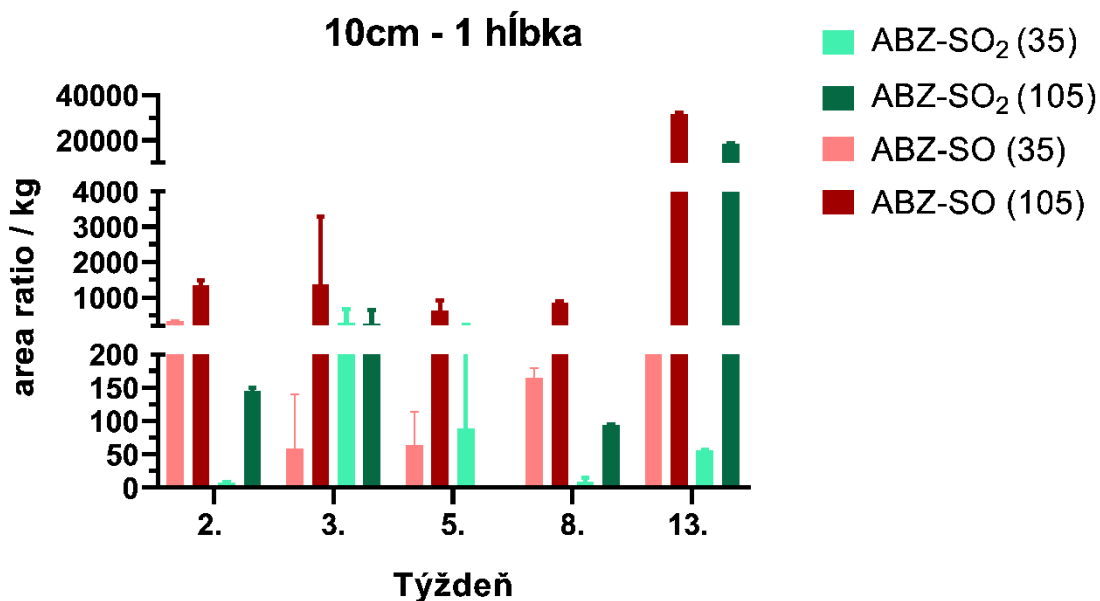


**Obr. 42.** Rozšírenie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

Vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastliny pohnojenej 105 g ovčieho trusu v 1. a 2. hĺbke sú namerané koncentrácie TP v µg/kg z pôdy ako je znázornené na Obr. 41 a Obr. 42. ABZSO sa adsorboval viac do 1. hĺbky, zatiaľ čo ABZSO<sub>2</sub> bol v 3. a 5. týždni odberu v oboch sledovaných hĺbkach takmer nezmenený. Koncentrácie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> namerané z pôdy pohnojenej 35 g ovčieho trusu boli < LOQ.

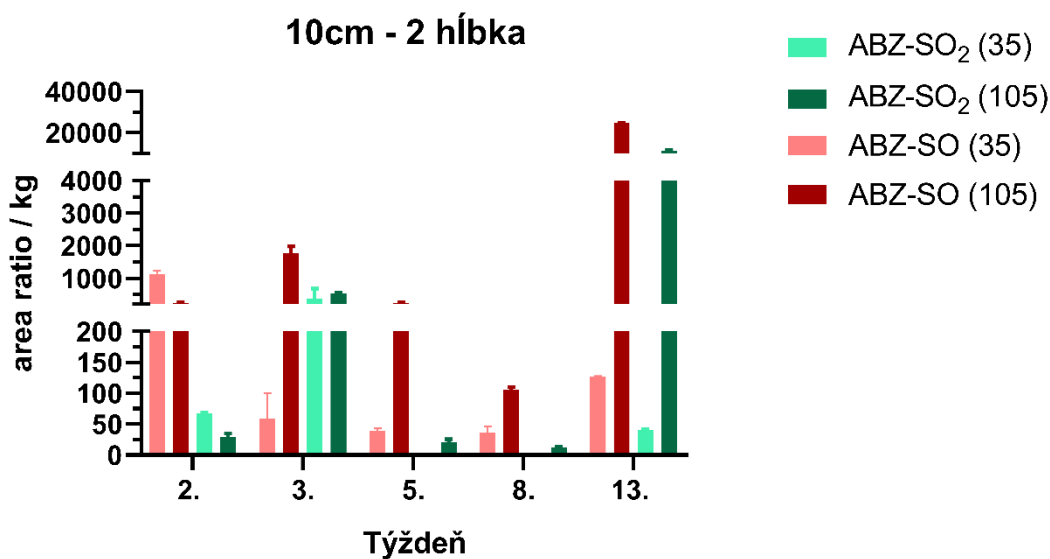
## 9.2. Semikvantitatívne vyhodnotenie

Relatívne množstvo TP nachádzajúcich sa v 1 kg pôdy v závislosti od časového intervalu odberu vzoriek pôdy v týždňoch sú graficky znázornené na Obr. 43 – Obr. 54. V tejto diplomovej práci boli semikvantitatívne vyhodnotené vzdialenosti 10 cm, 25 cm, 40 cm, 60 cm a 75 cm od aplikácie ovčieho trusu v poľnohospodárskej pôde.



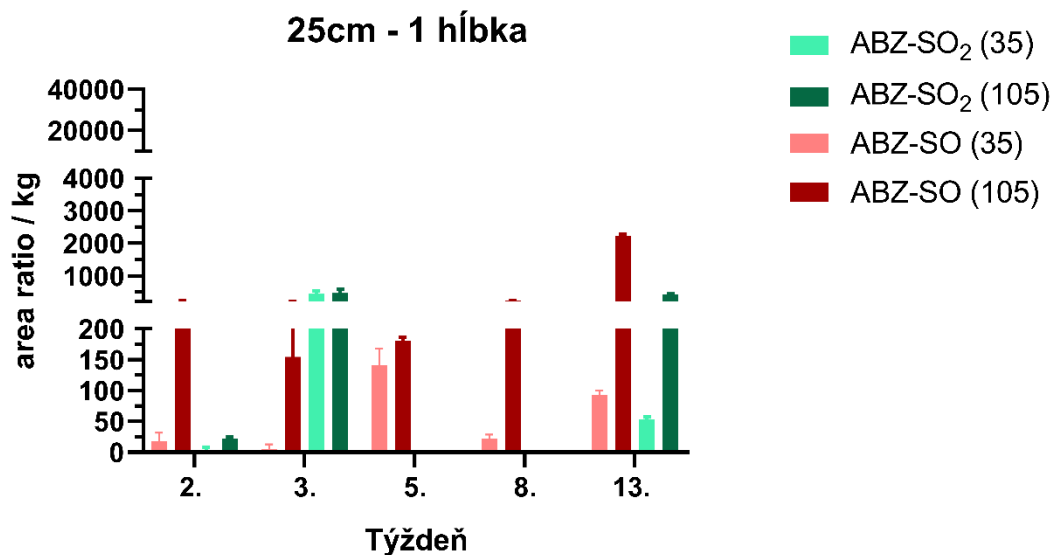
**Obr. 43.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkcom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

Na Obr. 43 sú znázornené výsledné plochy pod píkcom TP namerané v rozličných týždňoch odberu. Výsledky ukazujú, že hodnoty TP nameraných zo 105 g ovčieho trusu v poslednom 13. týždni výrazne stúpili až na ABZSO - 31785 area ratio/kg, ABZSO<sub>2</sub> 18368 area ratio/kg.



