

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

SLEDOVÁNÍ PŘESTUPU ALBENDAZOLU  
Z TRUSU OVCE DOMÁCÍ DO PÍČNIN POMOCÍ  
LC-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph. D.

Hradec Králové 2021

Bc. Andrea Sochová

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

Souhlasím, aby moje práce byla volně k dispozici k nahlédnutí ke studijním účelům.

V Hradci Králové, dne 10. 5. 2021

.....

Podpis

Tímto bych ráda poděkovala paní prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a postřehy. Veliké poděkování také patří Mgr. Martině Navrátilové za věnovaný čas, trpělivost a rady při práci v laboratoři i následném zpracování této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala celé katedře biochemických věd za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Andrea Sochová

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph. D.

Název diplomové práce: Sledování přestupu albendazolu z trusu ovce domácí do píce pomocí LC-MS

Léky mohou být obecně významným zdrojem znečištění životního prostředí, zejména léky s vysokou perzistencí. Albendazol (ABZ) patří mezi benzimidazolová anthelmintika hojně užívaná k léčbě a profylaxi parazitárních infekcí u zvířat. S exkrementy zvířat se ABZ dostává do životního prostředí a může mít negativní účinek na necílové organismy.

Laboratorní experimenty prokázaly, že rostliny mohou absorbovat, a dokonce biotransformovat ABZ, avšak není dosud známo, zda k těmto jevům dochází i v reálných polních podmínkách. V této studii jsme proto sledovali přenos ABZ a jeho transformačních produktů z trusu léčených ovcí do běžných píce jako jsou vojtěška setá (*Medicago sativa*) a jetel luční (*Trifolium pratense*). Zajímalo nás, zda existuje možnost přenosu těchto sloučenin z exkrementů do půdy a z půdy do rostlin v reálných polních podmínkách.

Naše studie úspěšně odhalila výskyt transformačních produktů albendazolu (ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub>) v obou pících. Nejvyšší koncentrace ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> byla pozorována 1. a 2. týden po aplikaci trusu. Poté se množství těchto látek v rostlinách v průběhu času snížilo, s výjimkou května, kdy byl pozorován mírný nárůst, pravděpodobně v důsledku vyšších dešťových srážek. I dva měsíce po prvním kontaktu píce s trusem byl stále přítomný ABZ-SO i ABZ-SO<sub>2</sub>. Přítomnost transformačních produktů ABZ v krmných rostlinách představuje nejen nebezpečí pro býložravé bezobratlé živočichy, ale může také hrát další roli ve vývoji rezistence hlístic na ABZ.

# ABSTRACT

Charles University  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Andrea Sochová

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

Title of diploma thesis: Monitoring of albendazole transfer from ovine faeces to fodder plants by LC-MS

In general, drugs might be a significant source of pollution in the environment especially drugs with high persistence. Albendazole (ABZ) belongs to a benzimidazole group of anthelmintic drugs. These drugs are regularly and frequently used to limit and treat parasitic infections in animals. ABZ enters the environment via animal excrements and it can have negative effects on non-target organisms.

Laboratory experiments have shown that the plants can uptake and even biotransform the ABZ, however, it is not known whether these phenomena occur in the real field conditions. The present study monitors the transfer of ABZ and its transformation products (TPs) from the faeces of treated sheep to common fodder plants such as *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. We wanted to know whether the possibility of transferring these compounds from excrement into the soil and from soil to plants exists in real field conditions.

Our study successfully revealed the occurrence of ABZ TPs (ABZ-SO and ABZ-SO<sub>2</sub>) in both fodder plants. The highest concentration of TPs was observed at the 1. and 2. week after the application of faeces. Then, the amount of TPs in plants decreased during the time, except in May, where a slight increase was observed, probably due to higher precipitation. Even two months after the first contact of fodder plants with faeces, ABZ-SO and ABZ-SO<sub>2</sub> were still present. The presence of the TPs in fodder plants represents not only a danger to herbivorous invertebrates, but also may play an additional role in the development of ABZ resistance in helminths.

# OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Anthelmintika.....	9
2.1.1	Benzimidazoly .....	9
2.2	Pícniny.....	16
2.2.1	Jetel luční ( <i>Trifolium pratense</i> ).....	16
2.2.2	Vojtěška setá ( <i>Medicago sativa</i> ).....	18
2.3	Biotransformace xenobiotik .....	19
2.3.1	I. fáze biotransformace .....	20
2.3.2	II. fáze biotransformace .....	24
2.3.3	Transport xenobiotik.....	26
2.4	Benzimidazoly v životním prostředí .....	28
2.5	Analýza léčiv v biologických vzorcích .....	29
2.5.1	Příprava vzorků.....	29
2.5.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	31
2.5.3	Hmotnostní spektrometr .....	37
3	Cíl práce.....	46
4	Experimentální část.....	47
4.1	Chemikálie a přístrojové vybavení.....	47
4.1.1	Chemikálie .....	47
4.1.2	Přístrojové vybavení .....	47
4.1.3	Pomůcky .....	48
4.2	Hnojení pole a odběr vzorků .....	49
4.2.1	Odběr vzorků .....	50
4.3	Příprava mobilní fáze, příprava zásobních roztoků a příprava vzorků pro kalibraci .....	52

4.4	Extrakce vzorků .....	55
4.4.1	Příprava reálných vzorků a interního standardu .....	55
4.4.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE).....	55
4.4.3	Rekonstituce vzorků .....	56
4.5	Analýza vzorků .....	57
4.5.1	Vyhodnocení chromatogramů.....	58
5	Výsledky .....	62
5.1	Stanovení metabolitů ABZ v jeteli.....	62
5.2	Stanovení metabolitů ABZ ve vojtěšce.....	68
6	Diskuze .....	73
7	Závěr .....	76
8	Seznam zkratk .....	77
9	Seznam obrázků a tabulek .....	80
9.1	Obrázky .....	80
9.2	Tabulky .....	81
10	Literatura.....	82
10.1	Elektronické zdroje (weby) .....	92

# 1 ÚVOD

Albendazol je jedním z hlavních benzimidazolových anthelmintických léčiv používaných k léčbě parazitárních onemocnění při chovu hospodářských zvířat. Má široké spektrum užití. Jeho účinek nebyl prokázán pouze u dospělých jedinců, ale také u vývojových forem parazitů – larev a vajíček. Mechanismem jeho účinku je inhibice syntézy mikrotubulů, která vede k rozvratu metabolismu, rozpadu vnitřního uspořádání buňky a následné smrti parazita.

Většina anthelmintik používána ve veterinární praxi bývají podávána hospodářským zvířatům preventivně a profylakticky. Tímto způsobem se zvyšuje jejich spotřeba i negativní účinek na životní prostředí. Nejdůležitější cestou, kterou se albendazol i další anthelmintická léčiva dostávají do životního prostředí, je exkrece stolicí nebo močí hospodářských zvířat a následným používáním těchto exkrementů jako hnojivo pro zemědělskou půdu. Takto vyloučená anthelmintika mohou zůstat uložena v půdě a vodě nebo postupně přecházet do rostlin.

Znalosti o osudu, ekologických rizicích a účincích anthelmintik na rostliny jsou poměrně malé. Proto se tato diplomová práce zabývá kvantifikací albendazolu a jeho transformačních produktů v pícninách, konkrétně v jeteli lučním (*T. pratense*) a tolici vojtěšce (*M. sativa*). Cílem této práce bylo zjistit, zda dochází k přestupu albendazolu z trusu léčených ovcí do daných pícnin. Také byla zjišťována vzdálenost, do jaké se parentní látka a její transformační produkty jsou schopny rozšířit.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva používána pro eliminaci helmintů z organismu lidí, divokých i domestikovaných zvířat a plodin. Helminti jsou parazitičtí červi způsobující infekční choroby nazývané helmintózy. V těle hostitele se nejčastěji nachází v gastrointestinální traktu (intraluminálně), někteří však žijí také v dalších tkáních (např. plicích, svalech). Mezi nejznámější parazitické červy můžeme řadit háďátka (*Strongyloides*), roupky (*Enterobius*), měchovce (*Ancylostoma*, *Necator*) a škrkavky (*Ascaris*, *Toxocara*, *Toxascaris*) (Dobšíková a Široká 2014, Epe a Kaminsky 2013).

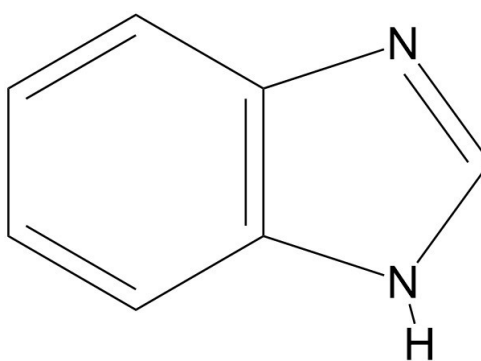
Infekce způsobené helminty mají negativní dopad na hostitele. Můžou způsobit poškození tkání a orgánů v místě infekce nebo spotřebovávat živiny a energii, kterou hostitelé ke své existenci nutně potřebují. Dochází ke snížené produktivitě hostitele, což se projeví především u hospodářských zvířat. Anthelmintika se většinou hospodářským zvířatům podávají plošně (bez výběru specifických jedinců) a preventivně. Můžeme je dělit podle rozsahu účinku na anthelmintika širokospektrá a anthelmintika s nízkým spektrem působnosti. Další klasifikace je závislá na účinnosti proti specifické třídě červů. V tomto případě se dělí na antinematoda, anticestoda nebo antirematoda. Na základě chemické struktury je můžeme rozdělovat na benzimidazoly, imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny, izotiokyanáty, makrocyklické laktony, pyrazinové a aminoacetonitrilové deriváty (Ducháček a Lamka 2014, Partridge et al. 2020, Stuchlíková et al. 2015).

#### 2.1.1 Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou heterocyklické aromatické sloučeniny, které ve své základní struktuře obsahují šestičlenné jádro benzenu kondenzované s pětičlennou imidazolovou skupinou. Jedná se o skupinu léčiv, která má mnoho farmakologických vlastností. Nejvýznamnější benzimidazolovou přírodní sloučeninou je N-ribosyl-dimethylbenzimidazol, který slouží jako ligand pro kobalt ve vitamínu B12. Deriváty benzimidazolu našly široké terapeutické využití. (Kamanna 2019, Salahuddin et al. 2017, Bansal a Silakari 2012).

**Tabulka 1** - Příklady terapeutického využití benzimidazolů

Terapeutické využití	Příklady konkrétních benzimidazolů
Antihypertenziva	Candesartan
Analgetika	2-substituované benzimidazoly syntetizované kondenzací o-fenylendiaminu s deriváty kyseliny 2-kumaranonyloctové a indol-3-kyselinou
Antivirotika	Enviradin Skupina 2-substituovaných-5-amidino-benzimidazolových derivátů s antivirovou aktivitou vůči virům coxsackie a echo virům
Antihistaminika	Astemizol 2-(piperidin-3-yl)-1H-benzimidazoly - selektivní H1-antihistaminika
Antiulceroza	Omeprazol
Antimikrobiální léčiva	Albendazol Deriváty založené na 2-thioalkylantioarylem substituovaném benzimidazolu a 5,6-dinitrobenzimidazolu s antibakteriální aktivitou proti nozokomiálním kmenům
Protizánětlivá léčiva	Analoga benoxaprofenu
Protinádorová léčiva	Bendamustin

**Obrázek 1** - Struktura benzimidazolů

Důležitou funkci zastávají mnohé benzimidazolové deriváty při eliminaci parazitů. Benzimidazolová anthelmintika patří mezi nejrozšířenější skupinu širokospektrých léčiv, které se využívají k likvidaci nebo ke snížení počtu hlístic, tasemnic a motolic parazitujících ve tkáních nebo střevech hostitelů (Lamka a Ducháček 2014). Díky jejich

nízké ceně, širokému rozsahu a snadnému podávání jsou benzimidazoly jednou z nejpoužívanějších skupin anthelmintik. Benzimidazolová antihelmintika jsou dobře snášena bez závažných vedlejších účinků u lidí i zvířat (Deok-Soo Son et al. 2020). U lidí jsou podávána samostatně nebo v kombinaci například při léčbě infekcí způsobených *Echinococcus granulosus*, *Ascaris lumbricoides* a *Trichuris trichiura* (Moser et al. 2019, Dehkordi et al. 2019). Převážně jsou však používána ve veterinární medicíně k profylaxi a léčbě různých forem helmintóz u domácích, hospodářských i volně žijících zvířat (Stuchlíková et al. 2016).

Většina benzimidazolů je nerozpustná nebo málo rozpustná ve vodě. Obvykle se podávají perorálně jako suspenze. Dnes však existuje celá řada farmaceutických forem tohoto léčiva. Pro skot a ovce byl vyvinut bolus s prodlouženým uvolňováním oxfendazolu nebo fenbendazolu. Malým přežvýkavcům se můžou podávat albendazolové kapsle s pomalým uvolňováním léčivé látky. Několik benzimidazolů je také k dispozici ve formě injekcí (web 11). Rozdíly v rychlosti a rozsahu absorpce z gastrointestinálního traktu závisí na široké škále různých faktorů, jako např. druhu organismu, dávkování, složení či rozpustnosti. Nejúčinnější benzimidazoly jsou ty, které mají nejdelší eliminační poločas. Patří mezi ně albendazol a fenbendazol. Řada benzimidazolových anthelmintik existuje ve formě proléčiva. K aktivaci dochází až v těle živočichů po metabolizování proléčiva na biologicky aktivní látku. Terapeutické koncentrace jsou v plazmě a střevech udržovány po delší dobu, což zvyšuje účinnost proti nezralým formám parazitů (web 4). Benzimidazoly jsou vylučovány převážně stolicí, méně často močí. Takto se dostávají do půdy a říčních vod, kde mohou negativně působit na určité druhy organismů (Syslová et al. 2019).

Společným předchůdcem benzimidazolových anthelmintik je thiabendazol. Dnes je thiabendazol využíván jako antimykotikum proti mnoha rodům patogenních hub ovlivňujících širokou škálu rostlin, například ošetření citrusů, banánů aj. (web 12, Lamka a Ducháček 2014, Müller et al. 2014). Zástupci této skupiny léčiv jsou albendazol, fenbendazol, mebendazol, flubendazol a oxibendazol. Proléčiva, jako je febantel, thiofanát a netobimin, jsou anthelmintika, která procházejí transformací na benzimidazoly prostřednictvím bacheru a jaterního metabolismu u přežvýkavců (Furtado et al. 2016).

### 2.1.1.1 Mechanismus působení benzimidazolů

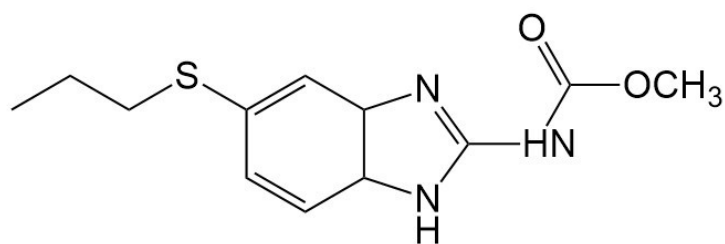
Všechna benzimidazolová anthelmintika se vyznačují společným mechanismem účinku. Biochemickým základem působení benzimidazolů je jejich schopnost vázat se s vysokou afinitou k proteinu (tubulinu) podjednotky mikrotubulů. Mikrotubuly jsou struktury, které se nepřetržitě polymerují přidáním heterodimeru  $\alpha/\beta$ -tubulinu na jeden konec řetězce a ztrátou heterodimeru na opačné straně. K inhibici syntézy mikrotubulů dochází vazbou benzimidazolů na  $\beta$ -tubulin rostoucího mikrotubulu a ztrátou schopnosti prodlužování mikrotubulů, což způsobuje jejich zkrácení a následné vymizení. Protože mikrotubuly hrají zásadní roli při tvorbě mitotického vřeténka a v udržování buněčné homeostázy, jejich ztráta vede k narušení vychytávání glukózy a následné imobilizaci až smrti helmintů (Furtado et al. 2016, Köhler 2001).