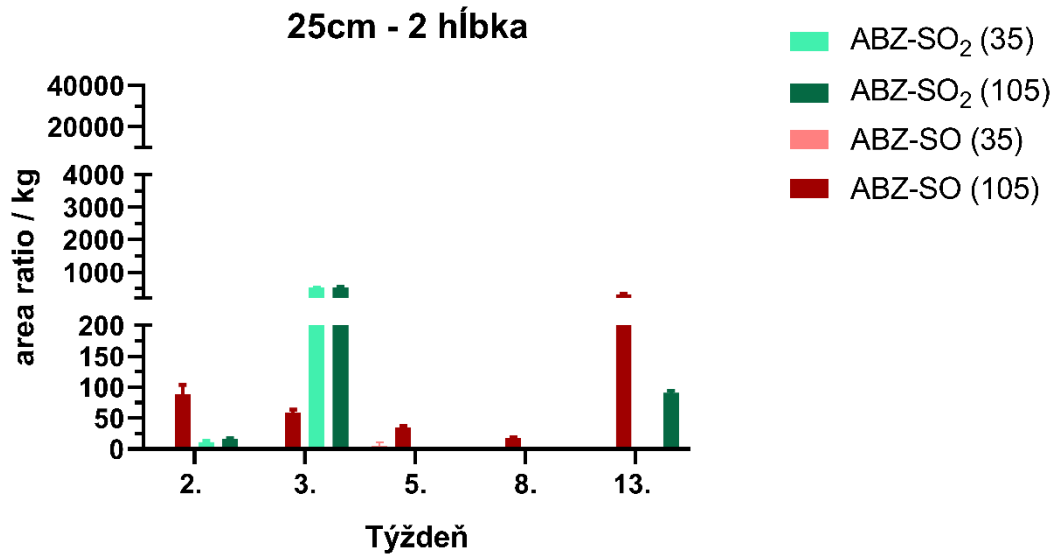
**Obr. 44.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkcom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

V druhých hĺbkach zobrazených na Obr. 44 sa namerané plochy pod píkom výrazne neodlišovali od 1. hĺbky. Prevládajú namerané hodnoty TP z pôdy pohnojenej 105 g ovčieho trusu.



**Obr. 45.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

V prvej hĺbke a vzdialenosti 25 cm od pohnojenej rastlinky namerané hodnoty area ratio/kg TP poklesli, kde najvyššiu plochu pod píkom mal ABZSO – 2215 area ratio/kg, v pôde pohnojenej 105 g trusu odobratej v poslednom týždni odberu (vid' Obr.45).

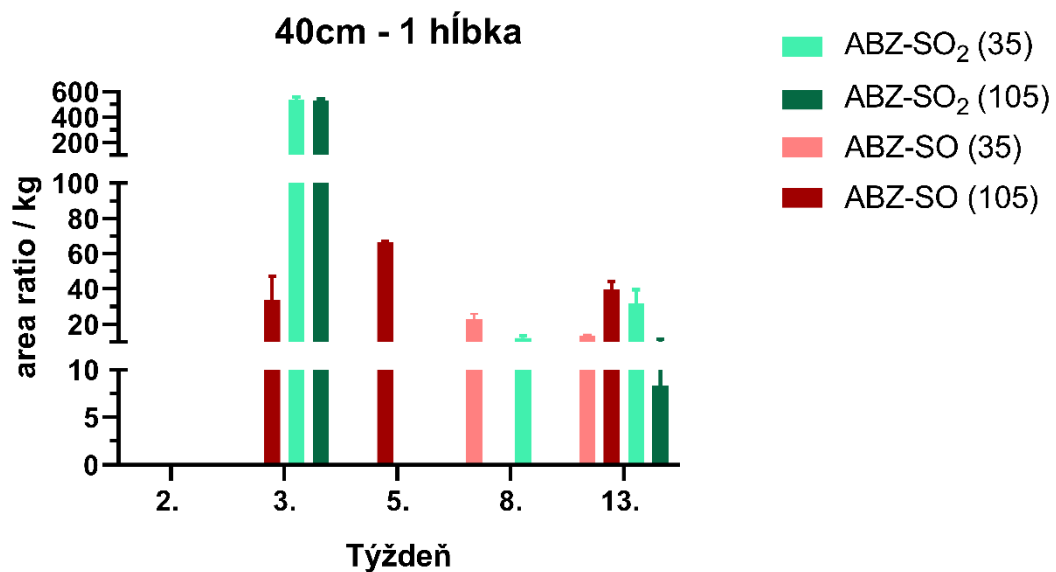


**Obr. 46.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkcom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

Na rozdiel od 1. hĺbky sa v 2. hĺbke na Obr. 46, pozoruje pokles nameraných area ratio/kg a to prevažne z pôdy pohnojenej 35 g trusu, kde najvýraznejšie hodnoty pozorujeme pri ABZSO<sub>2</sub> – 521 area ratio / kg v 3. týždni odberu.

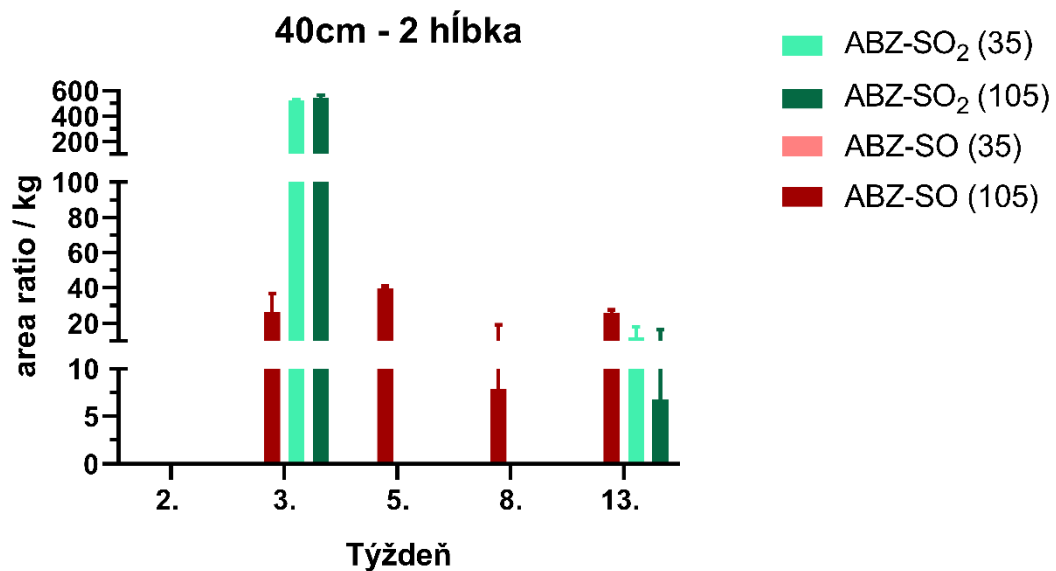
V ďalších vyhodnotených vzdialenostiach od 40 cm – 75 cm sa odbery vzoriek pôdy neuskutočnili v pravidelných časových intervaloch, ako tomu bolo v prípadoch vyššie. Predpokladalo sa, že množstvo TP z ovčieho trusu sa nebude do pôdy rozširovať do vyšších vzdialeností v tak krátkom časovom intervale. Preto sa odbery z vyšších vzdialeností uskutočňovali neskôr. Pre vzdialenosť 40 cm od aplikácie trusu na pole sa odbery začali odbery pôdy vykonávať až v 3. týždni po aplikácii trusu na pole. Pri vzdialenostiach 60 cm a 75 cm od pohnojenej rastlinky sa prvé odbery uskutočnili v 3. a 5. týždni od hnojenia pôdy trusom.

Vo vzdialenosti 40 cm od primárnej rastlinky pohnojenej ovčím trusom sa odobrali vzorky pôdy v pravidelných intervaloch okrem 2. týždňa od pohnojenia rastlín. Namerané hodnoty na Obr. 49 zobrazujú, že ABZSO<sub>2</sub> adsorbovaný zo 105 g trusu mal namerané výrazne vyššie 532 area ratio/kg v 3. týždni odberu ako v nasledujúcich odberoch, kedy jeho namerané hodnoty zo 105 g trusu klesli na 31 area ratio/kg.