Benzimidazoly se vyznačují vyšší afinitou k parazitárnímu  $\beta$ -tubulinu, ale váží se i na tubulin hostitele. Hostitel (člověk, zvíře) však látku rychle metabolizuje. Pro parazity jsou benzimidazolová anthelmintika toxická, jelikož je biotransformují mnohem pomaleji (Lincová et al. 2007, Köhler 2001).

### 2.1.1.2 Albendazol

Albendazol (ABZ) je jedním z nejčastěji používaných léčiv ze skupiny benzimidazolových anthelmintik. ABZ má široké spektrum působnosti. Jeho účinek byl potvrzen nejen u dospělých jedinců, ale u všech vývojových stádií červů. Působí tedy také proti larvám a vajíčkům (Dayan 2003).

Chemicky se jedná o (5-propylthio-1H-benzimidazol-2-yl) methylester kyseliny karbamové, souhrnným vzorcem  $C_{12}H_{15}N_3O_2S$  s molekulovou hmotností 265,33 (Web 9). ABZ je bílá až bezbarvá krystalická látka, která je relativně špatně rozpustná ve vodě a v některých organických rozpouštědlech, jako je např. chloroform, ethanol, methanol, ethylacetát a acetonitril (Dayan 2003; Azad et al. 2018). Naopak, dobře se rozpouští v dimethylsulfoxidu (DMSO, rozpustnost – 17 mg/ml) a v silných kyselinách i zásadách (web 12).



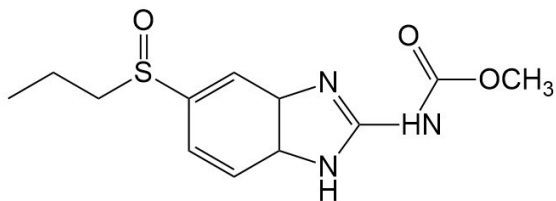
**Obrázek 2** - Struktura albendazolu (*5-propylthio-1H-benzimidazol-2-yl*)

Mechanismem účinku ABZ je inhibice syntézy mikrotubulů enterocytů, která vede k rozkladu vnitřního uspořádání buňky. Dochází k blokování vychytávání glukózy, následnému zmenšení zásob glykogenu a snížení tvorby ATP. Snížená syntéza ATP má dopad na energetický metabolismus parazita. Nedostatek energie způsobí nejprve znehybnění parazita a následnou smrt jak dospělých jedinců, tak i jejich vývojových forem (Katzung et al. 2012, Švihovec et al. 2018).

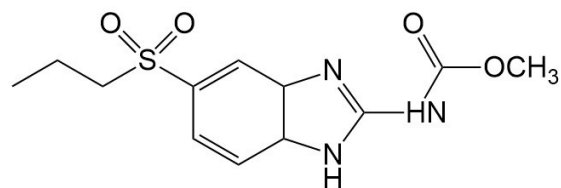
Pokud se ABZ používá k zahubení intraluminálních parazitů, podává se perorálně na lačný žaludek. Proti červům parazitujících ve tkáních je ABZ podáván s jídlem obsahujícím zvýšené množství tuku. Potrava s vyšším podílem lipidů zajistí zvýšení vstřebávání ABZ ze zažívacího traktu lidí a zvířat až 5x (Katzung et al. 2012; Dayan 2003). Po absorpci ve střevě ABZ podléhá rychlému first-pass metabolismu v játrech. Dochází k jeho oxidaci na aktivní metabolit albendazolsulfoxid (ABZ-SO). Tato přeměna je katalyzována dvěma mikrosomálními enzymatickými systémy, flavinmonooxygenasou a cytochromem P450 (CYP), konkrétně podrodinou CYP3A. ABZ-SO se vyznačuje chirálním centrem. Existují dva enantiomery tohoto metabolitu, ABZ-SO (-) a ABZ-SO (+). Hlavní anthelmintický účinek léčiva je primárně připisován ABZ-SO (+) enantiomeru (Paredes et al. 2013). Zatímco enantiomer ABZ-SO (-) bývá spojen s aktivitou CYP450, na tvorbě ABZ-SO (+) se přednostně podílí flavinmonooxygenasy (Dayan 2003; Alvarez et al. 2003). Dalším krokem metabolismu ABZ je sulfoxidace na neaktivní formu albendazolsulfon (ABZ-SO<sub>2</sub>), na které se podílí také cytochrom P450, tentokrát však z podrodiny CYP1A (Laing et al. 2010, Alvarez et al. 2003). Následně může docházet k rozdělení postranního řetězce a aromatického kruhu nebo k rychlému odstranění karbamátové skupiny hydrolyzou (Dayan 2003).

Z důvodu rychlé přeměny ABZ v játrech na sulfoxid je koncentrace parentní látky v plazmě nízká. ABZ-SO se dobře váže na proteiny, šíří se do organismu a je vylučován

žlučí. Eliminační poločas ABZ-SO je 8-12 hodin (Katzung et al. 2012, Lincová et al. 2007).

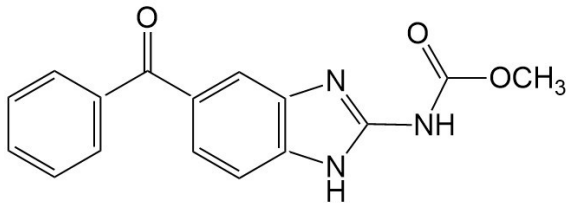
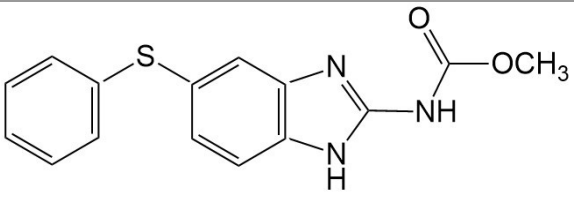
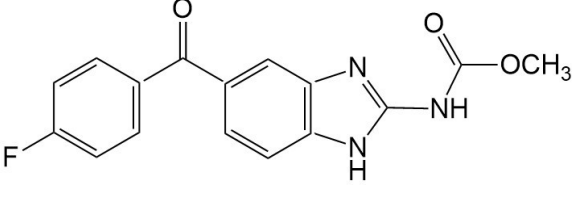
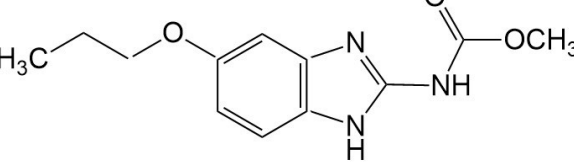


**Obrázek 4** - Albendazol sulfoxid



**Obrázek 3** - Albendazol sulfon

### 2.1.1.3 Další benzimidazolová anthelmintika

	Struktura	Celý název	Molekulová hmotnost (g/mol)	Terapeutická dávka (mg/kg)
<b>Mebendazol</b>		methyl N-(6-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl) karbamát	295,29	8,0 – 8,8
<b>Fenbendazol</b>		methyl N-(6-phenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl) karbamát	299,3	5,0 – 50,0
<b>Flubendazol</b>		Methyl N-[5-(4-fluorobenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl] karbamát	313,28	5,0 – 22,0
<b>Oxibendazol</b>		methyl N-(6-propoxy-1H-benzimidazol-2-yl) karbamát	249,27	4,0 – 40,0

## 2.2 Pícniny

Jedná se o rostliny, které se pěstují za účelem zisku krmiva pro hospodářská zvířata, převážně přežvýkavce. Pícniny jsou pěstovány na orné půdě nebo jako součást trvalých travních porostů využívaných pro pastvu dobytku nebo pro zisk siláží a sena. Můžeme je rozdělit na jednoleté (luskoviny, kukuřice, oves, hořčice, ...) a víceleté (jeteloviny, trávy, jetelotrávy). Základní vlastností kvalitní pícniny je dostatečně vysoká koncentrace živin a její zdravotní nezávadnost. Dalšími vhodnými charakteristikami je rychlý růst, vysoký výnos, odolnost vůči škůdcům, malá náročnost na klimatické podmínky a druh půdy. Kvalita a stravitelnost pícniny závisí především na obsahu vlákniny, ale také dalších makrosložek. Obsah vlákniny se zpravidla zvyšuje se stářím rostlin, dochází k tvorbě a ukládání ligninu, což vede k horší stravitelnosti těchto rostlin. Z tohoto ohledu je důležitá vhodná doba sklizně. Píci je vhodné sklízet mladou, konzervováním se množství vlákniny zvyšuje. Podle podílu obsahujících živin můžeme pícniny dělit na bílkovinné (např. luskoviny, jetel, vojtěška), glycidové (např. kukuřice, oves) a s vyrovnaným úživným poměrem (např. trávy) (Skládanka 2014, Šantrůček 2011).

Mezi nejčastěji se vyskytující hospodářsky významné pícniny řadíme jeteloviny. Jejich produkce je poměrně levná a z hlediska obsahu živin jsou jeteloviny velice hodnotné. Vyznačují se vysokým podílem bílkovin, minerálů (např. vápník, železo), a vitamínů (např. beta-karoten, vitamíny skupiny B). Na rozdíl od trav obsahují nižší množství jednoduchých sacharidů. Další výhodou je, že na rozdíl od většiny pícnin, pro dostatečný výnos nevyžadují hnojení dusíkatými hnojivy. Jeteloviny slouží také jako složky obohacující půdu o živiny (dusík) a zvyšující produktivitu a úrodnost půdy (Skládanka 2014, Šantrůček 2011).

### 2.2.1 Jetel luční (*Trifolium pratense*)

Jetel luční je velice hojně rozšířena rostlina řadící se do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Původně pochází z Evropy, v dnešní době se však vyskytuje téměř na každém kontinentu. Můžeme ji najít jak v nížinách, tak v horských oblastech. Roste na loukách, okrajích cest, v lesích, na polích i pastvinách. Hojně se vyskytuje na nutričně hodnotných hlubokých půdách. Využívá se pro krmení hospodářských zvířat. Jedná se o pícninu s vysokým obsahem proteinů (Pilát 1976, Aichele 1993).

Tato vytrvalá bylina poprvé rozkvétá na konci jara (květen, červen) a naposledy odkvétá v půlce podzimu (říjen). Dorůstá výšky přibližně 15-100 cm. Utváří rozvětvený kořenový



system s jedním hlavním kořenem, který může sahat až 60 cm hluboko pod povrch. Z kořene vyrůstá přízemní růžice listů a četné, většinou lehce hranaté a do červena zbarvené lodyhy. Mohou být přímé nebo vystoupavé, jednoduché či rozvětvené, lysé či mírně chlupaté. Listy vytváří typický trojlístek, někdy však vlivem genetických mutací můžou být i vícečetné. Dolní listy jsou řapíkaté, horní přisedlé a kopinaté, celokrajné, vejčité až široce elipsovité. Charakteristická je pro jetel také světlá skvrna ve tvaru půlměsíčku nacházející se na listech. Květy se na lodyhách vyskytují nejčastěji po dvou, jsou uspořádány do kulovitých až vejčitých hlávek, příjemně voní a mají světle purpurovou, narůžovělou barvu (Knauerová a Drnková 2017, Munker 1996).

Jetel luční se považuje za léčivou bylinu používanou řadu let v tradiční medicíně mnoha kultur. Obsahuje poměrně široké spektrum látek – od flavonoidů a isoflavonoidů, přes saponiny, třísloviny, jiné fenolické látky, kyselinu salicylovou, kumarovou, šťavelovou, barviva, až po vitamíny C, A, B-komplex a biogenní prvky (Ca, Mg, Fe). Vzhledem k velkému obsahu léčivých látek napomáhá při řadě zdravotních potíží. Využíval se k léčbě kožních onemocnění, jako dezinfekce na hnisavé rány, k usnadnění vykašlávání nebo jako antidiarhoikum při střevních infekcích. Isoflavony obsažené v rostlině jetele lučního patří mezi skupinu nejaktivnějších fytoestrogenů. Fytoestrogeny jsou rostlinné látky, které se svou strukturou příliš neliší od živočišných estrogenů. Proto se v dnešní době využívá převážně na zmírnění menopauzálních symptomů. Své využití však nachází i při prevenci chorob srdce a cév či vzniku nádorů (Kašparová 2013). Je také velice dobrou medonosnou rostlinou.



**Obrázek 5** - Jetel luční (*Trifolium pratense*)  
([https://mkpcdn.com/1000x/76868f89bf0df09fd8662b69c97ea7fe\\_594051.jpg](https://mkpcdn.com/1000x/76868f89bf0df09fd8662b69c97ea7fe_594051.jpg))



**Obrázek 6** - *Trifolium pratense* – květ a list  
([https://cdn.shopify.com/s/files/1/0984/2698/products/Red-Clover-Blossoms\\_grande.jpg?v=1560451604](https://cdn.shopify.com/s/files/1/0984/2698/products/Red-Clover-Blossoms_grande.jpg?v=1560451604))

## 2.2.2 Vojtěška setá (*Medicago sativa*)

Tato rostlina není původem z Evropy, pochází ze střední Asie, kde vyrůstala na asijské stepi. Tento původ ovlivnil její charakteristiky. Jedná se o mrazuvzdornou jetelovinu, která je schopná přežít i v sušších podmínkách. Její kořeny jsou dlouhé až 10 m a vnikají hluboko do půdy. Není příliš náročná pro pěstování, ale nejlépe se jí daří na slunných pláních. Základním předpokladem pro úspěšné pěstování vojtěšky je vhodný poměr vody a vzduchu v půdě, dostatečné množství vápníku a optimální pH půdy v rozmezí 6,8 – 7,2. Vojtěška je jedna z nejvýznamnějších píceň využívaných ke krmení hospodářských zvířat. Je nutričně velice bohatá, obsahuje značné množství bílkovin, které zvířata nejen zasytí, ale také se podílí na zlepšení růstu svalové hmoty (Doležal a Skládanka 2007, Pilát 1976, web 14).

Vojtěška neboli tolíce setá je vytrvalá rostlina, která se řadí do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Její kořen je silný a dlouhý. Přímé i vystoupavé lodyhy dorůstají výšky 30 cm – 1 m, většinou bývají lysé. Krátce řapíkaté listy jsou trojčetné, obvejčitého tvaru, v horní části jemně zubaté. Kvete od května do začátku podzimu (září, říjen). Docela drobné květy, sytě fialové až modrofialové barvy, tvoří protáhlé hlávkovité hrozny. Plod má vzhled spirálovitě stočeného nepukavého lusku, který pojímá 3 – 10 semen (Pilát 1976, Pelikán a Hýbl 2012).

Kromě kvalitních aminokyselin je vojtěška bohatá na obsah vitamínů E, A, skupiny vitamínu B, dusíkaté látky a některé biogenní prvky (Mg, Ca, Fe, K). Na druhou stranu se vyznačuje nízkým obsahem sacharidů. Kromě výroby sena a siláží jako krmivo pro hospodářská zvířata, se vojtěška využívá na obohacení půdy o dusík a živiny, které se vyskytují ve spodních vrstvách. Vynáší je svým dlouhým kořenovým systémem na povrch, kde je ukládá (Doležal a Skládanka 2007). Používá se jako podsevová meziplodina. Na orné půdě se vysévá buď jako monokultura nebo v jetelotravních směskách (Pelikán a Hýbl 2012).



**Obrázek 7 - *Medicago sativa***  
(<https://lizzicharper.co.uk/wp-content/uploads/2019/01/Alfalfa-Medicago-sativa.jpg>)



**Obrázek 8 - *Medicago sativa* – květ a listy**  
([https://antropocene.it/wp-content/uploads/2018/10/Medicago\\_sativa-800x445.png](https://antropocene.it/wp-content/uploads/2018/10/Medicago_sativa-800x445.png))

## 2.3 Biotransformace xenobiotik

Všechny živé organismy se během svého života setkávají s celou řadou cizorodých látek, tzv. xenobiotik. Může se jednat jak o látky přírodní, tak o látky synteticky vyrobené. Pro člověka mohou být typickým příkladem xenobiotik léčiva, potravinová aditiva, kosmetické přípravky nebo látky pocházející z průmyslu (např. produkty spalování, ropné produkty, rozpouštědla, atd.). K cizorodým látkám, se kterými se můžou dostat do kontaktu rostliny, řadíme především pesticidy, herbicidy, insekticidy, fungicidy, rodenticidy a regulátory růstu rostlin (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016). Každé léčivo či jiné xenobiotikum je potenciálně nebezpečné. Proto si organismy vyvinuly mechanismy, kterými jsou schopny cizorodé látky přeměnit na metabolity s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Tento proces se nazývá biotransformace (Skálová et al. 2017, Švihovec et al. 2018, web 1).