**Obr. 47.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 40 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

Do druhej hĺbky ako je znázornené na Obr. 50 sa opäť dostali TP prevažne zo 105 g ovčieho trusu. V 5. a 8. týždni odberu sa ABZSO<sub>2</sub> nenameral. Ale zaujímavé je, že o pár dní neskôr (13. týždeň) sa jeho hodnoty namerali a to prevažne z pôdy pohnojenej 35 g ovčieho trusu, čo by mohlo mať súvis so zaznamenanými zrážkami v danom mesiaci a lepšou adsorpciou liečiva do pôdy.

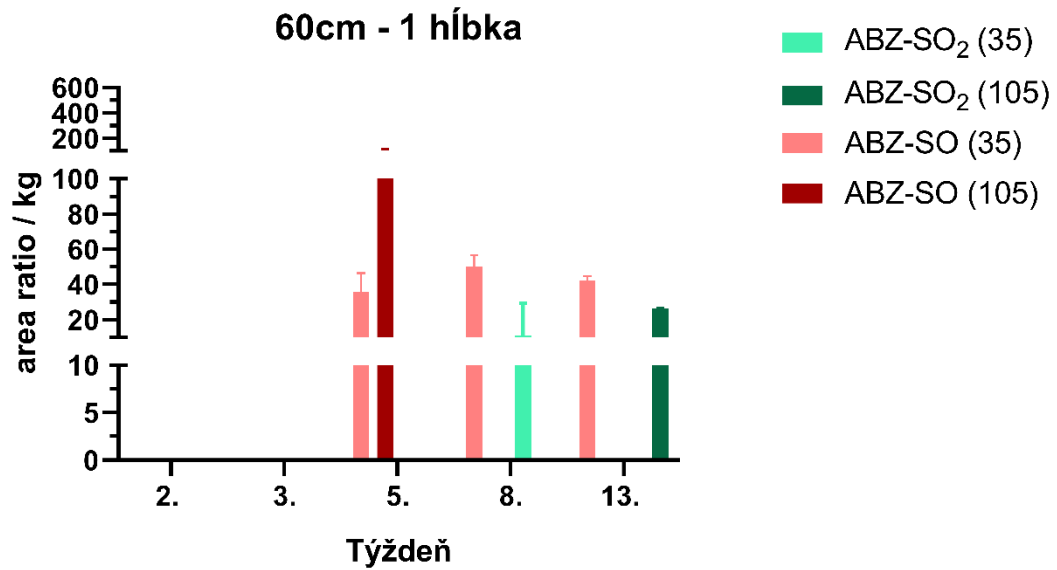


**Obr. 48.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkum prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 40 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

Vo vzdialenosti 60 cm od hnojenia primárnej rastlinky sa vykonali odbery vzoriek pôdy z oboch hĺbok okrem 2. a 3. týždňa, kvôli spomínanému predpokladu, že v daných týždňoch a vzdialenosti hodnoty TP nebudú šíriť.

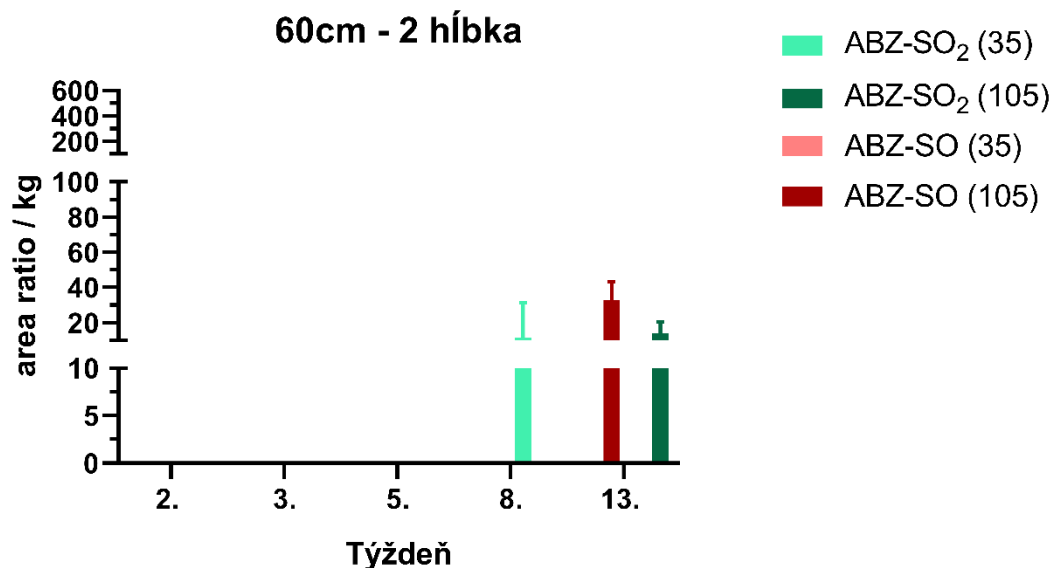
Na Obr. 51 je v porovnaní s predchádzajúcimi vzdialenosťami viditeľný mierny nárast ABZSO v 1 - hĺbke pôdy pohnojenej 35 g trusu v 5., 8. a 13. odberovom týždni vo vzdialenosti 60 cm.



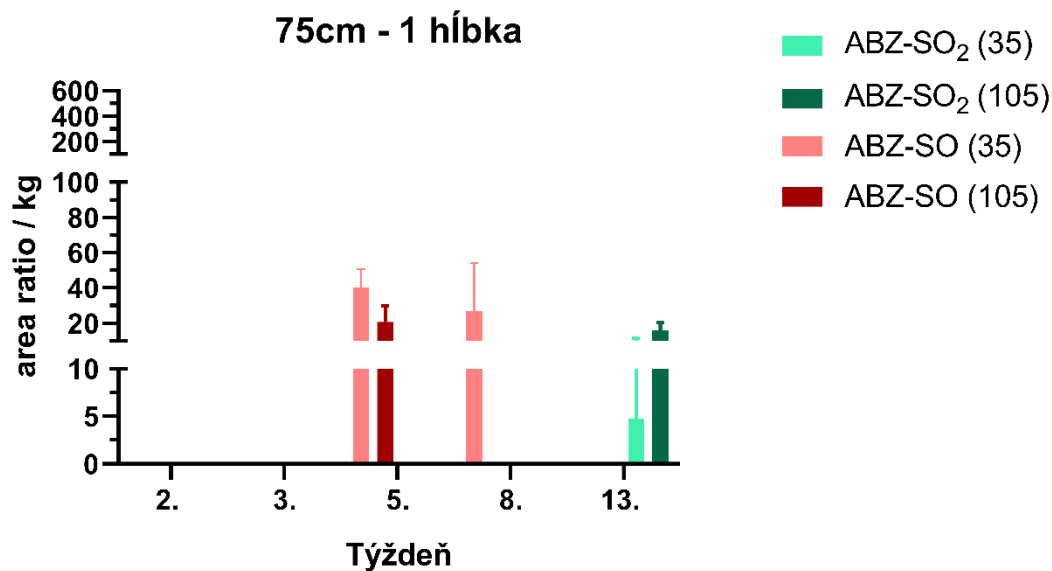


**Obr. 49.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkcom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 60 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