Cílem biotransformace je přeměna xenobiotik na metabolity snadno vylučitelné z organismu. Většinou jsou tyto chemické přeměny spojeny se snížením možného toxického účinku a zvýšením polariry. Biotransformace je často chápána jako prospěšný děj, který zajistí detoxikaci organismu a usnadní exkreci. Ale nemusí tomu tak být pokaždé. V některých případech toxicita xenobiotika vzroste až po jeho metabolizaci (Švihovec et al. 2018).

Biotransformace může probíhat v různých tkáních a orgánech. Záleží, kterou cestou xenobiotika do organismu vstupují. Vstupní branou u živočichů bývá respirační systém, gastrointestinální trakt nebo pokožka. Pokud vstupuje látka do organismu trávicím traktem, k přeměně může docházet již v ústní dutině. Většina látek se však vstřebává ve střevech, následně jsou vedeny portální žilou do jater, kde podléhají metabolismu. Hydrofóbní (nepolární) látky jsou špatně eliminovatelné z organismu. Zatímco hydrofilní (polární) metabolity je schopen organismus živočichů rychle a jednoduše vyloučit močí, stolicí, potem nebo dechem (web 1, Skálová et al. 2017).

Do rostlin se xenobiotika dostávají nejčastěji kořeny a listy. Spousta pesticidů a dalších xenobiotik vstoupí do atmosféry, ze které jsou během dešťů vyplavovány do půdy nebo podzemních vod odkud putují do rostlin (Van Eerd et al. 2003). Jakmile se látka dostane do kontaktu s listem, je absorbována kutikulárními vosky. Tam může zůstat nějaký čas uložena nebo rovnou projde průduchy dovnitř rostliny. Do kořene se xenobiotika rozpuštěná ve vodě dostávají přes buněčnou stěnu bez kutikuly. Následně jsou tyto látky rozváděny k vodivým pletivům rostlin apoplastickou nebo symplastickou cestou. V případě apoplastické cesty se xenobiotikum pohybuje přes buněčné membrány a mezibuněčné prostory tzv. prostou difuzí. Pohyb v symplastu probíhá prostřednictvím plazmodermu a floému aktivním

transportem, který vyžaduje dodání energie (web 10, Menn 1978, Jachetta et al. 1986). Hydrofilní látky nejsou schopny samovolně procházet přes plazmatickou membránu a buňka si sama reguluje jejich příjem. Naopak lipofilní látky prochází přes buněčnou membránu hydrofóbní povahy velice snadno a buňka jejich transport regulovat nemůže. Tato vlastnost dělá lipofilní xenobiotika nebezpečnějšími a jejich působení může vést až k nevratným poškozením rostlin.

Procesy biotransformace jsou ovlivněny různými faktory. Osud xenobiotika závisí nejen na jeho chemické struktuře, ale i na enzymatické výbavě organismu. Polarita, distribuce elektronů a ionizace jsou důležité při vazbě cizorodé látky na transportní systémy a biotransformační enzymy. Elektrochemické vlastnosti, konformace a konfigurace látek hrají důležitou roli při vlastní enzymové katalýze (Skálová et al. 2017).

Biotransformační procesy můžeme rozdělit do tří fází. První fázi představují reakce oxidační, redukční a hydrolytické. V tomto kroku jsou do struktury xenobiotik vneseny nebo odkryty reaktivní a hydrofilní funkční skupiny. Ve druhé fázi metabolismu vznikají konjugační produkty. Dochází k vazbě xenobiotik s ještě polárnějšími endogenními molekulami. Následný transport xenobiotik a jejich metabolitů přes membrány zprostředkovaný specifickými transportéry proteinů je označován za třetí fázi metabolismu xenobiotik (Cvilink et al. 2009).

### **2.3.1 I. fáze biotransformace**

Děje probíhající v této fázi vedou k vytvoření reaktivnějších látek a látek mnohem lépe rozpustných ve vodě než parentní xenobiotikum (Knejzlík 2000). Jednou z nejdůležitějších reakcí I. fáze biotransformace je oxidace, při které dochází k vnoření molekuly kyslíku do cizorodé látky. Oxidační biotransformační děje zahrnují hydroxylaci, které podléhají xenobiotika s aromatickým kruhem či alifatickým řetězcem. K nahrazení aminoskupiny u primárních aminů oxoskupinou dochází při oxidační deaminaci. Sekundární a terciální aminy podléhají dealkylaci. Pokud je oxidační cestou z cizorodé látky odstraněn halogen jedná se o dehalogenaci. Další možností oxidačních biotransformačních reakcí je oxidace alkoholů, aldehydů, N- a S-oxidace. Pro nitrosloučeniny, azosloučeniny, chinony a karbonylové skupiny je typická redukční reakce. Mnoho xenobiotik, jako jsou estery, amidy a epoxidy, podléhají hydrolytické biotransformaci (Skálová et al. 2017, Švihovec et al. 2018).

Velice zřídka se xenobiotika metabolizují pomocí neenzymatických přeměn. V naprosté většině případů je k biotransformačním reakcím zapotřebí katalytické působení enzymů. Až na výjimky rostliny celý svůj život zůstávají na jednom stanovišti, nemohou změnit místo

svého výskytu, jsou tedy nuceny dynamicky reagovat na změny prostředí. Z toho důvodu musí mít velké množství biotransformačních enzymů napomáhajících detoxikaci rostlinného organismu (Skálová et al. 2017).

### 2.3.1.1 Cytochromy P450

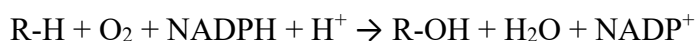
Nejdůležitějšími enzymy podílejícími se na I. fázi biotransformace jsou cytochromy P450 (Cvilink et al. 2009). Enzymový systém cytochromu P450 spadá do velmi rozsáhlé rodiny hemových proteinů. Znamená to, že hem je vázán na apoproteinovou část prostřednictvím thiolátového aniontu pocházejícího z aminokyseliny cysteinu. Hemová skupina komplexována s oxidem uhelnatým vykazuje maximální absorpci světla při vlnové délce 450 nm (Dostálek et al. 2006).

Rodina cytochromů P450 pochází z genu předků, který existoval před více než třemi miliardami let. Opakované duplikace genů následně vedly k vzniku jedné z největších multigenových rodin. Při posledním sčítání bylo zjištěno několik tisíc identifikovatelných genomových a cDNA sekvencí cytochromů P450. Na základě podobnosti struktury a funkcí je enzymatický systém cytochromů P450 rozdělen do rodin, podrodin a na jednotlivé izoformy. Sekvence, které zobrazují více než 40% aminokyselinovou identitu, jsou umístěny do stejné rodiny. Podobně funguje řazení do podrodin. V tomto případě je však nutná nejméně 60% shoda (Danielson et al. 2003). Jednotlivé isoformy se ve svém zastoupení u jednotlivých organismů výrazně liší. Některé byly zjištěny pouze u jednoho druhu, existence jiných byla potvrzena u více různých organismů (Skálová et al. 2017).

Drtivá většina eukaryotických cytochromů P450 je uložena v membráně buď endoplazmatického retikula (mikrosomálního typu) nebo mitochondrií (mitochondriálního typu). Třetím typem cytochromu P450 jsou cytosolické formy, které jsou přítomny převážně u prokaryotních organismů (Danielson et al. 2003).

Cytochromy P450 patří do rozsáhlé skupiny monooxygenas, někdy také označované jako MFO (z ang. mixed-function oxygenase), katalyzujících hydroxylační děje. Molekula kyslíku je redukčně štěpena na dva atomy kyslíku. První z nich je vpraven do molekuly substrátu, druhý je uvolněn ve formě vody. (web 1)

Základní reakci, katalyzovanou cytochromy P450 lze zapsat následující rovnicí (Švihovec et al. 2018):



Cytochromy P450 jsou pozoruhodné jak pro rozmanitost reakcí, které katalyzují, tak pro rozsah chemicky odlišných substrátů, na které působí. Kromě biotransformace xenobiotik hrají CYP velmi důležitou roli v endogenním metabolismu (Danielson et al. 2003). U vyšších rostlin slouží ke katalýze syntézy přírodních látek, jako jsou např. terpenoidy, alkaloidy, flavonoidy, furanokumariny nebo glukosinoláty, plnicích velkou škálu funkcí zásadních pro přežití rostlin. Jednou z nich je schopnost upoutat zájem opylovačů, a naopak odradit škůdce. Tyto látky rostlinám také umožňují komunikaci mezi sebou (Bártíková et al. 2015).

**Tabulka 2** - Různé funkce cytochromu P450 v rostlinách (Pandian et al. 2020)

Typ cytochromu P450	Funkce
<b>CYP76C2</b>	Obranný mechanismus – hypersenzitivní rychlá smrt buněk
<b>CYP707 ABA 8</b>	Hormonální regulace – katabolismus ABA hydroxylázy (ABA = negativní regulátor růstu a otevírání průduchů)
<b>CYP86A2</b>	Metabolismus mastných kyselin – hydroxylace v biosyntéze kutinu
<b>CYP75</b>	Biosyntéza antioxidantů – aktivita 3', 5'-hydroxylázy flavonoidu
<b>CYP79A, CYP71E1</b>	Biosyntéza sekundárních metabolitů – biosyntéza dhurrinu (kyanogenní glykosid)

### 2.3.1.2 Flavinové monooxygenasy (FMO)

FMO tvoří další rodinu enzymů, které se účastní I. fáze biotransformace xenobiotik (web 2). Flavinové monooxygenasy jsou membránové proteiny vyskytující se na hladkém endoplazmatickém retikulu. U živočichů je můžeme najít v játrech, kde byly také v druhé polovině 20. století objeveny. Ukázalo se, že tento enzymový systém využívá kyslík a NADPH k přeměně N, N'-dimethylanilinu na N-oxid. FMO je flavoprotein obsahující jediný flavin adenin dinukleotid (FAD) (Krueger 2005, Skálová et al. 2018). FMO mohou přenášet hydroxylové skupiny na širokou škálu malých, nukleofilních substrátů obsahujících heteroatomy, což je činí polárnějšími. U živočichů existuje pět funkčně exprimovaných genů FMO (FMO1-5). Kromě živočichů však FMO byly nalezeny také v bakteriích a jednobuněčných eukaryotických organismech (např. v kvasinkách).

U rostlin bylo zjištěno větší množství genů FMO než u lidí a zvířat. První výzkumy zaměřené na funkci flavinových monooxygenas v rostlinných buňkách byly prováděny

kolem roku 2001. Studium FMO probíhalo převážně na modelové rostlině *Arabidopsis*, ve které bylo nalezeno 29 odlišných genů. Rostliny jsou pravděpodobně schopny tuto rodinu enzymů využívat více než živočichové. Ukázalo se, že FMO zajišťují syntézu auxinu a podílejí se na biotransformaci glukosinolátů. Kromě toho hrají důležitou roli při obraně rostlin proti různým patogenům (Schlaich 2007).

### **2.3.1.3 Peroxidasy**

Peroxidasy (POX) patří do velké nadrodiny hemoproteinů. Jsou známy především svým antioxidačním účinkem, který zajišťuje odstranění organických hydroperoxidů a redukci toxického peroxidu vodíku. Současně však můžou oxidovat endogenní sloučeniny nebo cizorodé látky (Stiborová et al. 2004). Existuje celá řada peroxidas. Některé jsou specifické a oxidují pouze určitý substrát. Pro jiné je typická široká škála anorganických i organických substrátů. Zastoupení těchto enzymů je mnohem vyšší u rostlin a hub než u mikrobu a živočichů.

Rostlinné peroxidázy představují třídu enzymů s velkým množstvím funkcí při metabolismu rostlin. Podle primární struktury je můžeme řadit do 3 tříd. První třída zahrnuje intracelulární peroxidasy, které se uplatňují v důležitých detoxikačních systémech  $H_2O_2$  rostlinných buněk. Askorbátperoxidasa je hlavním enzymem zastoupeným v rostlinné říši, který katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu pomocí askorbátu jako donoru elektronů. Druhou třídu peroxidas tvoří extracelulární houbovitě peroxidasy schopné oxidovat látky organického původu, které znečišťují životní prostředí. Do třetí třídy řadíme peroxidasy vyšších rostlin podílející se na oxidaci celé řady xenobiotik (Bártíková et al. 2015, Stiborová et al. 2004). POX katalyzují polymerní oxidaci fenolických jednotek během syntézy ligninu a podílí se na tvorbě buněčné stěny. Kromě toho jsou POX klíčové během růstových procesů, vývoje ovoce i detoxikace a obecné reakce na stres (Huber 2016).

### **2.3.1.4 Další enzymy I. fáze biotransformace**

Alkoholdehydrogenasy (ADH) a aldehyddehydrogenasy (ALDH) jsou skupinou enzymů, které katalyzují oxidaci alkoholů na aldehydy a ketony, ty poté na karboxylové kyseliny. Mnohem více jsou prozkoumány u živočichů a lidí, u kterých jsou často ilustrovány na metabolismu ethanolu, který je za pomoci alkoholdehydrogenasy oxidován na acetaldehyd, a ten je následně aldehyddehydrogenasou převáděn na kyselinu octovou (Lehman-McKeeman 2018). U rostlin nebylo nalezeno takové množství rodin ADH. Přesto jsou důležitou skupinou enzymů podílející se na vzniku vůní, které jsou charakteristické pro dané druhy rostlin. Tato

vůně má ochrannou funkci, ale zároveň slouží jako lákadlo pro opylovače (Bártíková et al. 2015). ALDH jsou schopny detoxikovat xenobiotika.

Na redukčních metabolických cestách I. fáze biotransformace se podílejí reductasy (dehydrogenasy), redukující aldehydy a ketony na primární a sekundární alkoholy. Při redukci dochází ke ztrátě atomu kyslíku nebo adici dvou atomů vodíku. Jako kofaktor aldoketoreduktasam (AKR) slouží NADPH (Skálová et al. 2017, Švihovec et al. 2018). Vyznačují se nízkou substrátovou selektivitou a schopností přeměňovat látky endogenní i xenobiotika. Reduktasy (dehydrogenasy) se u rostlin podílejí na vývojových procesech květů nebo se můžou účastnit syntézy hormonů. Další možností využití těchto enzymů je v případě katabolických procesů a sekundárních biotransformačních cest (alkaloidy, terpenoidy) (Bártíková et al. 2015). Jednou z AKR objevených v rostlinách je aldoketoreduktasa 4 podrodina C. Tato skupina enzymů má schopnost zbavovat rostliny reaktivních metabolitů xenobiotik i reaktivních endogenních aldehydů. Tím může chránit rostlinu před osmotickým stresem (Narawongsanont et al. 2012). Jedna ze studií na ječmeni setém (*Hordeum vulgare L.*) také prokázala, že zvýšená exprese AKR vede k lepší toleranci vůči mrazu (Éva et al. 2014).

### 2.3.2 II. fáze biotransformace

Typické pro tuto fázi biotransformace jsou reakce konjugační neboli syntetické. Konjugace je proces, při kterém dochází k vazbě xenobiotika s endogenní látkou (konjugačním činidlem) v aktivovaném stavu. Pro tento děj je nutné dodat energii. Ve většině případů je vzniklý konjugát hydrofilnější. Často sloučeniny nejprve procházejí I. fází metabolismu, kde jsou do molekul vnášeny vhodné funkční skupiny. Teprve poté podléhají konjugačním reakcím. Existují však i molekuly s místy vhodnými pro konjugaci bez potřeby oxidace, redukce či hydrolýzy. Tyto molekuly mohou být konjugovány přímo. (Zamek-Gliszczyński 2006)

Ke konjugaci rostliny využívají sacharidy, aminokyseliny, kyselinu malonovou, glutathion a polymery buněčné stěny (např. lignin). Reakce II. fáze jsou zprostředkovány enzymy jako jsou glutathion-S-transferasy, malonyltransferasy a glukosyltransferasy (Crhová 2018, Skálová et al. 2017).