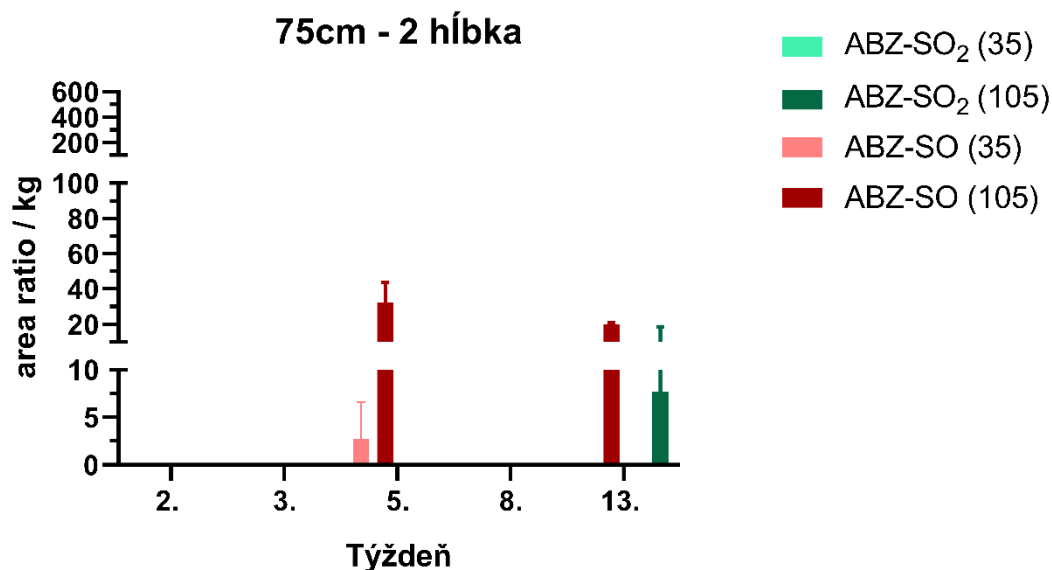
V druhej hĺbke pôdy odobratej vo vzdialenosti 60 cm od pohnojenej rastlinky sa v 5. týždni odberu TP nedetegovali. Na Obr. 52 je viditeľný pokles všetkých TP stanovených z pohnojenej pôdy. V 8. týždni sa stanovené hodnoty ABZSO z 35 g trusu nenachádzali na rozdiel od 1. hĺbky, čo znamená, že ostáva prevažne v 1. hĺbkach.



**Obr. 50.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkcom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 60 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.



**Obr. 51.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 75 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.



**Obr. 52.** Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 75 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.

V poslednej sledovanej vzdialenosti - 75 cm od pohnojenej primárnej rastlinky sa odbery vzoriek pôdy uskutočnili len v 5., 8. a 13. týždni. Na Obr. 53 je viditeľný pokles ABZSO nameraného v 5. týždni 20,67 area ratio/kg pôdy pohnojenej 105 g trusu v porovnaní s prvou hĺbkou vo vzdialenosti 60 cm od pohnojenej rastlinky ABZSO - 105 area ratio/kg pôdy (viď Obr. 51).

V druhej hĺbke pôdy vo vzdialenosti 75 cm od pohnojenej rastlinky boli namerané hodnoty jednotlivých TP < 32 area ratio/kg sledovanej pôdy ako je znázornené na Obr. 54. Z výsledkov vyplýva, že hodnoty TP sú vo vzdialenosti 75 cm nízke, ale stále detekovateľné.

## 10. DISKUSIA

V posledných rokoch narastajú obavy o životné prostredie, hlavne ak ide o používanie a vypúšťanie toxických látok, vrátane farmaceutík, do prostredia. Farmaceutické prípravky predstavujú významnú triedu znečisťujúcich látok vďaka svojej vysokej spotrebe po celom svete a vysokej účinnosti v nízkych koncentráciách [73, 74]. Najviac študované látky sú antibiotiká, steroidy, či lieky určené na liečbu rakoviny. Menšia pozornosť je venovaná antihelmintikám, ktoré sa využívajú na terapiu helmintóz u ľudí ale predovšetkým zvierat [75]. Benzimidazoly a makrocyclické laktóny sú najviac používanou skupinou antihelmintík v boji proti parazitickým červom. Správanie makrocyclických laktónov a ich efekt na životné prostredie bol popísaný v rozsiahlej štúdií Lumaret a kol. [76] s cieľom zhodnotiť súčasné poznatky o ich účinkoch na necieľové organizmy žijúce v suchozemskom a vodnom prostredí. Avšak detailné informácie o ekologickom dopade benzimidazolových antihelmintík nie sú dostatočne popísané [75, 76].

Hromadne využívané širokospektrálne benzimidazolové antihelmintikum - ABZ sa vďaka nízkej toxicite a vysokej účinnosti používa na terapiu helmintóz po celom svete. Jeho biotransformáciou v gastrointestinálnom trakte zvierat vznikajú dva hlavné metabolity – ABZSO a ABZSO<sub>2</sub>, ktoré sú vylučované stolicou a močom liečených zvierat. Práve prostredníctvom zvieracích exkrementov sa môže ABZ a jeho TP dostať do životného prostredia a ovplyvňovať tak menšie organizmy, predovšetkým bezstavovce a rastliny rastúce na hnojených pastvinách [21, 38, 5, 39]. Wang a kol. [77] sledovali účinok rôznych koncentrácií ABZ na rast, prežitie, reprodukciu a enzýmové aktivity dážd'ovky hnojnej. Pôsobením vyšších koncentrácií 10 mg/kg <sup>(-1)</sup> dosiahla úmrtnosť dážd'oviek 53 %, čím bola preukázaná priama toxicita ABZ pre živočíchy žijúce v pôde s potencionálnym ekologickým rizikom [77].

Správanie sa antihelmintík v pôde závisí od mnohých faktorov, ktoré zahŕňajú ich biodegradáciu, chemickú, fotochemickú a mikrobiálnu transformáciu, prchavosť, sorpciu, absorpciu rastlinami alebo organizmami či transport do podzemných vôd [78]. Biodegradácia farmaceutík a ich sorpčné a desorpčné procesy sú veľmi dôležité, pretože môžu ovplyvniť správanie chemikálii v životnom prostredí. Migrácia ABZ bola študovaná Mutavdžić Pavlović-om a spol. [74] v rôznych druhoch pôdy a riečnych sedimentoch na území Chorvátska. Táto štúdia preukázala, že afinita sorpcie ABZ je silne

ovplyvňovaná mnohými faktormi akými sú fyzikálno-chemické vlastnosti ABZ a vlastnosti sedimentu alebo pôdy. Výrazný vplyv na sorpciu ABZ majú iónové sily a pH. V porovnaní s inými farmaceutikami akými sú napríklad fluórchinolóny a tetracyklíny preukázal ABZ mierne silnú sorpciu v pôde, ale na rozdiel od sulfónamidov je jeho sorpcia v pôde silnejšia [74].

Trus so zvyškami benzimidazolových liečiv sa častokrát používa ako hnojivo a aplikuje sa na poľnohospodársku pôdu. Správanie ABZ a fenbendazolu z trusu ovce domácej sledoval aj Porto a spol. [79] v dvoch rôznych hĺbkach brazílskej pôdy – piesčitej a ílovitej pomocou metódy lúhovania v pôdnych stĺpcoch. V piesčitej pôde vykazovali sledované liečivá a najmä ich polárnejšie metabolity vyššiu pohyblivosť, čo viedlo k vylúhovaniu TP – predovšetkým ABZSO, až do 25 cm dĺžky pôdneho stĺpca. V ílovitej pôde sa obe liečivá zdržali v horných 10 cm pôdy. Ich nižšia pohyblivosť mohla byť spôsobená vyšším obsahom ílu a organických látok v matrici [79].

Osud benzimidazolov - flubendazolu a fenbendazolu v maštal'nom hnoji a pohnojovaných pôdach skúmal Kreuzig a kol. [80] v laboratórnych a poľných podmienkach. Výsledky ukázali, že rádioaktívne  $^{14}\text{C}$  značené benzimidazoly stanovené v testovacom hnoji mizli veľmi pomaly. Po inkubačnej dobe (102 dní) obsahovali extrakčné frakcie 72 % flubendazolu a 80 % fenbendazolu z pôvodnej rádioaktivity. Mobilita benzimidazolov v pohnojenej hlinitej a piesčitej pôde sa odlišovala.