#### 2.3.2.1 Glutathion-S-transferasy (GST)

Velká a rozmanitá skupina enzymů nazývaných glutathion-S-transferasy zprostředkovává reakce, kdy dochází ke konjugaci xenobiotik s glutathionem. Kofaktorem této reakce je tripeptid glutathion, který je tvořen z cysteinu, glycinu a glutamátu. Konjugace



probíhá skrze thiolovou skupinu (web 3, Švihovec et al. 2018). Dochází k nukleofilnímu ataku síry glutathionu na skupiny substrátu, které jsou elektrofilní, hydrofobní a většinou cytotoxické. GST nacházející se v rostlinách byly rozděleny do osmi tříd. Sedm z nich je rozpustných v cytosolu a jedna je vázaná na membránu mikrozomů. GST třídy phi ( $\Phi$ ) a tau (T) jsou specifické pro rostliny. Jedná se o nejpočetnější GST třídy zastoupené v rostlinách. Většina GST je aktivní jako dimery. Existují však i třídy, které se vyskytují častěji jako monomery, např. dehydroaskorbátoreduktasy (DHAR). DHAR mají speciální funkci při redukci dehydroaskorbátu na kyselinu askorbovou. (Edwards a Dixon 2005, Bártíková et al. 2015). Rostlinné GST byly původně objeveny v 70. letech 20. století díky jejich detoxikační schopnosti vůči herbicidům. Kromě role v detoxikaci herbicidů, jsou rostlinné GST také dlouho spojovány s vývojovými změnami a růstem rostlin. Důležité jsou také z toho důvodu, že regulují nebezpečí oxidačního stresu a zajišťují detoxikaci životního prostředí od odpadních látek a chemických karcinogenů (Dixon et al. 2010).

### 2.3.2.2 UDP glukuronosyl-transferasy

Další skupinou enzymů rozšířenou v rostlinné i živočišné říši jsou uridindifosfátové (UDP) glykosyltransferasy. Tyto enzymy zprostředkovávají kovalentní připojení glykosylových zbytků z aktivovaných cukrů k malým organickým molekulám (Meech et al. 2012). Živočiškové využívají ke konjugaci kyselinu UDP-glukuronovou, která se v organismu tvoří oxidačními reakcemi UDP-glukosy (web 3). Rostliny konjugují přímo s UDP-glukosou. Vlastnosti akceptorových molekul glykosylových zbytků jsou zásadně ovlivněny glykosylací. Může dojít ke změně jejich rozpustnosti, biologické aktivity nebo transportní funkce. UDP glykosyltransferasy proto hrají zásadní roli v metabolismu sekundárních rostlinných metabolitů i v detoxikaci různých nebezpečných xenobiotik. Jsou schopny zbavovat odpadní vody organochlóru nebo deaktivovat specifické mykotoxiny (Bártíková et al. 2015). Glukuronidaci podléhají především látky obsahující ve své struktuře nukleofilní heteroatom (N, O, S). Například v bérú zeleném (*Setaria viridis*) se tvoří N- a O-glukosidy herbicidu chlorambenu. Substráty reakce jsou více či méně specifické, ale obvykle mají v molekule skupiny -OH, -COOH, -SH nebo NH<sub>2</sub> (web 3, Skálová et al. 2017).

### 2.3.2.3 Malonyltransferasy

U vyšších rostlin může běžně docházet k dalším konjugacím glukosidů xenobiotik či flavonoidů. Tato modifikační reakce se nazývá malonylace. U rajčat (*Lycopersicon esculentum* L.) je herbicid metribuzin konjugován s glukózou, která je následně konjugována

s malonátem a tvoří N-malonyl-glukózový konjugát (Van Eerd et al. 2003). Ezymy malonyltransferasy zprostředkovávají konjugaci xenobiotika s malonátem. Jako donor při této reakci slouží malonyl-CoA katalyzující transacylaci v řadě glukosidů (Bártíková et al. 2015).

#### 2.3.2.4 Sulfottransferasy

Kofaktorem, který slouží jako donor sulfátu pro sulfonaci je 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát (PAPS). Pro charakteristiku primární struktury sulfottransferas je důležitý zbytek histidinu v aktivním místě a vazebná místa pro PAPS. Rychlost této reakce je závislá na množství PAPS. U rostlin se sulfottransferasy účastní procesů rozpoznávání a signalizace molekul. Také hrají důležitou roli ve vývoji, růstu rostlin a adaptaci na stres. Existuje více známých rostlinných sulfottransferas, které jsou kódovány několika geny. U *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 21 sulfottransferas, v *Oryza sativa L.* bylo identifikováno 35 genů kódujících proteiny sulfottransferas. Jeden z těchto genů katalyzuje sulfataci 12-hydroxyjasmonátu a tím inaktivuje přebytek kyseliny jasmonové účastnící se obrany proti nekrotrofním patogenům v rostlinách. Další geny se účastní hormonální regulace (Hirschmann et al. 2014, Bártíková et al. 2015, Janda 2018).

#### 2.3.2.5 Metyltransferasa

Metyltransferasy se podílejí na přenosu methylové skupiny z S-adenosyl-L-methioninu na cizorodé látky nebo endogenní substráty, které obsahují ve své struktuře funkční skupiny - C, -O, -N nebo -S (Penner et al. 2012). Metyltransferasa se podílí na přeměně široké škály strukturně odlišných substrátů (komponenty buněčné stěny, pigmenty, kofaktory, a další). Metylace má vliv na reaktivitu molekul, biologickou aktivitu a dostupnost. Díky těmto vlastnostem hraje velice důležitou roli v endogenních metabolických drahách a při detoxikačních reakcích v rostlinách (Bártíková et al 2015).

### 2.3.3 Transport xenobiotik

U rostlin nedochází k vyloučení xenobiotik a jejich metabolitů (jak tomu bývá u zvířat a lidí), nýbrž k jejich kompartmentaci a následnému uskladnění ve vakuolách nebo tonoplastu. Některé metabolity a xenobiotika nejsou schopny projít lipidovou membránou. Z toho důvodu existují na membránách rostlinných buněk tzv. membránové přenašeče (transportéry). Jedná se o skupinu specifických transportních proteinů schopných přepravovat sloučeniny různé struktury. Nejznámější a nevíce prozkoumané jsou ABC-transportéry (ATP-binding cassette) a MATE-transportéry (multidrug and toxins extrusion). ABC-transportéry se uplatňují při

příjmu, transportu a ukládání cizorodých látek i produktů endogenního metabolismu do vakuol. Tento proces vyžaduje energii (Skálová et al. 2017). Znalosti o MATE-transportérech jsou značně omezené, jelikož se jedná o relativně nově popsanou rodinu transportních proteinů v rostlinách. Jednou z nejdůležitějších funkcí MATE-transportérů je schopnost detoxikace kovů a jejich zapojení do metabolismu fenolů. Tyto transportní proteiny se podílí na udržování homeostázy organismu vylučováním endogenních metabolitů i xenobiotik. U rostlin bylo prokázáno, že MATE-transportéry řídí jejich růst, vývoj a odolnost vůči nemocem (Bártíková et al. 2015).

## 2.4 Benzimidazoly v životním prostředí

Většina anthelmintik používána převážně ve veterinární praxi bývají podávána hospodářským zvířatům profylakticky, což vede k celosvětovému zvýšení jejich spotřeby. Benzimidazolová anthelmintika představují velice účinný prostředek pro léčbu helmintóz, ale také poměrně vysoké riziko pro životní prostředí. Benzimidazoly se do půdy a vody dostávají různými cestami (Stuchlíková et al. 2016). Nejdůležitější cestou je exkrece těchto xenobiotik stolicí nebo močí hospodářských zvířat a následným využitím jako hnojivo pro zemědělskou půdu (Navrátilová et al. 2020).

Takto vyloučená anthelmintika mohou zůstat v půdě a odpadních či povrchových vodách, kde se nachází velké množství živých organismů, na které mohou necíleně a chronicky působit. Existuje studie, která se zabývá účinkem fenbendazolu a flubendazolu na vodní ekosystém (Wagil et al. 2014). Toxicita těchto benzimidazolů byla pozorována hlavně u korýšů (*Daphnia magna*). Vysoké riziko toxicity je také prokázáno u fenbendazolu a ivermektinu pro sladkovodní bezobratlé živočichy (Bundschuh et al. 2016). Albendazol kumulující se v půdě zase působí toxicky na půdní živočichy, např. žížalu (*Eisenia fetida*) (Wang et al. 2009).

Kromě účinku na živočichy, mohou benzimidazolová anthelmintika postupně přecházet z půdy a vody do rostlin (Stuchlíková et al. 2017). Na rozdíl od ekologických rizik benzimidazolových anthelmintik studovaných na suchozemských a vodních živočiších, jsou znalosti o toxických účincích anthelmintik na rostliny znatelně menší. V rostlinách se nemusí nacházet pouze základní forma léčiva (aktivní forma) nebo proléčivo. Xenobiotikum se může pomocí biotransformačních enzymů přeměňovat na více či méně toxické metabolity, které ovlivní fyziologii a růst rostlin. Např. při studiu toxicity albendazolu, flubendazolu a fenbendazolu v *Campanula rotundifolia* byla většina biotransformačních produktů považována za deaktivující metabolity bez toxického účinku. Značné množství metabolitů je však nestabilních, takže může jednoduše docházet k jejich zpětné přeměně na základní aktivní formu léčiva (Stuchlíková et al. 2017). Vystavením živých organismů nízkým koncentracím anthelmintického léčiva může dojít k vzniku rezistence (Bártíková et al. 2016).

## 2.5 Analýza léčiv v biologických vzorcích

### 2.5.1 Příprava vzorků

Většina vzorků získaných z biologického materiálu, se v živých organismech nenachází ve formě, která by se dala přímo analyzovat chromatografickými metodami. Je potřeba vzorky nejprve upravit, oddělit jednotlivé analyty, přečistit vzorek, zbavit ho proteinů a dalších nežádoucích látek. Příprava vzorku patří k velice důležitým, ale také časově nejnáročnějším krokům analytického procesu. Může zabírat 60-80 % času celkové manipulace se zkoumaným materiálem a bývá největším zdrojem chyb. Na kvalitě zpracovaného vzorku závisí celý následující proces, identifikace a kvantifikace analytu (Nováková, Douša a kolektiv 2013).

Mnoho laboratoří využívá konvenční techniky úpravy vzorku. Jedná se o nejrozšířenější optimalizované a komerčně dostupné metody s možností reprodukovatelnosti. Mezi tyto techniky řadíme přímou extrakci do rozpouštědla, extrakci na tuhou fázi (SPE), srážení proteinů (PP) a extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE). Nevýhodou těchto metod je jejich pracnost a časová náročnost. Proto byly v posledních několika letech vyvinuty techniky usnadňující zpracování vzorku, umožňující zvýšení účinnosti, snížení objemu vzorku i rozpouštědla a také paralelní zpracování několika vzorků. Příkladem těchto moderních technik může být mikroextrakce do kapalné fáze, mikroextrakce na tuhou fázi nebo sorpční extrakce míchadlem.

#### 2.5.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction)

Jedná se o jednu z nejstarších a nejpoužívanějších extrakčních metod. Tento typ extrakce je založen na separaci jednotlivých složek homogenního roztoku. Dochází k distribuci složek analytu mezi dvě navzájem nemísitelné nebo pouze částečně mísitelné fáze. Těmito fázemi bývá nejčastěji voda a nepolární organické rozpouštědlo (diethylether, hexan nebo ethylacetát). Velmi důležité je, aby byly analyty rozpustné v daném organickém rozpouštědle a nejlépe, aby vykazovaly vysoké rozdělovací (distribuční) koeficienty ( $K$ ).  $K$  rozdělení extrahované látky dochází na základě Nerstonova zákona.

$$K = \frac{c_1}{c_2}$$

Kde  $c_1$  značí rovnovážnou koncentraci rozpuštěné látky ve vodném roztoku a  $c_2$  koncentraci rozpuštěné látky v organickém rozpouštědle. Rozdělovací koeficient vyjadřuje relativní preference rozpuštěné látky pro rozpouštědlo (Berk 2018). Jestliže jsou těmito fázemi voda a oktanol, značí se distribuční poměr písmenem  $P$ . Zlogaritmovaná hodnota  $P$  je závislá

na hodnotě pH, teplotě i iontové síle a je často využívána pro hodnocení polaritý chemických analytů. Pro optimalizaci metody jsou kromě polaritý a rozpustnosti zkoumaných analytů důležité i další fyzikálně-chemické vlastnosti. Základem je struktura a funkční skupiny, jejich molekulová hmotnost, acidobazické vlastnosti, stabilita a fyzikální konstanty (např. absorpční maxima či redoxní potenciál). Při použití LLE dochází k rozdělení polárních analytů od nepolárních nebo k rozdělení sloučenin na základě jejich pH na zásadité, kyselé a neutrální. Výtěžek extrakce  $R_n$  je závislý na velikosti distribučního koeficientu ( $K$ ), na objemech organické ( $V_{org}$ ) i vodné fáze ( $V_{aq}$ ) a také na počtu provedených extrakcí ( $n$ ).

$$R_n = 1 - \left[ \frac{1}{1 + \frac{V_{org}}{V_{aq}} \cdot K} \right]^n$$

Kyselé a bazické organické sloučeniny můžou být ve vodné fázi ve dvou formách – iontové nebo neutrální. Tyto dvě formy však nemají stejný distribuční koeficient. Záleží na hodnotách pKa a pH roztoku, ve kterém se nacházejí. Často je dobré upravit pH vodné matrice na hodnotu o dvě jednotky vyšší než je pKa základního bazického analytu nebo o dvě jednotky pH nižší než je pKa kyselého analytu. K účinné extrakci je nutný výskyt analytu ve formě volné báze či kyseliny alespoň z 95 %. Doporučuje se použít kyselé nebo zásadité pH také z toho důvodu, aby se neextrahovaly nečistoty (např. estery cholesterolu). V průběhu extrakčního procesu by měla být směs matrice a rozpouštědla mnohokrát protřepávána, aby byl zajištěn dostatečný vzájemný kontakt obou kapalných fází (Kyle 2017).

Pokud se ve vzorku nevyskytuje dostatečné množství analytu, využívá se zpětná extrakce z organického rozpouštědla do vodného. V případě amorfních či iontových sloučenin se pro zvýšení účinnosti volí iont-párová extrakce, při které vznikají komplexy iontu analytu a protikladně nabitého iontu.

Nevýhodou LLE je tvorba zákalu, emulzí a poměrně vysoká spotřeba organických rozpouštědel. Vzniklý extrakt nemusí být kompatibilní s analytickým systémem. Vzorek s organickým rozpouštědlem je nutné před nástřikem odpařit a vzniklý odparek rozpustit ve vhodné mobilní fázi. Na druhou stranu tato metoda nevyžaduje žádné složité přístrojové vybavení a dá se využívat pro širokou škálu analytů (Nováková, Douša a kolektiv 2013).

## 2.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Zkratka HPLC pochází z anglického High Performance Liquid Chromatography. Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu, která se již mnoho let používá ve výzkumném, klinickém i průmyslovém odvětví. Představuje citlivou a specifickou metodu pro stanovování reziduí pesticidů v životním prostředí, poskytuje možnost komplexní analýzy potravin, díky které je zajištěna jejich dostatečná kvalita a bezpečnost. Další využití nachází při toxikologických a forenzních analýzách nelegálních látek nebo při biomedicínských výzkumných objevech nových biomarkerů. Významnou roli hrají i ve farmaceutickém průmyslu při stanovování léčiv či při analýze speciálních chemikálií, kosmetických přípravků nebo paliva (Web 12). Zkratka slouží k separaci, identifikaci a kvantifikaci různorodých analytů (Hussain 2021).

Principem této metody je distribuce analyzovaných látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze – nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Komplexní směs analytů je spolu s mobilní fází (MF) přiváděná pomocí vysokotlakého čerpadla do chromatografické kolony na které dochází k separaci jednotlivých analytů. Kolony pro HPLC analýzu nalezneme v různých délkách podle potřeby analýzy. Nejčastěji se však setkáme s kolonami s délkou 100-250 mm s vnějším průměrem 4,6 mm s částicemi o velikosti 5  $\mu\text{m}$ . V chromatografické koloně se nachází stacionární fáze (SF) ve formě sorbentu nebo monolitu (Fekete et al. 2014, Guillaume et al. 2014). Na základě vlastností jednotlivých složek směsi se analyty mohou vázat na stacionární fázi a být zadržovány delší dobu na koloně nebo mohou být unášeny a eluovány z kolony pomocí mobilní fáze za velice krátký čas. Separační proces může být ovlivněn volbou stacionární i mobilní fáze. Stacionární fází může být kapalina i pevná látka, mobilní fází u HPLC představuje vždy kapalina.

Pokud má mobilní fáze po celou dobu separace stejné složení, jedná se o isokratickou eluci. Složení mobilní fáze se však může měnit ve prospěch složky s vyšší eluční silou. V tomto případě se jedná o gradientovou eluci. Využití isokratické eluce je vhodné při stanovování látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Při gradientové eluci se stanovují látky rozdílných fyzikálně-chemických vlastností (Nováková, Douša a kolektiv 2013).

Existují dvě varianty uspořádání separačních módů založených na charakteru mobilní a stacionární fáze. U normálního uspořádání je SF polárnější než MF. Jako stacionární fáze se používá např. polární silikagel a mobilní fáze je zastoupena nepolárními rozpouštědly, např. hexanem, pentanem, xylenem, toluenem. V případě reverzního uspořádání je tomu přesně naopak. SF má nepolární charakter a MF je polárnější. Stacionární fáze bývají chemicky

modifikované tak, aby se snížila jejich polarita (např. navázání alkylového uhlíkového řetězce viz 5.2.3.1). Tento typ separačního módu je u HPLC využíván častěji (Kovaříková, Stariat).

### 2.5.2.1 UHPLC

Zkratka UHPLC pochází z anglického Ultra High Performance Liquid Chromatography, což v překladu znamená ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V současné době je hlavním cílem kapalinové chromatografie zajistit velice účinnou separaci analytů v co nejkratší době. A právě tohle nám umožňuje UHPLC. První komerčně dostupný systém byl vyvinut v roce 2004 společností Waters.

Od běžné HPLC se liší hlavně rozměry kolon, částic a velikostí pracovního tlaku. UHPLC systém využívá chromatografické kolony o velikosti 50-100 x 2,1 mm s plně porézními částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . Zmenšení částic vedlo ke snížení odporu proti převodu hmoty, zvýšení účinnosti separace a zkrácení doby analýzy. Došlo však také ke zvýšení zpětného tlaku, který je malými částicemi SF generován. Z toho důvodu bylo nutné upravit chromatografickou instrumentaci, tak aby byla kompatibilní s tlakem 600-1500 barů (HPLC 400 barů). Další výhodou UHPLC oproti HPLC jsou nižší náklady na analýzu a více kvalitativních informací (Fekete et al. 2014, Guillarme et al. 2014, Borovcová et al. 2019).

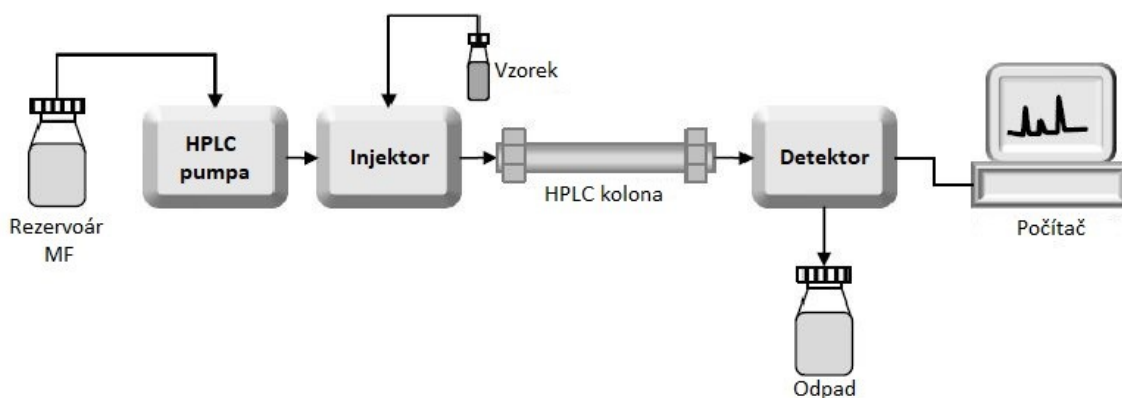
### 2.5.2.2 Instrumentace HPLC

Zařízení, na kterém se uskutečňuje HPLC analýza, označujeme jako kapalinový chromatograf. Skládá se z několika základních komponent, které lze do jisté míry obměňovat. Moderní systémy HPLC umožňují zařadit komponentu navíc nebo naopak některou ubrat.

Počáteční částí kapalinového chromatografu je rezervoár mobilní fáze. V rezervoáru je uchovávána MF a následně pomocí vysokotlakého čerpadla (pumpy) transportována do dalších částí HPLC systému. V případě, že je rezervoárů mobilní fáze více, je ještě před čerpadlem umístěn směšovač. Při gradientové eluci, kdy jsou použity dvě vysokotlaká čerpadla, se směšovač nachází až za čerpadly. (Nováková, Douša a kolektiv 2013). Pro úspěšný separační proces je důležité odplynění MF probubláváním heliem nebo pomocí vakuového odplynovače. Následuje dávkovací zařízení vzorku, ve kterém za pomoci autosamplerů nebo vysokotlakých ventilů s dávkovací smyčkou dochází k nastříkání vzorku (Cibiček, Vacek a kol. 2014). Předkolona brání zanesení kolony zbytky matrice vzorku. K vlastní separaci analytů dochází na koloně (web 7). Jelikož teplota na chromatografické koloně má výrazný vliv na kvalitu separace, bývá umístěna



v termostatovaném prostoru. Z kolony se mobilní fáze s analyzovanými látkami dostává do detektoru. Celý systém je zakončen počítačem s vhodným chromatografickým softwarem (Web 15).

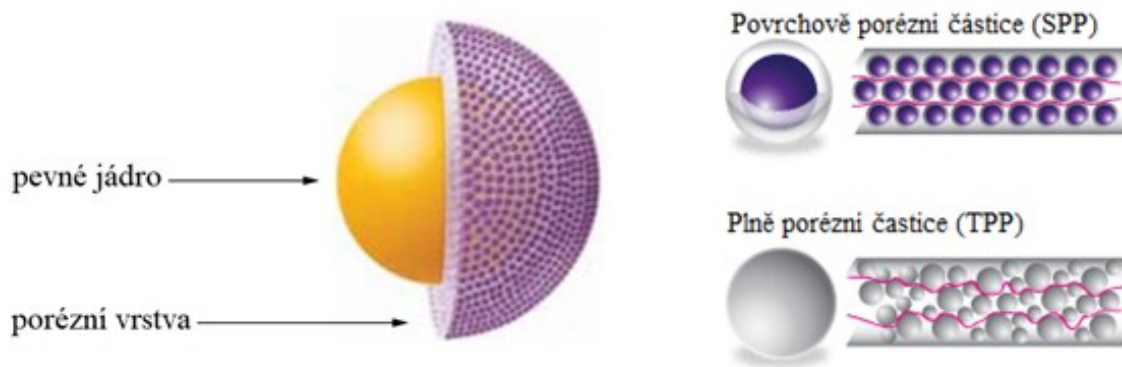


**Obrázek 9** - Základní schéma instrumentace HPLC

(<https://laboratoryinfo.com/hplc/>, upraveno)

### 2.5.2.3 Stacionární fáze (SF)

Stacionární fáze je nepohyblivá složka chromatografického systému. Může se jednat buď o tuhou látku nebo o kapalinu navázanou na tuhý nosič. Stacionární fáze je velice důležitou součástí chromatografického systému, protože právě na ní dochází k vlastní separaci analytů. Struktura SF může výrazně ovlivnit separační proces. Tato fáze je ve formě sorbentu umístěna v chromatografických kolonách. Na základě jejich charakteru je můžeme rozdělit na monolitické a náplňové. Vnitřní část náplňových kolon tvoří plně porézní částice (TPP = totally porous particle) o definované velikosti, které zajišťují určitý odpor proti toku MF. Čím jsou tyto částice menší, tím je odpor větší. S rozvojem chromatografických metod a požadavky na zrychlení separace, došlo k naplnění kolon povrchově porézními částicemi (SPP = superficially porous particles, někdy také označované core-shell částice). Tyto částice mají pevné jádro (průměr 1,7  $\mu\text{m}$ ), které obklopuje porézní vrstva oxidu křemičitého (tloušťka 0,5  $\mu\text{m}$ ). Protože k difúzi dochází pouze v porézním vnějším plášti, zvyšuje se účinnost ve srovnání s TPP stejné velikosti. V praxi bude 2,7  $\mu\text{m}$  SPP poskytovat účinnost srovnatelnou s 1,8  $\mu\text{m}$  TPP. Zpětný tlak bývá většinou pod 400 barů (Borovcová et al. 2019, Agilent Technologies).



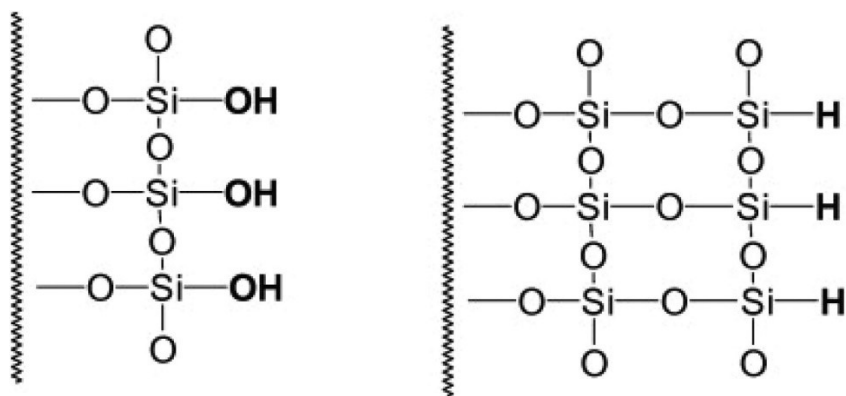
**Obrázek 10** – Povrchově porézní částice (SPP)

(<https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>)

Monolitické kolony jsou pouze z jednoho kusu sorbentu obsahující dva typy pórů. Velké (makropóry) jsou zodpovědné za transport MF a středně velké (mesopóry) se podílejí přímo na separaci analyzovaných látek.

## Silikagel

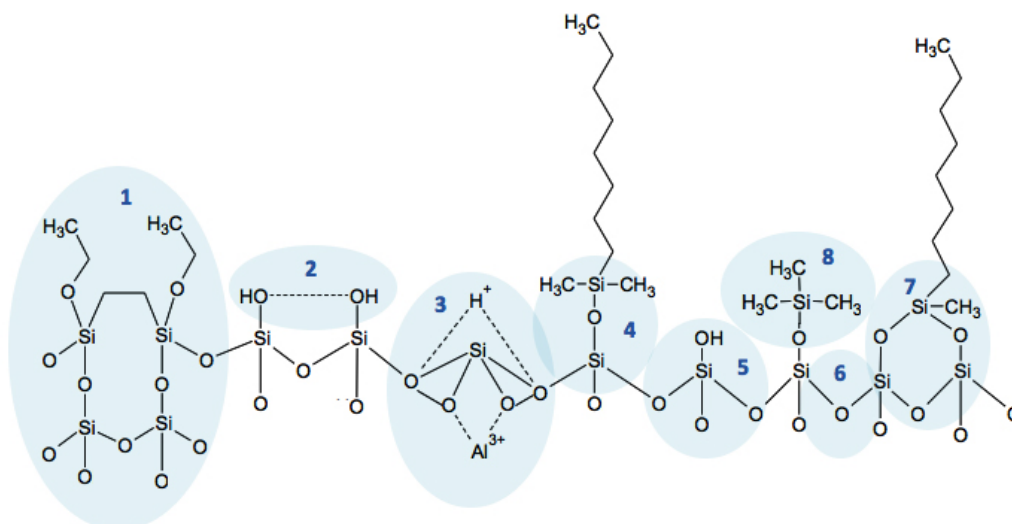
Nejvýznamnějším a nejčastěji používaným materiálem na výrobu stacionárních fází používaných u HPLC a UHPLC analýzy jsou silikagely. Jednou ze základních vlastností, která umožňuje použití silikagelu při vysokém tlaku, je jeho mechanická odolnost. Silikagel se běžně vyskytuje v amorfni porézní podobě. Nejčastějším materiálem používaným pro přípravu silikagelu je oxid křemičitý, na který se chemicky naváže voda za vzniku silanolových skupin (Si-OH). Díky moderním technologiím lze tento sorbent vyrobit v čisté formě s předem definovanými fyzikálními vlastnostmi. Typ A je připravován precipitací částic oxidu křemičitého (tzv. sol-gel metodou). Tento typ silikagelu obvykle obsahuje vysoké množství kovů ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), které mohou být příčinou vzniku asymetrických píků a snížení účinnosti. Aby se minimalizovalo množství kovů navázaných na oxid křemičitý a zlepšil se tvar píku, používá mnoho výrobců promytí silikagelu kyselinami. Je vhodný pro separaci neutrálních a kyselých látek. Typ B je velice čistý silikagel s minimální kontaminací kovy. Vzniká polymerací organosilanu, např. tetraethoxysilanu. Používá se při analýze neutrálních a bazických látek. Na rozdíl od typu A je však mnohem méně stabilní. Třetím typem silikagelu je hydrosilovaný silikagel (typ C). U tohoto typu silikagelu dochází až k 95% záměně Si-OH za Si-H skupiny. Hydrosilovaný silikagel je velice odolný vůči mechanickým vlivům a také stabilní ve velkém rozsahu hodnot pH i teplot.



**Obrázek 11** - Silikagel typu C (záměně Si-OH skupiny za Si-H)

(<https://academic.oup.com/view-large/figure/74863600/bmu09002.jpeg>)

Pro HPLC analýzu je vyráběn silikagel se specifickým povrchem o velikosti 100-500 m<sup>2</sup>/g a s přesně definovaným průměrem částic od 3 μm do 5 μm. U UHPLC systémů je velikost částic náplně < 2 μm. Kromě velikosti částic lze při přípravě rozhodovat i o velikosti pórů. Střední průměr pórů bývá v rozmezí 8-15 nm. Čím větší je však průměr pórů, tím menší je specifický povrch silikagelu a následné zadržování analytů. Na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny, které zajišťují polární vlastnosti a kyselost tohoto sorbentu. Z toho důvodu silikagel mnohem méně zadržuje látky kyselé a neutrální než látky bazické povahy (web 16). Hlavním problémem běžného silikagelu je jeho nízká teplotní a chemická stabilita. Limitem pro použití tohoto sorbentu je pH 2-7, tlak v rozmezí 35-40 MPa a teplota do 60 °C. Aby se tyto nevýhody minimalizovaly, dochází k jeho modifikaci. Příkladem může být zavedení polární skupiny do organického uhlíkového řetězce SF, stérická ochrana volných silanolů, navázání monofunkčního (4) nebo polyfunkčního (7) ligandu, endcapping (maskování volných silanolových skupin, (8) nebo vytvoření hybridních sorbentů (1) (Nováková, Douša a kolektiv 2013, Borges 2015).