Z vyššie opísaných štúdií vyplýva, že množstvo nameraných benzimidazolov sa mení v závislosti od ich rozpustnosti vo vode, počasia a environmentálnych podmienok (druh pôdy, teplota prostredia, miera sorpcie pôdy, obsah organických látok a pôdnych minerálov, pH pôdy, iónová sila) [78, 74, 79, 80].

Keďže tento experiment prebiehal v prirodzenom prostredí na experimentálnom poli, predpokladá sa, že mesačný úhrn územných zrážok, ktorý bol znázornený v Tab. 4 v kapitole 7., by mohol mať vplyv na namerané koncentrácie sledovaných TP.

V máji, kedy bol úhrn územných zrážok 67 mm, sa uskutočnil odber vzoriek, ktorý zodpovedá 13. týždňu. V tento mesiac oproti ostatným sledovaným mesiacom napadlo najviac územných zrážok v mm. Namerané koncentrácie TP v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sú v 13. týždni výrazne vyššie v prvých dvoch vzdialenostiach (10 cm a 25 cm) a 1. hĺbkach od aplikácie ovčieho trusu v porovnaní s nameranými koncentraciami TP v predchádzajúcich odberových týždňoch. Napadnuté zrážky by tak mohli mať vplyv na lepšiu penetráciu liečiva z trusu do pohnojenej pôdy. Ďalej sa pozoruje pokles nameraných koncentrácií TP vo vzdialenosti 10 cm a 5. týždni odberu, ktorý bol vykonaný v mesiaci apríl. Množstvo

napadnutých zrážok v tomto mesiaci bolo zo všetkých sledovaných mesiacov najmenšie – 17 mm. V porovnaní s celým rokom 2020 v apríli napadlo najmenej územných zrážok, čo značí, že bol najsuchší mesiac.

Sledovaním rozšírenia TP do dvoch rôznych hĺbok pôdy sa zistilo, že hodnoty TP boli detekované aj v hĺbke 1-5 cm (2. hĺbka). Podľa získaných výsledkov je zrejmé, že ABZSO sa najviac drží v povrchovej vrstve pôdy (1. hĺbka).

Namerané koncentrácie ABZ v ovčom truse, ktorý sa aplikoval na experimentálne pole boli nízke (viď Tab. 5), preto jeho množstvo v analyzovanej pôde bolo veľmi nízke až nedetekovateľné. Z toho dôvodu sa sledovali plochy pod píkom TP. Zo získaných výsledkov je zrejmé, že TP boli namerané prevažne v pôde pohnojenej 105 g ovčieho trusu.

Vzhľadom na známu perzistenciu benzimidazolov v hnoji [80], výsledky získané v tejto práci naznačujú, že ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> nachádzajúci sa vo vzorkách pôdy je stanovený aj v 13. týždni od aplikácie ovčieho trusu liečených zvierat na experimentálne pole a preto môže byť potenciálnym zdrojom dlhodobej kontaminácie pôdy.

Stanovenie rezíduí antihelmintík v životnom prostredí je dôležité a to hlavne kvôli rizikám, ktoré pre ekosystém predstavujú [73]. Preto by bolo vhodné, aby sa v budúcnosti uskutočnilo viac takýchto experimentov, ktoré sa zaoberajú účinkom antihelmintík na životné prostredie a objasnil sa ich možný negatívny dopad.

## 11. ZÁVER

Hlavným zameraním tejto diplomovej práce bolo monitorovanie koncentrácie ABZ, ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> v poľnohospodárskej pôde.

Zistením bolo:

1. Namerané koncentrácie ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> ukazovali celkovo vyššie koncentrácie v povrchovej vrstve pôdy (0-1 cm) a pôde pohnojenej väčším množstvom ovčieho trusu (105 g). Ďalej vo vzdialenostiach bližších k ovčiemu trusu (10 – 25 cm) boli namerané koncentrácie vyššie ako vo zvyšných meraných vzdialenostiach. ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> boli v pôde detegované aj v 13. týždni po aplikácii trusu
2. Pomocou LC-MS metódy s použitím IS boli vo vzorkách pôdy kvantifikované lebo semi-kvantifikované ABZSO a ABZSO<sub>2</sub>. ABZ bol pod limitom kvantifikácie. Kvantifikácia bola možná vo vzorkách zo vzdialenosti 10 a 25 cm od aplikácie ovčieho trusu. Vzorky z ďalších vzdialeností boli vyhodnotené na základe plochy pod píkom.

## ZOZNAM SKRATIEK

ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazol sulfoxid
ABZSO <sub>2</sub>	Albendazol sulfón
TP	Transformačné produkty
SFE	Superkritická fluidná extrakcia („supercritical fluid extraction“)
PP	Proteínová precipitácia („protein precipitation“)
LLE	Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny („liquid-liquid extraction“)
SPE	Extrakcia na tuhú fázu („solid phase extraction“)
SDME	Mikroextrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla
DLLME	Disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny
SPME	Mikroextrakcia na tuhú fázu
DPX	Mikroextrakcia s využitím špičiek
RAM	Materiály s obmedzeným prístupom
MIP	Molekulárne vtlačené polyméry
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitril
QuEChERS	Rýchla, ľahká, lacná, efektívna, odolná a bezpečná („quick, easy, cheap, effective, rugged and safe“)
PSA	Primárny sekundárny amín
GCB	Grafítizované sadze („graphitized carbon black“)
LC	Kvapalinová chromatografia („liquid chromatography“)
SF	Stacionárna fáza
MF	Mobilná fáza
DMSO	Dimetylsulfoxid
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high performance liquid chromatography“)
CG	Plynová chromatografia („gas chromatography“)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia („ultra-high performance liquid chromatography“)
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia („nuclear magnetic resonance“)
MS	Hmotnostný spektrometer („mass spectrometry“)



IS	Interný štandard („internal standard“, IS)
MEB	Mebendazol
SIM	Monitorovanie vybraného iónu („selected ion monitoring“)
SRM	Monitorovanie vybranej reakcie („selected reaction monitoring“)
MRM	Monitorovanie viacerých reakcií („multiple reaction monitoring“)
QqQ	Trojité kvadrupól
MS/MS	Tandemová hmotnostná spektrometria
LOD	Medza detekcie („limit of detection“)
LOQ	Medza stanoviteľnosti („limit of quantification“)
LLOQ	Dolná medza stanoviteľnosti („lower limit of quantification“)
ULOQ	Horná medza stanoviteľnosti („upper limit of quantification“)

## ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] „VetWell,“ 26 09 2019. [Online]. Available: <http://vetwell.sk/vnutorne-parazity-oviec-koz/>. [Cit. 05 12 2020].
- [2] C. L. Chitescu, A. I. Nicolau a A. A. M. Stolker, „Uptake of oxytetracycline, sulfamethoxazole and ketoconazole from fertilised soils by plants,“ *Food Additives & Contaminants: Part A*, zv. 30, 1. vyd.6, pp. 1138-1146, 2013.
- [3] M. D. Islam, G. Haberauer, A. Kist, N. M. Rathor, M. Gerzabek a A. Cannavan, „Multi-class determination of anthelmintics in soil and water by LC-MS/MS,“ *Food Additives & Contaminants: Part A*, zv. 30, 1. vyd.6, pp. 1128-1137, April 2013.
- [4] „Prologue: Veterinary Pharmaceuticals,“ rev. *Veterinary Medicine and Pharmaceuticals*, 2020.
- [5] J. Lamka a L. Ducháček, VETERINÁRNÍ LÉČIVA pro poslucháče farmacie, Praha: Karolinum, 2014.
- [6] „World Health Organization,“ 02 03 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>. [Cit. 06 12 2020].
- [7] J. Hartl, M. Doležal, M. Miletín, V. Opletalová a P. Zimčák, FARMACEUTICKÁ CHEMIE IV., Praha: Karolinum, 2012, p. 168.
- [8] R. G. Mali a A. A. Mehta, „A review on Anthelmintic Plants,“ *Natural Product Radiance*, zv. 5, 1. vyd.7, pp. 466-475, 2007.
- [9] R. Wang, Y. Ding, R. Liu, L. Xiang a L. Du, „Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics,“ *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology*, zv. 3, 1. vyd.4, pp. 77-87, 2010.
- [10] J. Jíra, Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci, Praha: Galén, 1998, p. 496.
- [11] B. Havránková, „Anthelmintiká v humánní medicíně,“ Hradec Králové, 2016. [Online]. Available: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/156621/>. [Cit. 08 11 2020].

- [12] „National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5798, Benzimidazole,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzimidazole>. [Cit. 11 11 2020].
- [13] A. Borovanský a J. Csöllei, Farmaceutická chemie (farmakochemie) IV. Léčiva s účinkem antiinfekčním a antiparazitárním (2.část), Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2003, p. 135.
- [14] „National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 5430, Thiabendazole,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiabendazole>. [Cit. 19 11 2020].
- [15] R. Thelingwani, S. P. Zvada, H. Dolgos a A.-L. Ungell, „In Vitro and in Silico Identification and Characterization of Thiabendazole as a Mechanism-Based Inhibitor of CYP1A2 and Simulation of Possible Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions,“ *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, zv. 37, 1. vyd.6, pp. 1286-94, 2009.
- [16] J. Feng, H. Yaxi, E. Grant a X. Lu, „Determination of thiabendazole in orange juice using an MISPE-SERS chemosensor,“ *Food Chemistry*, 1. vyd.239, pp. 816-822, 2018.
- [17] „National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 2082, Albendazole,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Albendazole>. [Cit. 03 11 2020].
- [18] A. D. Dayan, „Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics,“ *Acta Tropica*, Zv. 1 z 22-3, 1. vyd.86, pp. 141-159, 2003.
- [19] M. Danaher, H. D. Ruyck, S. R. Crooks, G. Dowling a M. O’Keffe, „Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices,“ *Journal of Chromatography B*, zv. 1, 1. vyd.845, pp. 1-37, 2007.
- [20] S. R. Bhargava a B. P. Chatterji, „Emergence of Tubulin as a Vaccine against Parasitic Infections,“ *Intellectual Properties Rights: Open Access*, zv. 2, 1. vyd.4, pp. 1-7, 2014.

- [21] L. Prchal, R. Podlipná, J. Lamka a et al., „Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination,“ 1. vyd.23, p. 13015–13022, 2016.
- [22] J. Velík, V. Baliharová, J. Fink-Gremmels, S. Bull, J. Lamka a L. Skálová, „Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes,“ *Research in Veterinary Science*, zv. 2, 1. vyd.76, pp. 95-108, 2004.
- [23] A. Horvat, S. Babic, D. Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko a M. Kašterlan-Macan, „Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment,“ *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1. vyd.31, January 2012.
- [24] L. Skálová, V. Křížová, V. Cvilink, B. Szotáková, J. Štorkánová, J. Velík a J. Lamka, „Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver,“ *Veterinary Parasitology*, Zv. 1 z 23-4, 1. vyd.146, pp. 254-262, 2007.
- [25] D. Aksit, S. Yalinkilinc, S. Sekkin a et. al., „Comparative pharmacokinetics and bioavailability of albendazole sulfoxide in sheep and goats, and dose-dependent plasma disposition in goats,“ *BMC Veterinary Research*, zv. 11, 1. vyd.124, p. 11, 2015.
- [26] A. R. Dey, N. Begum a et. al, „Multiple anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of small ruminants in Bangladesh,“ *Parasitology International*, 1. vyd.77, 2020.
- [27] M. Zajíčková, L. T. Nguyen, L. Skálová, L. Raisová Stuchlíková a P. Matoušková, „Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes,“ *Drug Discovery Today*, zv. 2, 1. vyd.25, pp. 430-437, February 2020.
- [28] F. Roeber, A. R. Jex a R. B. Gasser, „Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective,“ *Parasites & Vectors*, zv. 6, 1. vyd.153, 2013.
- [29] H. A. Shalaby, „Anthelmintics Resistance; How to Overcome it?,“ *Iranian Journal of Parasitology*, zv. 8, 1. vyd.1, pp. 18-32, 2013.

- [30] A. C. Kotze a R. K. Prichard, „Chapter Nine - Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis,“ *Advances in Parasitology*, 1. vyd.23, pp. 397-428, 2016.
- [31] C. G. Coles, F. Jackson, E. W. Pomroy, K. R. Prichard a et. al., „The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance,“ *Veterinary Parasitology*, Zv. 1 z 23-4, 1. vyd.136, pp. 167-185, 2006.
- [32] P. Baltrušis, P. Halvarsson a J. Höglund, „Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR,“ *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 1. vyd.8, pp. 411-419, 2018.
- [33] R. Prichard, „Anthelmintic resistance,“ *Veterinary Parasitology*, 1. vyd.54, pp. 259-268, 1994.
- [34] S. Athanasiadou, J. Githiori a I. Kyriazakis, „Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction,“ *Animal*, zv. 1, 1. vyd.9, pp. 1392-1400, 2007.
- [35] J. F. S. Ferreira, „Artemisia species in small ruminant production: their potential antioxidant and anthelmintic effects,“ January 2009. [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/44450860\\_Artemisia\\_species\\_in\\_small\\_ruminant\\_production\\_their\\_potential\\_antioxidant\\_and\\_anthelmintic\\_effects](https://www.researchgate.net/publication/44450860_Artemisia_species_in_small_ruminant_production_their_potential_antioxidant_and_anthelmintic_effects). [Cit. 03 03 2021].
- [36] F. Nouri, S. R. Nourollahi-Fard, H. R. Foroodi a H. Sharifi, „In vitro anthelmintic effect of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) extract on parasitic nematode, *Marshallagia marshalli*,“ *Journal of Parasitic Diseases*, zv. 40, 1. vyd.3, pp. 643-647, 2016.
- [37] O. Enejoh a M. Suleiman, „Anthelmintics and their Application in Veterinary Medicine,“ *Res Med Eng Sci.*, 1. vyd.2, pp. 117-126, 2017.
- [38] L. Raisová Stuchlíková, P. Jakubec, L. Langhansová, R. Podlipná, M. Navrátilová, B. Szotáková a L. Skálová, „The uptake, effects and biotransformation of monepantel in meadow plants used as a livestock feed,“ *Chemosphere*, 1. vyd.237, December 2019.
- [39] M. Díaz-Cruz, M. J. López de Alda a D. Barceló, „Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge,“ *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, zv. 22, 1. vyd.6, pp. 340-351, June 2003.