**Obrázek 12** - Povrch silikagelu s různými modifikacemi – silikagel typu A (3), silikagel typu B (2)  
 (<https://www.crawfordscientific.com/media/wysiwyg///Technical/Tech-Tips/May2013/contrived-silica-surface.jpg>)

### Další typy stacionárních fází

Základem chemicky vázaných fází je silikagel, na který se vhodnou reakcí vážou další ligandy. Jednou z výhod, kterou se tyto fáze vyznačují, je minimální vymývání SF a téměř žádné rozpouštění v MF. Také nevykazují příliš vysokou citlivost na zvýšení či snížení teploty nebo změnu složení MF. Díky této vlastnosti nedochází k narušení rovnováhy na koloně při zvolení jiných podmínek separačního procesu (web 16). Mezi chemicky vázané polární fáze řadíme aminopropyl, kyanopropyl a pentafluorfenylpropyl. Chemicky vázané nepolární fáze mohou být etherového typu (-Si-O-C). Tyto vazby neposkytují stabilitu vůči hydrolyze. Dalším typem vazby, odolnějším vůči hydrolyze, je -Si-N-C a -Si-O-Si-C vazba. Charakter ligandu se označuje zkratkou, která často udává počet C v řetězci (web 16). Nejčastěji používanou chemicky vázanou nepolární fází je alkyl C18 (oktadecylsilikagel).

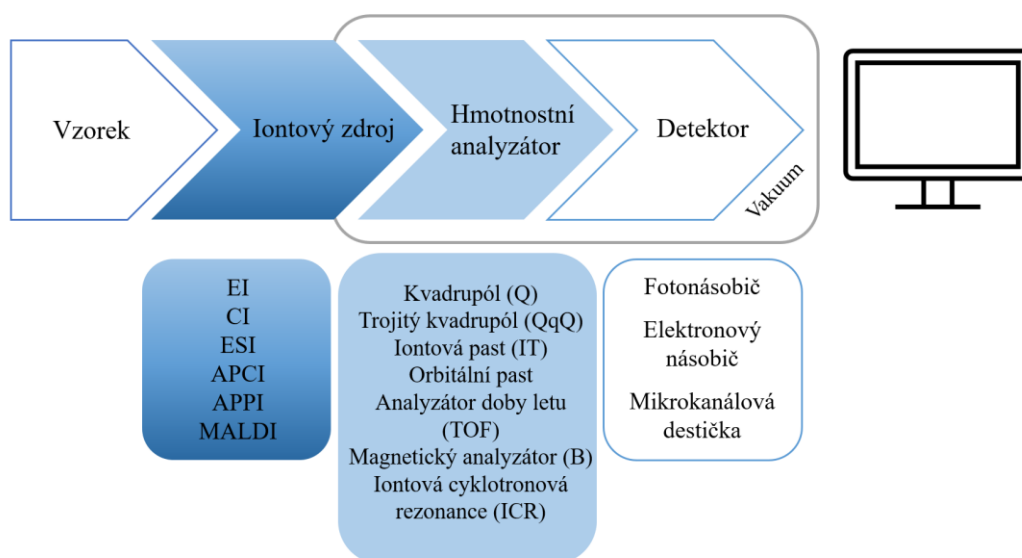
Dalším typem stacionárních fází jsou polymery. Na rozdíl od silikagelu jsou polymerní stacionární fáze stabilní v širším rozsahu pH a teplotě do 200 °C. Tyto SF mají velký absorpční povrch, který obsahuje mikropóry. Nevýhodou mikroporézní struktury je omezení přenosu hmoty u drobných molekul analytů, což vede k menší účinnosti separace. Dalším omezením polymerů je maximální tlak (20 MPa). V dnešní době se využívají pro výrobu SF kromě oxidu křemičitého také další oxidy kovů, nejčastěji oxid zirkoničitý. Je odolný vůči vysokým teplotám (do 200 °C) i tlakům. Další předností je stabilita v celém rozsahu pH. Výhodou grafitovaného uhlíku jako SF je jeho vysoká adsorbční schopnost, teplotní odolnost

a stabilita v celém rozsahu pH. Jistou nevýhodou je však tvorba chvostujících píků a nižší účinnost (v porovnání se silikagelem) (Nováková, Douša a kolektiv 2013).

### 2.5.3 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometrie je citlivá, selektivní a rychlá metoda s velice rozmanitým využitím v analytické chemii. Její aplikace je v současnosti rozšířena do několika oblastí. Využívá se při kontrole ovzduší, potravinové, farmaceutické či biochemické analýze. Uplatnění nachází i ve forenzních vědách, atomové fyzice a mnoha dalších odvětvích. Velký význam má při spojení s určitými separačními technikami (Gross 2011). Základním principem MS je převedení anorganických nebo organických molekul na ionty, oddělení těchto iontů podle poměru hmoty a náboje ( $m/z$ ) a závěrečná kvalitativní i kvantitativní detekce jednotlivých iontů. Kromě informací o hmotnosti iontů či iontových fragmentů, poskytuje MS údaje o základním složení analytů a izotopovém zastoupení prvků (Gross 2011, Hoffmann a Stroobant 2007).

Hmotnostní spektrometr (MS) je složen z iontového zdroje, ve kterém probíhá ionizace neutrálních molekul a sondy sloužící k dávkování analytů. Poté jsou vzorky iontovou optikou převedeny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení podle velikosti  $m/z$ . Signál jednotlivých iontů je zachycen a určen v detektoru. Výstupem je záznam dat ve formě hmotnostního spektra zachycující intenzitu signálu. Dále jsou tyto informace ukládány do počítače a srovnávány se spektry známých látek. Analýza i detekce iontů probíhá v prostředí s vysokým vakuem (Nováková, Douša a kolektiv 2013).



Obrázek 13 - Schéma hmotnostního spektrometru (vytvořeno podle Nováková, Douša a kolektiv 2013)

### 2.5.3.1 Ionizace

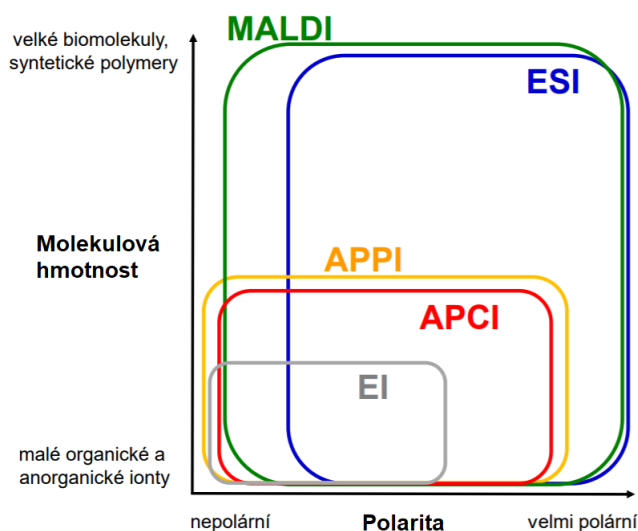
Jedná se o proces, při kterém se z neutrálních molekul analyzovaných látek stávají ionty s kladným či záporným nábojem. Existuje více možností ionizace. V případě tvrdé ionizační techniky (např. elektronová ionizace) získává analyzovaná molekula velké množství vnitřní energie. Odštěpuje se valenční elektron a vzniká mnoho fragmentů. Tento typ ionizace je závislý na těkavosti látek, proto se více využívá ve spojení s plynovou chromatografií. Měkké ionizační techniky jsou typické vytvářením deprotonovaných nebo protonovaných molekul (Cibiček, Vacek a kol. 2014). Na rozdíl od elektronové ionizace je u těchto metod fragmentace minimální. Volba typu ionizace je závislá na polaritě, chemické struktuře, těkavosti, tepelné stabilitě i molekulové hmotnosti látky. S HPLC jsou spojovány převážně měkké ionizační techniky (Nováková, Douša a kolektiv 2013).

**Tabulka 3** - Ionizační techniky (Web 13, Gottvald 2013)

Název ionizační techniky	Zkratka	Typ ionizační techniky	Průběh	Vytvořené ionty	Vhodný analyt	Aplikace
<b>Elektronová ionizace</b>	EI	tvrdá	Za sníženého tlaku	$M^+$ • $M^-$ •	Těkavé a termostabilní látky	GC-MS
<b>Chemická ionizace</b>	CI	měkká	Za sníženého tlaku	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	Malé těkavé molekuly	GC-MS
<b>Fotoionizace za atmosférického tlaku</b>	APPI	měkká	Za atm. tlaku (API technika)	$[M+H]^+$ $[M+X]^+$ $[M-H]^-$	Nepolární až středně polární, labilní látky	HPLC-MS
<b>Chemická ionizace za atmosférického tlaku</b>	APCI	měkká	Za atm. tlaku (API technika)	$[M+H]^+$ $[M+X]^+$ $[M-H]^-$	Nepolární až středně polární látky	HPLC-MS
<b>Ionizace elektrosprejem</b>	ESI	měkká	Za atm. tlaku (API technika)	$[M-nX]^{n-}$ $[M+nH]^{n+}$ $[M+Na]^+$	Středně polární až iontové látky	HPLC-MS
<b>Ionizace desorpce laserem za účasti matrice</b>	MALDI	měkká	Za sníženého tlaku	$[M+H]^+$ $[M+X]^+$	Velké netěkavé molekuly	HPLC-MS

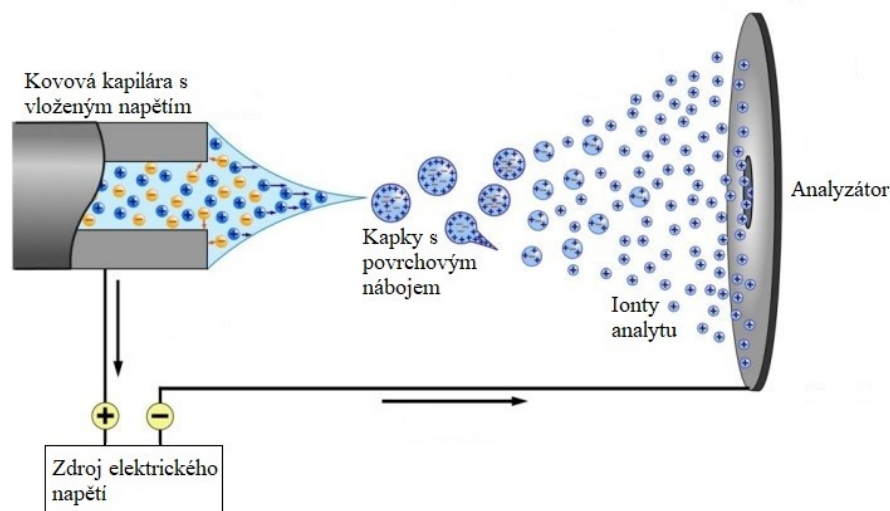
## Ionizace elektrosprejem (ESI)

ESI je jednou z nejčastěji používaných technik ionizace ve spojení s HPLC/MS. Jedná se o měkkou, velmi šetrnou ionizační metodu, která bývá prováděna za atmosférického tlaku (API technika = Atmospheric Pressure Ionization). Je vhodná pro analýzu širokého spektra látek. Tato ionizační technika se volí v případě středně až silně polárních analytů, malých organických a anorganických molekul, ale i velkých biomolekul a polymerů.



Obrázek 14 - Volba ionizační techniky (web 13, upraveno)

ESI používá elektrickou energii k usnadnění přenosu iontů z roztoku do plynné fáze, než jsou podrobeny hmotnostní spektrometrické analýze. Roztok analyzovaného vzorku musí být nejprve přenesen ze separační kapiláry, na kterou je aplikováno vysoké napětí (3-6 kV), do iontového zdroje. Na výstupu z hrotu elektrospreje vzniká mlha tvořena kapičkami, které nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Mezitím vlivem zvýšené teploty a proudu sušícího plynu (dusík) dochází k odpařování rozpouštědla, které vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje a k postupnému zmenšování nabitých kapiček. Když intenzita elektrického pole v kapičce dosáhne kritického bodu, kapička se rozpadne a náboje se rozprostřou na povrch menších kapiček (Coulombická exploze). Opakováním tohoto procesu dojde k uvolnění jednotlivých iontů do plynné fáze. Vyzařované ionty jsou následně transportovány z oblasti atmosférického tlaku do hmotnostního analyzátoru (vakua) pro následnou analýzu molekulové hmotnosti a měření iontové intenzity (Web 13, Ho et al. 2003).



**Obrázek 15** - Schéma ionizace elektrosprejem ([https://i1.wp.com/bioexcel.eu/wp-content/uploads/2019/03/ESI-IM\\_MS.jpg?resize=1024%2C576&ssl=1](https://i1.wp.com/bioexcel.eu/wp-content/uploads/2019/03/ESI-IM_MS.jpg?resize=1024%2C576&ssl=1), upraveno)

Distribuce analytu na povrchu kapiček závisí na jeho koncentraci a rozpustnosti. Méně rozpustné látky se drží spíše na povrchu, což ovlivňuje jejich ionizační účinnost. Kromě analytu se na povrchu kapiček můžou generovat další složené ionty, které konkurují molekulám analytu a vedou k vzniku maticových efektů. Tyto efekty můžou negativně ovlivňovat ESI. Proto je důležité zvolit vhodnou techniku přípravy vzorku, která odstraní interferující sloučeniny. Použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo separace kapilární elektroforézou před ionizací elektrosprejem může minimalizovat maticový účinek.

### 2.5.3.2 Analyzátoři

Hlavní funkcí analyzátorů je rozdělení iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje následné urychlení a transport těchto iontů do detektoru, kde jsou detekovány a převedeny na digitální záznam. Existuje několik druhů analyzátorů, které separují ionty na základě různých fyzikálních principů. Nejjednodušší dělení je na analyzátoři průletové a pastové.

**Tabulka 4** - Dělení analyzátorů na průletové a pastové

Průletové analyzátoři	Pastové analyzátoři
Kvadrupóly (Q)	Lineární iontové pasti (LIT)
Analyzátoři doby letu (TOF)	Sférické iontové pasti (IT)
Elektromagnetické sektory (B)	Orbitální pasti (Orbitrap)
	Iontové cyklotronové rezonance (ICR)



Volba analyzátoru závisí na řadě faktorů. Jedním z nich může být požadovaný rozsah  $m/z$ , rozlišovací schopnost či detekční limit analyzátoru. Výběr analyzátoru není závislý pouze na jeho parametrech, ale také na vlastnostech analytu po ionizaci a na požadavcích prováděného experimentu – citlivost, účinnost a rychlost analýzy (Haag et al. 2016).

Kvalitu separace iontů udává rozlišovací schopnost (RP). Tento parametr může být definován jako poměr hmotnosti iontu  $m$  k šířce tohoto iontu  $m$  v polovině jeho výšky. Podle tohoto parametru můžeme rozdělit analyzátor s vysokou RP ( $>10\ 000$ ) a analyzátor s nízkou RP ( $<10\ 000$ ).

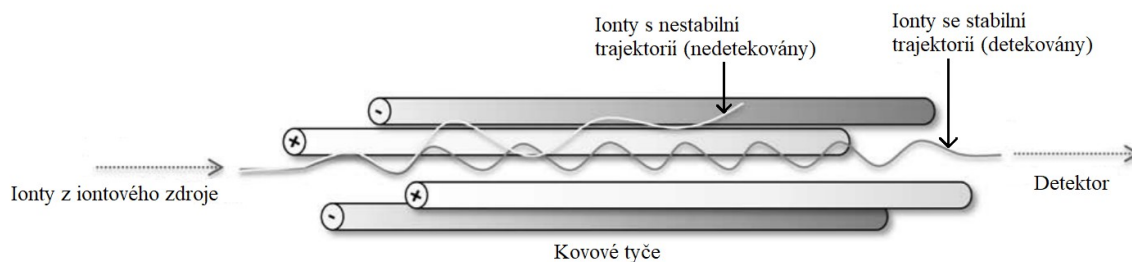
**Tabulka 5** - Dělení analyzátorů podle rozlišovací schopnosti (RP)

<b>Analyzátor s vysokou RP</b>	<b>Analyzátor s nízkou RP</b>
Iontová cyklotronová rezonance (ICR)	Kvadrupóly (Q)
Orbitální past (Orbitrap)	Sférická iontová past (IT)
Analyzátor doby letu (TOF)	Lineární iontové pasti (LIT)
Elektromagnetické sektory (B)	

V praxi se často používá spojení dvou odlišných analyzátorů (hybridní analyzátor) nebo spojení dvou či více stejných analyzátorů (tandemové hmotnostní analyzátor) (Web 8).

### **Kvadrupól (Q)**

Kvadrupólový analyzátor rozděluje ionty na základě stability jejich letových drah. Je jedním z široce používaných hmotnostních spektrometrů. Důvodem je nejen jeho jednoduché použití, ale také nízká pořizovací cena a snadný postup při jeho sestavování. Jedná se nejčastěji o čtyři kovové paralelně uspořádané tyče kruhového průřezu. Každé dvě protilehlé tyče jsou navzájem elektricky spojeny. Střídáním stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí dochází ke vzniku oscilace iontů v kvadrupólu. Pouze ionty o určitém poměru  $m/z$  budou mít v daném okamžiku stabilní letovou dráhu. Tyto ionty projdou kvadrupólem až k detektoru. Ostatní se srazí s tyčemi a k detektoru se vůbec nedostanou (Dunn 2011, Clarke 2017, Smith 2013). Postupnou změnou hodnot napětí projdou k detektoru všechny ionty (Web 8).



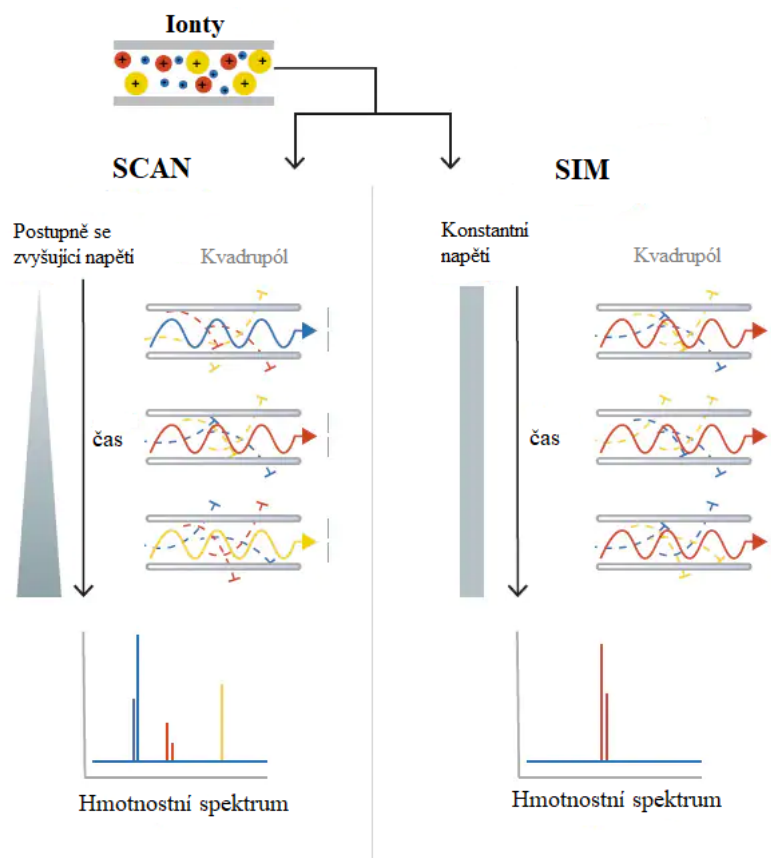
**Obrázek 16** - Kvadrupól (Q) (Friedecký a Lemr 2012, upraveno)

### Trojité kvadrupól (QqQ)

Trojité kvadrupól se skládá ze tří kvadrupólů uspořádaných za sebou. Dva z nich slouží jako hmotnostní analyzátoři, třetí (prostřední) jako kolizní cela. V prvním kvadrupólu (Q1) dochází k výběru iontů. Tyto ionty následně putují do kolizní cely (q, CID), kde se srazí s molekulami kolizního plynu. Jako kolizní plyn se používá argon či dusík. Vlivem srážek získají ionty vyšší vnitřní energii a dojde k jejich fragmentaci. Ve třetím kvadrupólu (Q3) jsou jednotlivé fragmenty analyzovány (Friedecký a Lemr 2012, Xian et al. 2015).

Trojité kvadrupól je jedním z nejčastěji používaných hmotnostních analyzátorů z několika důvodů. Vyznačuje se velkým množstvím různých nastavení pro širokou škálu experimentů, jedná se o univerzální analyzátor. Vykazuje také velice dobrou rychlost a citlivost skenování (maximální rychlost skenování je 15 000 amu/s). Jeho hmotnostní rozsah může dosahovat 2000-3000  $m/z$ . Používá se nejen pro kvalitativní analýzu, ale při použití režimu SIM může poskytovat i vysoce citlivou kvantitativní analýzu. Další velkou výhodou tohoto analyzátoru je možnost současného sledování více vybraných iontů s různou polaritou. Naopak nevýhodou trojitého kvadrupólu je, že poskytuje nižší rozlišení (cca 1000), než některé jiné alternativy (např. TOF) a také se vyznačuje poměrně nízkou správností určení hmoty (cca 100 ppm) (Prasain 2012, web 6, Ho et al. 2013).

Variabilita nastavení kvadrupólů umožňuje měření v několika různých režimech a módech. Analýza může probíhat v režimu statickém (SIM = měří se jeden vybraný  $m/z$ ) a skenovacím (SCAN = měří se rozsah poměrů  $m/z$ ), které vedou k vzniku čtyř typů záznamů (web 6).



**Obrázek 17** - Analýza ve skenovacím (SCAN) a statickém (SIM) režimu (Web 6, upraveno)

SCAN = Skenovaný rozsah hmotnosti se skenuje postupně s určitými prodlevami pro každou hodnotu  $m/z$ . Nejprve projdou kvadrupólem modré ionty, poté červené ionty, následně žluté ionty a jsou postupně detekovány. SIM = Monitoruje se jen jedna vybraná hodnota  $m/z$ . Červený iont projde kvadrupólem a je detekován.

**Tabulka 6 - Typy záznamů (Friedecký a Lemr 2012; Nováková, Douša a kolektiv 2013)**

Typ skenu	Q1	CID	Q3	Typ skenu
<b>Sken produktových iontů</b>	fixní m/z	+	skenuje	kvalitativní
<b>Sken prekurzorových iontů</b>	skenuje	+	fixní m/z	kvalitativní
<b>Sken neutrálních ztrát</b>	skenuje	+	fixní m/z	kvalitativní (kvantitativní)
<b>Selektivní záznam jedné (SRM) nebo více reakcí (MRM)</b>	fixní m/z	+	skenuje	kvantitativní

Při spojení LC-MS s trojitým kvadrupólem se velice často využívá SRM/MRM záznam, především při kvantifikaci analytů ve složitých směsných vzorcích. V prvním kvadrupólu (Q1) dochází k izolování cílového prekurzorového iontu, v druhém (CID) k jeho fragmentaci

a ve třetím kvadrupólu (Q3) k monitorování specifického fragmentovaného iontu (Volný 2020, Prasain 2012).

### 2.5.3.3 Vyhodnocení chromatogramu

Jedním ze základních způsobů kvantitativního hodnocení je metoda vnitřního standardu založena na přidávání roztoku vnitřního standardu o známé koncentraci k analyzovanému vzorku i standardu. Přidávaný interní standard je chemická látka, která má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako stanovovaný analyt a je dobře separovatelná od všech složek analyzované směsi. Zároveň je důležité, aby se eluovala v blízkosti měřeného analytu a byla přidávána ke každému vzorku ve stejném (obvykle známém) množství. Přidává se z důvodu kompenzace případných ztrát při zpracovávání vzorku nebo aby vyvážila chování odlišných molekul obsažených ve vzorcích. V MS analýze slouží také ke kompenzaci účinnosti a potlačování ionizace, která bývá způsobena matricovými efekty (web 16, Nováková, Douša a kolektiv 2013, web 6, Volný 2020).

Metoda vnitřního standardu má dvě varianty. Metoda přímého porovnání je založena na přidání konkrétního objemu interního standardu  $V_{IS}$  o známé koncentraci  $c_{IS}$  ke vzorku, u kterého neznáme přesnou koncentraci analyzované látky  $c_x$  a k roztoku referenčního standardu o známé koncentraci  $c_S$ . Po analýze získáme chromatogram, ze kterého stanovíme plochu píku pro analyt  $A_i$  a interní standard  $A_{IS,i}$  a další chromatogram s píkem pro referenční standard  $A_S$  a pro interní standard  $A_{IS,s}$ . Neznámou koncentraci analytu  $c_x$  získáme výpočtem:

$$c_x = \frac{A_i}{A_S} \cdot \frac{A_{IS,s}}{A_{IS,i}} \cdot c_S$$

U metody kalibrační křivky se k sérii standardních roztoků přidá stejný objem  $V_{IS}$  interního standardu o známé koncentraci  $c_{IS}$ . Změřením koncentrace analytu  $c_s$  a zjištěním poměru ploch píku analytu  $A_S$  a interního standardu  $A_{IS}$  je vytvořena kalibrační křivka, ze které se přímo odečítá koncentrace analyzované látky  $c_x$  (Nováková, Douša a kolektiv 2013, Dolan 2012).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo získat nové poznatky o cirkulaci ABZ v životním prostředí, konkrétně o přestupu ABZ a jeho transformačních produktů ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> z trusu ovce domácí (ošetřené tímto léčivem) do jetele lučního (*T. pratense*) a tolice vojtěšky (*M. sativa*) v reálných polních podmínkách.

Jednotlivé cíle:

- Kvantifikovat parentní látku a příslušné transformační produkty v jeteli lučním (*T. pratense*) a tolici vojtěšce (*M. sativa*) po aplikaci trusu na pastvině.
- Zjistit do jaké vzdálenosti od trusu jsou parentní látka a její transformační produkty detekovatelné v rostlinách.
- Zjistit, jak dlouho po aplikaci trusu jsou parentní látka a její transformační produkty detekovatelné v rostlinách.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

#### 4.1.1 Chemikálie

- Albendazolová suspenze Aldifal, Mikrochem s.r.o. – Pezinok, Slovensko
- Ethylacetát (stupeň HPLC), VWR International s.r.o. – Praha, ČR
- Amoniak (vodný roztok) 28%, VWR International s.r.o. – Praha, ČR
- Acetonitril (ACN) (stupeň UHPLC-MS), VWR International s.r.o. – Praha, ČR
- Ultra-čistá voda, připravena pomocí Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO,  $\geq 99,9\%$ ), Sigma-Aldrich – Praha, ČR
- Kyselina mravenčí (LC-MS LiChropur™, 97,5-98,5%), Sigma-Aldrich – Praha, ČR
- Albendazol, analytický standard ( $\geq 98\%$ , 54965-21-8), Sigma-Aldrich
- Albendazol sulfoxid VETRANAL®, analytický standard (54029-12-8), Sigma-Aldrich
- Albendazol sulfon VETRANAL®, analytický standard (75184-71-3), Sigma-Aldrich
- Mebendazol VETRANAL™, analytický standard (31431-39-7), Sigma-Aldrich

#### 4.1.2 Přístrojové vybavení

- Lyofilizátor, ThermoFisher
- Analytické váhy, SCALTEC
- Automatické pipety, Eppendorf
- Homogenizér kuličkový, FastPrep24
- Třepačka Multi Reax, Heidolph
- Ultrazvuková lázeň, Kraintek
- Centrifuga, Biofuge Stratos Heraeus
- Koncentrátor 5305, Eppendorf
- Systém čištění vody Millipore, Milli – Q
- Roler, DLAB
- UHPLC/MS (LCMS 8030 Triple Quadrupole Mass Spectrometer), Shimadzu
- Lednice a mrazicí boxy

### 4.1.3 Pomůcky

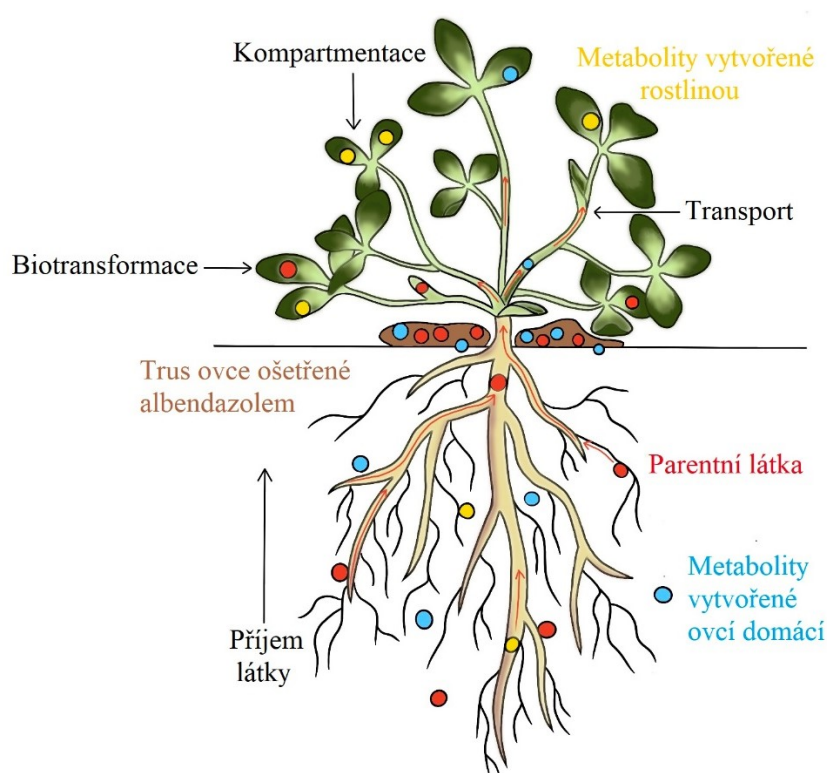
- Plastové nádoby (15 ml), Eppendorf
- Mikrozkušavky (5.0 ml), Eppendorf
- Pinzeta, laboratorní lžička
- Porcelánová třecí miska s tloučkem
- Stojánky na zkumavky a vialky
- Jednorázové špičky
- Homogenizační kuličky
- Rukavice – latex, nitro
- Vialky (1 ml), Agilent Technologies
- Přístroj na popisování vialek
- Injekční stříkačky (1 ml), MEDILAB ČR, s. r. o.
- LUT stříkačkové filtry PTFE (4 mm, 0,22  $\mu\text{m}$ , pk/1000; PL70A-102), Labstorel  
European Laboratory Footprint
- Inserty (<1  $\mu\text{L}$ , C4011-631), ThermoScientific
- Ostatní běžné laboratorní pomůcky



## 4.2 Hnojení pole a odběr vzorků

První část experimentu probíhala v přirozených podmínkách na poli v Býšti – Zemědělská akciová společnost Býšť, 533 22 Býšť 169. Na začátku března 2020 bylo pole pohnojeno trusem od zvířat léčených ABZ. Trus byl sbírán 24 hodin po aplikaci ABZ (v dávce 10 mg/kg živé hmoty) 10 samostatně ustájeným beránkům (stáří maximálně 1. rok). Celkové množství nasbíraného trusu přesahovalo 5 kg. Reprezentativní vzorek (1500 g trusu) byl získán metodou kvartace.

Pro experiment bylo vybráno 16 centrálních rostlin (8 rostlin *T. pratense* a 8 rostlin *M. sativa*), které byly označeny praporky a cedulkami s řádnými popisy.



Obrázek 18 - Schéma distribuce ABZ v rostlině

Z reprezentativního vzorku trusu bylo naváženo 8 aplikačních vzorků po 35 g trusu. Analýza prokázala, že tyto aplikační vzorky průměrně obsahovaly ABZ o koncentraci 0,6 µg, ABZ-SO 14,26 µg a ABZ-SO<sub>2</sub> 1,2 µg. Rovněž bylo připraveno dalších 8 aplikačních vzorků po 105 g trusu, přičemž v každém z nich se nacházelo 0,6 µg ABZ, 14,25 µg ABZ-SO a 1,2 µg ABZ-SO<sub>2</sub>. Následně byly jednotlivé vzorky ovčích exkrementů aplikovány kolem označeného jetele a vojtěšky. Tímto byly získány 4 skupiny experimentálních rostlin.