- [40] L. Stuchlíková Raisová, M. Navrátilová, L. Langhansová, K. Mořková a R. Podlipná, „The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (*Medicago sativa*)“, *International Journal of Molecular Sciences*, zv. 21, 1. vyd.16, 2020.
- [41] L. Skálová, I. Boušová a kolektiv, *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Praha: Karolinum: Univerzita Karlova v Praze, 2011.
- [42] P. Heneberg, P. Bogusch, A. Astapenková a M. Řezáč, „Neonicotinoid insecticides hinder the pupation and metamorphosis into adults in a crabronid wasp“, *Scientific Reports*, 1. vyd.10, 2020.
- [43] L. Nováková, „Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis“, *Journal of Chromatography A*, zv. 1292, pp. 25-37, 31 May 2013.
- [44] L. Nováková a M. a. k. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, 2013, p. 235.
- [45] P. Houghton a A. Raman, *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*, Boston: MA: Springer US, 1998.
- [46] N. Treder, T. Bączek, K. Wychodnik, J. Rogowska, L. Wolska a A. Pleni, „The Influence of Ionic Liquids on the Effectiveness of Analytical Methods Used in the Monitoring of Human and Veterinary Pharmaceuticals in Biological and Environmental Samples—Trends and Perspectives“, *Molecules*, zv. 25, 1. vyd.2, p. 286, 2020.
- [47] R. E. Majors, „Sample preparation fundamentals for chromatography“, Agilent Technologies, Canada, 2013.
- [48] J. F. Huertas-Pérez, N. Arroyo-Manzanares, A. M. García-Campaña a L. Gámiz-Gracia, „Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review“, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, zv. 57, 1. vyd.16, pp. 3405-3420, 2017.
- [49] D. Sadutto a Y. Picó, „Sample Preparation to Determine Pharmaceutical and Personal Care Products in an All-Water Matrix: Solid Phase Extraction“, *Molecules*, zv. 25, 1. vyd.21, p. 5204, 2020.
- [50] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher a F. J. Schenck, „Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and

- “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce,” *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, zv. 2, 1. vyd.86, pp. 412-431, 2003.
- [51] „QuEChERS,“ 2011. [Online]. Available: <https://www.quechers.com/index.php?nav1o=2&nav2o=1&nav3o=0>. [Cit. 2021 04 16].
- [52] C. Díez, W. Traag, P. Zommer, P. Marinero a e. al., „Comparison of An Acetonitrile Extraction/partitioning and “Dispersive Solid-phase Extraction” Method with Classical Multiresidue Methods for the Extraction of Herbicide Residues in Barley Samples,“ *Journal of Chromatography A*, zv. 1131, 1. vyd.1-2, pp. 11-23, 2006.
- [53] „MERCK - QuEChERS Method for Pesticide Residue Analysis,“ [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/solid-phase-extraction/quechers-method-pesticide-residue-analysis.html>. [Cit. 17 04 2021].
- [54] M. González-Curbelo, B. Socas-Rodríguez, A. Herrera-Herrera a et al., „Evolution and applications of the QuEChERS method,“ *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1. vyd.71, pp. 169-185, September 2015.
- [55] R. E. Majors, M. Anastassiades a S. J. Lehotay, „The QuEChERS Revolution,“ *LCGC Asia Pacific*, zv. 13, 1. vyd.4, pp. 30-36, 2010.
- [56] „QuEChERS PROCEDURE FOR MULTI-RESIDUE PESTICIDE ANALYSIS - DisQuE Dispersive Sample Preparation,“ 2011. [Online]. Available: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003643en.pdf>. [Cit. 15 04 2021].
- [57] L. Nováková, M. Douša a kolektiv, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 2013, p. 300.
- [58] Y. V. Kazakevich a R. LoBrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, 2007, p. 1136.
- [59] „Ultra High Performance Liquid Chromatography,“ EAG Laboratories, [Online]. Available: <https://www.eag.com/techniques/chromatography/ultra-high-performance-liquid-chromatography-uhplc/>. [Cit. 20 04 2021].

- [60] B. Behnoush, A. Sheikhzadi, E. Bazmi, A. Fattahi a et. al., „Comparison of UHPLC and HPLC in Benzodiazepines Analysis of Postmortem Samples,“ *Medicine (Baltimore)*, zv. 94, 1. vyd.14, April 2015.
- [61] J. Klimeš a a kol., *Kontrola léčiv*, Praha: Karolinum, 2007, p. 149.
- [62] Český lékopis (ČL 2009), Praha: Grada v poverení Ministerstva zdravotnictví, 2009.
- [63] L. R. Snyder, J. J. Kirkland a J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd Edition, Hoboken: John Wiley & Sons, 2009, p. 960.
- [64] „European Medicines Agency Science Medicines Health,“ 2019.
- [65] H. Gu, G. Liu, J. Wang, A.-F. Aubry a M. E. Arnold, „Selecting the Correct Weighting Factors for Linear and Quadratic Calibration Curves with Least-Squares Regression Algorithm in Bioanal. LC-MS/MS Assays and Impacts of Using Incorrect Weighting Factors on Curve Stability, Data Quality and Assay Performance,“ *Analytical chemistry*, 1. vyd.86, p. 8959–8966, 2014.
- [66] „National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 4030, Mebendazole,“ [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole#section=Structure>. [Cit. 21 04 2021].
- [67] D. Friedecký a K. Lemr, „Úvod do hmotnostní spektrometrie,“ *Klin. Biochem. Metab.*, zv. 20, 1. vyd.41, pp. 152-157, 2012.
- [68] E. de Hoffmann a V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Third Edition, England: John Wiley & Sons Ltd, 2007, p. 502.
- [69] S. H. Hansen a S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2015, p. 336.
- [70] J. J. Pitt, „Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry,“ *The Clinical Biochemist Reviews*, zv. 30, 1. vyd.1, pp. 19-34, 2009.
- [71] „Český hydrometeorologický ústav,“ [Online]. Available: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-srazky#>. [Cit. 2021 04 12].



- [72] „LABORATORNÍ POSTUPY PŘI ZJIŠŤOVÁNÍ PŮDNÍCH VLASTNOSTÍ – ANALÝZY PROVÁDĚNÉ V RÁMCI PEDOLOGICKÉHO PRAKTIKA,“ [Online]. Available: [http://ldf.mendelu.cz/ugp/wp-content/uploads/2015/02/laborator\\_postupy.pdf](http://ldf.mendelu.cz/ugp/wp-content/uploads/2015/02/laborator_postupy.pdf). [Cit. 15 04 2021].
- [73] S. H. G. Brondi, A. N. de Macedo, G. H. L. Vicente a A. R. A. Nogueira, „Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment,“ *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1. vyd.86, pp. 18-22, 2011.
- [74] D. Mutavdžić Pavlović, A. Glavač, M. Gluhak a M. Runje, „Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics,“ *Chemosphere*, 1. vyd.193, pp. 635-644, February 2018.
- [75] P. M. J. Fisher a R. Scott, „Evaluating and controlling pharmaceutical emissions from dairy farms: a critical first step in developing a preventative management approach,“ *Journal of Cleaner Production*, zv. 16, 1. vyd.14, pp. 1437-1446, September 2008.
- [76] . J.-P. Lumaret, F. Errouissi, K. Floate, J. Rombke a K. Wardhaugh, „A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments,“ *Current Pharmaceutical Biotechnology*, zv. 13, 1. vyd.6, pp. 1004 - 1060, 2012.
- [77] Y. Wang, Y. Tang, X. LL a D. XP, „Ecotoxicological effects of albendazole on *Eisenia fetida*,“ *The Journal of Applied Ecology*, zv. 20, 1. vyd.9, pp. 2296-2300, 2009.
- [78] A. C. Chiaia-Hernandez, A. Keller, D. Wächter, C. Steinlin a et. al., „Long-Term Persistence of Pesticides and TPs in Archived Agricultural Soil Samples and Comparison with Pesticide Application,“ *Environmental Science & Technology*, zv. 51, 1. vyd.18, pp. 10642-10651, 2017.
- [79] R. S. Porto, R. S. B. Pinheiro a S. Rath, „Leaching of benzimidazole antiparasitics in soil columns and in soil columns amended with sheep excreta,“ *Environmental Science and Pollution Research*, 2020.

- [80] R. Kreuzig, K. Blümlein a S. Höltge, „Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole in Manure and Manured Soils,“ *Clean*, zv. 35, 1. vyd.5, pp. 488-494, 2007.
- [81] L. Y. T. Li, D. A. Campbell, P. K. Bennet a J. Henion, „Acceptance Criteria for Ultratrace HPLC–Tandem Mass Spectrometry: Quantitative and Qualitative Determination of Sulfonylurea Herbicides in Soil,“ *Anal. Chem.*, zv. 68, 1. vyd.19, pp. 3397-3404, 1996.

## ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obr. 1.</b> Chemická štruktúra Benzimidazolu upravená v Chemdraw podľa [12].	10
<b>Obr. 2.</b> Metabolizmus tiabendazolu upravený v Chemdraw podľa [15].	12
<b>Obr. 3.</b> Chemická štruktúra ABZ upravená v Chemdraw podľa [17].	13
<b>Obr. 4.</b> Biotransformácia ABZ upravené [21].	14
<b>Obr. 5.</b> Princíp LLE s použitím organického rozpúšťadla – chloroform, upravený podľa [44].	22
<b>Obr. 6.</b> Postup SPE: kondicionovanie kolónky (1), nanosenie vzorky na kolónku (2), premytie a vymytie balastných látok (3), vysušenie kolónky (4) a elúcia analytov do vialky. Obrázok upravený podľa [44].	23
<b>Obr. 7.</b> Postup analýzy vzorky metódou QuEChERS upravené podľa [39].	27
<b>Obr. 8.</b> Separácia dvoch analyzovaných látok A, B zo vzorky v chromatografickom systéme upravené podľa [57].	29
<b>Obr. 9.</b> Kvantitatívne a kvalitatívne hodnotenie separovaných látok. $t_R$ – elučný čas separovanej látky, $t_0$ – elučný čas nezadržovanej zložky (mŕtvy elučný čas), A – plocha píku, h – výška píku. Na osi y je znázornená odozva UV detektoru v jednotkách mAU. Obrázok bol prevzatý od [57].	30
<b>Obr. 10.</b> Kalibračná krivka s vyjadrením závislosti plochy píku na koncentrácii analytu upravené podľa [44].	32
<b>Obr. 11.</b> Metóda vnútorného štandardu s využitím kalibračnej krivky upravené podľa [44].	34
<b>Obr. 12.</b> Chemická štruktúra MEB upravená v Chemdraw podľa [66].	35
<b>Obr. 13.</b> Sken produktových iónov. Obrázok prevzatý od [67].	35
<b>Obr. 14.</b> Sken prekurzorových iónov. Obrázok prevzatý od [67].	36
<b>Obr. 15.</b> Sken neutrálnych strát. Obrázok prevzatý od [67].	36
<b>Obr. 16.</b> Monitorovanie vybranej reakcie - SRM. Obrázok prevzatý od [67].	37
<b>Obr. 17.</b> Aplikácia ovčieho trusu na experimentálne pole.	44
<b>Obr. 18.</b> Grafické znázornenie odberu vzoriek pôdy z jednotlivých vzdialeností od aplikácie ovčieho trusu k primárnej rastline.	46
<b>Obr. 19.</b> Jednotlivé hĺbky odberu vzoriek poľnohospodárskej pôdy a cirkulácia parentnej látky, jej metabolitov vytvorených rastlinou alebo ovcou domácou z trusu liečených zvierat.	47
<b>Obr. 20.</b> Výpočet obsahu vlhkosti v pôde upravené podľa [72].	47
<b>Obr. 21.</b> Váženie vzorky pôdy na analytických váhach.	49
<b>Obr. 22.</b> Navážené a označené vzorky pôdy v triplikáte.	50
<b>Obr. 23.</b> Vzorky pôdy chladené ľadovou drťou.	51
<b>Obr. 24.</b> Pretrepanie vzoriek pôdy na trepačke.	51
<b>Obr. 25.</b> Rozdelenie fáz extrakcie.	52
<b>Obr. 26.</b> Rozpustený odparok pripravený na zakoncentrovanie v koncentrátore.	53
<b>Obr. 27.</b> Zakoncentrované vzorky pôdy uskladnené v hlbokomraziacom boxe pred rekonštitúciou v MF.	53
<b>Obr. 28.</b> Premiešavanie rekonštituovaných extraktov pôdy na roleri.	54
<b>Obr. 29.</b> Filtrácia extraktov pôdy pomocou jednorázových PTFE filtrov a sterilných striekačiek do sklenených vialiek.	54

<b>Obr. 30.</b> Prefiltrovaný extrakt pripravený na analýzu pomocou LC-MS.....	55
<b>Obr. 31.</b> Kalibračná krivka – ABZ .....	57
<b>Obr. 32.</b> Kalibračná krivka – ABZSO.....	58
<b>Obr. 33.</b> Kalibračná krivka - ABZSO <sub>2</sub> .....	58
<b>Obr. 34.</b> SRM prechod sledovaných zlúčenín a IS.....	59
<b>Obr. 35.</b> Chromatogram štandardných roztokov sledovaných zlúčenín v 5. bode kalibračnej krivky.....	59
<b>Obr. 36.</b> Chromatogram slepej vzorky s IS.....	60
<b>Obr. 37.</b> Chromatogram slepej vzorky bez IS.....	60
<b>Obr. 38.</b> Chromatogram znázorňujúci nástrek 10 µl MF (30 %ACN). .....	61
<b>Obr. 39.</b> Rozšírenie ABZSO a ABZSO <sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	65
<b>Obr. 40.</b> Rozšírenie ABZSO a ABZSO <sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	65
<b>Obr. 41.</b> Rozšírenie ABZSO a ABZSO <sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	66
<b>Obr. 42.</b> Rozšírenie ABZSO a ABZSO <sub>2</sub> ( µg/kg) vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	67
<b>Obr. 43.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	68
<b>Obr. 44.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 10 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	68
<b>Obr. 45.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	69
<b>Obr. 46.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 25 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	70
<b>Obr. 47.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 40 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	71
<b>Obr. 48.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 40 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	72
<b>Obr. 49.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 60 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	73

<b>Obr. 50.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 60 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	73
<b>Obr. 51.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 75 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 1. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	74
<b>Obr. 52.</b> Rozšírenie TP na základe ich relatívnych plôch pod píkom prepočítané na 1 kg pôdy vo vzdialenosti 75 cm od primárnej rastlinky pohnojenej 35 g a 105 g ovčieho trusu v 2. hĺbke pôdy v rozličných týždňoch odberu.....	74

## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tab. 1.</b> Benzimidazoly karbamátového typu upravené podľa [13]. .....	11
<b>Tab. 2.</b> QuEChERS metódy s používaným množstvom vzorky, organických rozpúšťadiel a extrakčných zmesí upravené podľa [56]. .....	26
<b>Tab. 3.</b> Jednotlivé body kalibračnej krivky a ich koncentrácie sledovaných analytov. ....	42
<b>Tab. 4.</b> Územné zrážky v roku 2020 upravené podľa [71]. .....	43
<b>Tab. 5.</b> Množstvo TP nachádzajúcich sa v jednotlivých gramoch trusu aplikovaných na experimentálne pole. ....	45
<b>Tab. 6.</b> Vytvorené zmesi pôdy (I-IV) z dvoch odobratých hĺbok od primárnych pohnojených rastlín. ....	48
<b>Tab. 7.</b> Použité chromatografické podmienky. ....	56
<b>Tab. 8.</b> Vzorce kalibračných kriviek pre jednotlivé TP. ....	57
<b>Tab. 9.</b> Použité podmienky hmotnostného analyzátoru. ....	61
<b>Tab. 10.</b> Retenčný čas, molekulárna hmotnosť, molekulárny vzorec a vybrané produktové ióny analyzovaných zlúčenín. ....	62
<b>Tab. 11.</b> Ďalšie parametre stanovené s pomocou UHPLC - MS/MS. ....	62
<b>Tab. 12.</b> Validačné parametre pre vzorky pôdy analyzované s pomocou UHPLC - MS/MS. ....	63