**Tabulka 7 - Rozdělení pícnin do skupin**

	<b>Druh rostliny</b>	<b>Hmotnost trusu [g]</b>	<b>Koncentrace ABZ [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Koncentrace ABZ-SO [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	<b>Koncentrace ABZ-SO<sub>2</sub> [<math>\mu\text{g}</math>]</b>
<b>1. skupina</b>	jetel	35	14	499	42
<b>2. skupina</b>	jetel	105	40	1496	126
<b>3. skupina</b>	vojtěška	35	14	499	42
<b>4. skupina</b>	vojtěška	105	40	1496	126

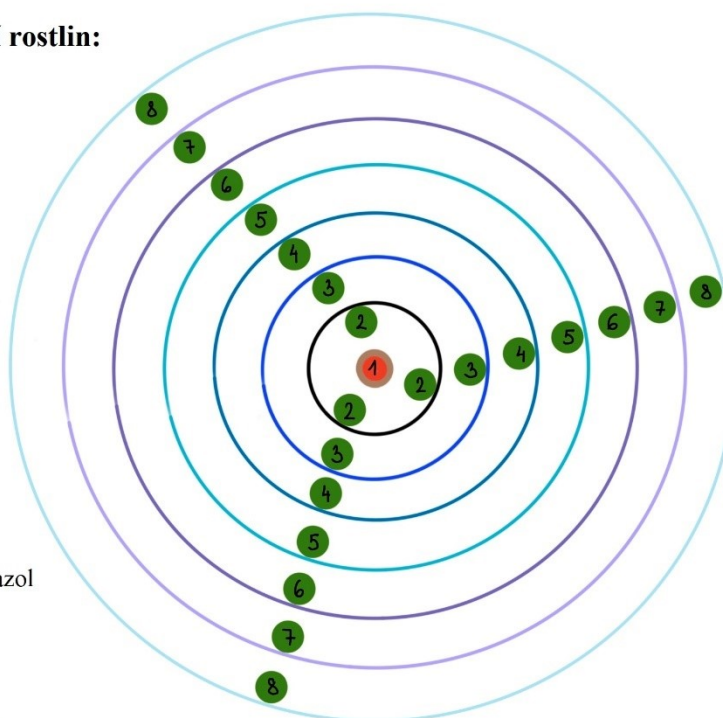
### 4.2.1 Odběr vzorků

Od každé centrální rostliny byl vymezen rádius 75 cm. V předem daném časovém období byly odebírány vzorky ve vzdálenostech 10, 20, 30, 40, 50, 60 a 75 cm od označených rostlin. Směr vzorkování byl vždy po směru hodinových ručiček.

#### Vzdálenosti vzorkování rostlin:

- 10 cm
- 20 cm
- 30 cm
- 40 cm
- 50 cm
- 60 cm
- 75 cm

- Trus obsahující albendazol
- 1 Centrální rostlina
- Experimentální rostliny



**Obrázek 19 - Schéma odběru vzorků rostlin**

První odběr byl datován na 4. den po aplikaci trusu. Další odběry následovaly 7., 14., 28., 42., 57. a 83. den od hnojení pole. Časy vzorkování, postupy aplikace trusu a samotné vzorkování vychází z pilotní studie, na které byla metodika optimalizovaná.

Po odběru byly vzorky transportovány na biochemickou katedru Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde probíhalo další zpracování vzorků a jejich následná analýza. Ihned po transportu byly vzorky rostlin lyofilizovány a uloženy do mrazících boxů - 20°C.

## **4.3 Příprava mobilní fáze, příprava zásobních roztoků a příprava vzorků pro kalibraci**

### **4.3.1.1 Příprava mobilní fáze**

Byly používány dva roztoky mobilní fáze. Roztok A byl připraven napipetováním 1 ml 0,1% kyseliny mravenčí do 999 ml H<sub>2</sub>O. Mobilní fáze B byla připravena přidáním 1 ml 0,1% kyseliny mravenčí do 999 ml ACN.

### **4.3.1.2 Příprava zásobních roztoků**

Zásobní roztoky standardů ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub>, MBZ byly připraveny o koncentraci 1 mM a to z důvodů používání těchto zásobních roztoků i při *in vitro* experimentech kde je výhodnější takovéto vyjádření koncentrace. Zásobní roztoky byly připraveny navážením příslušného analytického standardu rozpuštěním v 1 ml v DMSO. Výsledné koncentrace zásobních roztoků vyjádřené ve formě hmotností koncentrace: ABZ (0,2653 mg/ml), ABZ-SO (0,2813 mg/ml), ABZ-SO<sub>2</sub> (0,2973 mg/ml) a MBZ (0,2953 mg/ml). Roztoky byly následně skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

### **4.3.1.3 Příprava pracovního roztoku IS**

Jako IS byl použit MBZ. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pomocí 30% ACN vždy čerstvý pracovní roztok IS o finální koncentraci 0,0221 mg/ml. Koncentrace IS byla zvolena stejná jako v předchozích laboratorních experimentech, aby mohly být výsledky mezi sebou lépe porovnatelné.

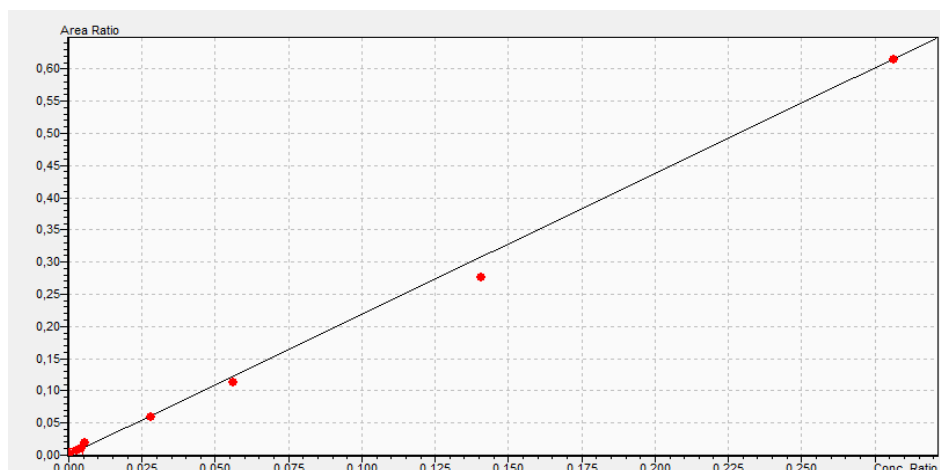
### **4.3.1.4 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci**

Z každého zásobního roztoku byly připraveny dva pracovní roztoky a to v poměru 1:99 a 1:9 (zásobní roztok:ACN). Tyto dva pracovní roztoky sloužily k přípravě směsných kalibračních roztoků, které se dále ředily s 30% ACN v daném poměru. Celkem bylo připraveno 8 kalibračních roztoků v triplikátech o koncentracích v rozmezí 0,002653-1,326 µg/ml pro ABZ, 0,002813-1,4065 µg/ml pro ABZ-SO a 0,002973-1,4865 µg/ml pro ABZ-SO<sub>2</sub>. Do každého kalibračního roztoku byl napipetován IS o koncentraci 1,4765 (µg/ml). Výsledné koncentrace jsou uvedeny v Tabulce 8.

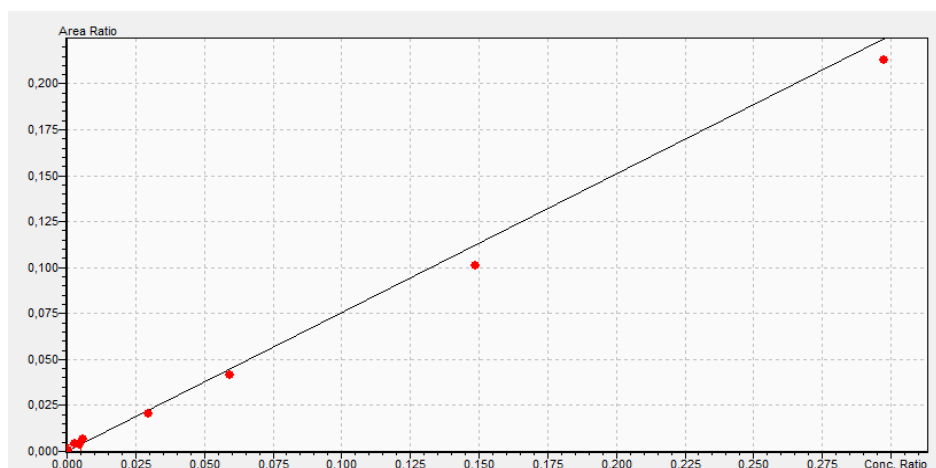
**Tabulka 8** - Tabulka s jednotlivými koncentracemi

	Konc. 1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 2 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 4 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 5 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 6 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 7 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Konc. 8 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>ABZ-SO</b>	0,00281	0,01407	0,02250	0,02813	0,14065	0,2813	0,70325	1,4065
<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>	0,00297	0,01487	0,02379	0,02973	0,14865	0,2973	0,74325	1,4865
<b>ABZ</b>	0,00265	0,01327	0,02122	0,02653	0,13265	0,2653	0,66325	1,3265
<b>MBZ (IS)</b>	1,4765	1,4765	1,4765	1,4765	1,4765	1,4765	1,4765	1,4765

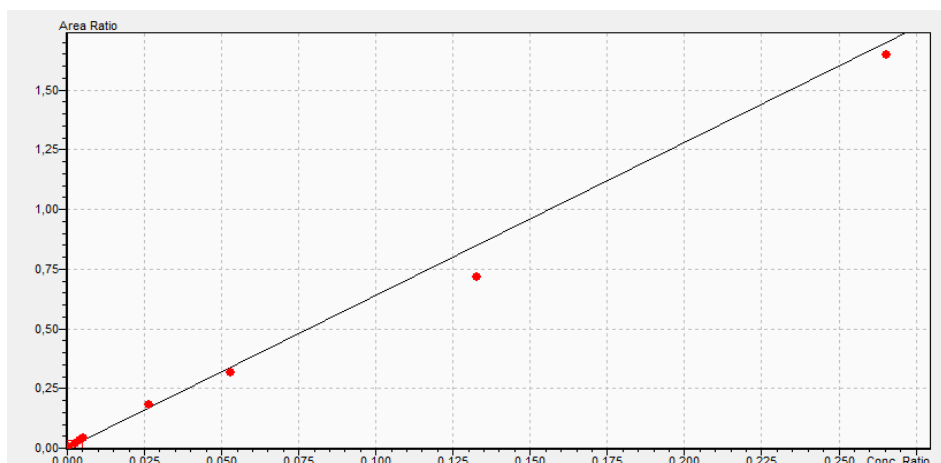
Kalibrační křivka byla konstruována jak v mobilní fázi, tak také v matrici (kvůli případným matricovým efektům). Kalibrační křivky v příkladech níže byly konstruované v rostlinné matrici.



**Obrázek 20** - Kalibrační křivka ABZ-SO



**Obrázek 21** - Kalibrační křivka ABZ-SO<sub>2</sub>



**Obrázek 22** - Kalibrační křivka ABZ

**Tabulka 9** - Rovnice lineární regrese vybrané kalibrační křivky konstruované v rostlinné matrici

Sloučenina	Rovnice lineární regrese	Korelační koeficient ( $r^2$ )
ABZ-SO	$Y = 2,18818X + 0,000138943$	0,9777
ABZ-SO <sub>2</sub>	$Y = 0,754602X + 9,24036e-005$	0,9441
ABZ	$Y = 6,40125X + 0,000239738$	0,9838

## **4.4 Extrakce vzorků**

### **4.4.1 Příprava reálných vzorků a interního standardu**

Nejprve bylo nutné jednotlivé vzorky rostlin pomocí třecí misky s tloučkem rozdrtit na jemný prášek. Následně bylo na analytických váhách naváženo potřebné množství vzorku (100 mg). Pokud bylo dostatečné množství rostlinného materiálu, vzorky byly připraveny v triplikátech.

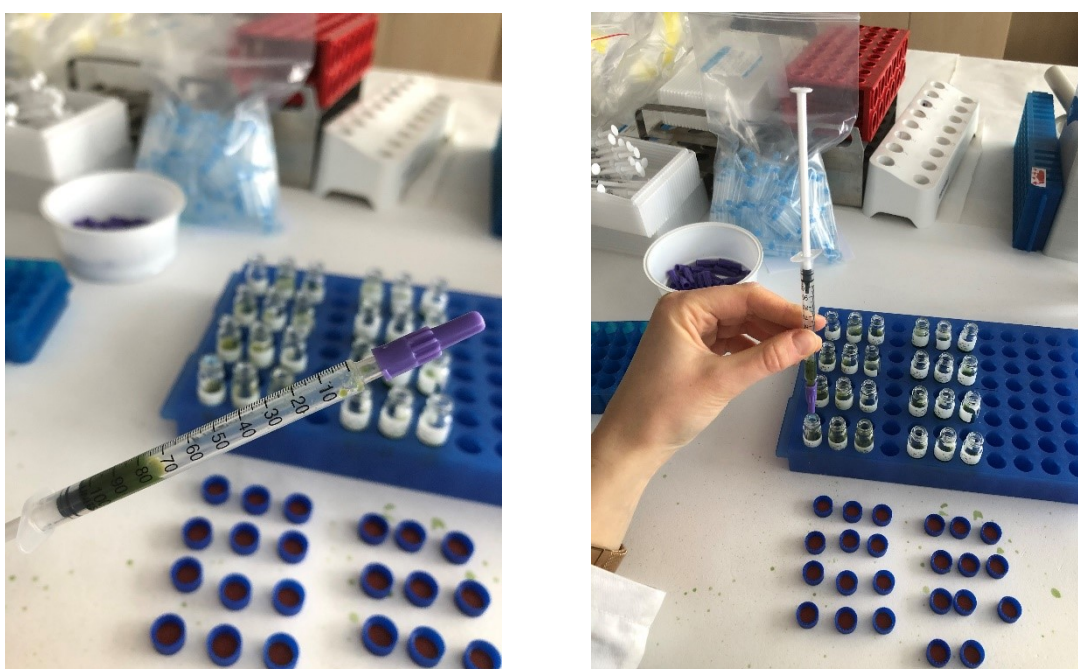
### **4.4.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)**

Do falkonek s naváženým rostlinným materiálem byly nasypány 4 odměrky homogenizačních kuliček. Dále bylo do každé z těchto falkonek napipetováno 10  $\mu$ l interního standardu (1,4765 mg/ml roztok MBZ v DMSO) a 2,5 ml redestilované vody. Následně byly falkonky umístěny do kuličkového homogenizátoru FastPrep24, kde byl rostlinný materiál po dobu 30 sekund homogenizován. Tento cyklus byl vždy zopakován 3x, aby vedl k co nejlepšímu výsledku. Po homogenizaci rostlinného materiálu bylo v digestoři ke každému vzorku napipetováno 300  $\mu$ l amoniaku a 7,5 ml ethylacetátu. Falkonky se vzorky byly přeneseny do třepačky, kde docházelo následujících 30 minut protřepávání. Poté byly vzorky ponořeny na 20 minut do ultrazvukové lázně. Následovala jejich centrifugace při 5000 x g po dobu 10 minut. Centrifugací došlo k oddělení vodné a organické fáze. Organická fáze byla nejprve přepipetována do 5 ml eppendorfek a následně po 1 ml do vialek, ve kterých byla při 30 °C odpařována v koncentrátorech. Takto připravené vzorky byly uchovávány v lednici při 4 °C v rámci několika dnů. V případě dlouhodobější potřeby skladování byly zamraženy při - 20 °C.

### 4.4.3 Rekonstituce vzorků

Pro rekonstituci vzorků bylo třeba každý z nich rozpustit a přefiltrovat. Do jednotlivých vialek s vysušenými extrakty bylo napipetováno 30  $\mu$ l ACN. Následně byly vzorky dány na 15 minut na roler a na dalších 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté bylo přidáno 70  $\mu$ l redestilované H<sub>2</sub>O. A proces s promícháním na roleru a sonikací v ultrazvukové lázni byl zopakován. Nakonec byly vzorky v koncentrátoru centrifugovány po dobu 5 minut.

Filtrace byla provedena pomocí injekčních stříkaček a PTFE filtrů s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m do vialek s vloženými skleněnými inserty.



Obrázek 23 - Filtrace pomocí injekčních stříkaček a PTFE filtrů



## 4.5 Analýza vzorků

Vyextrahované a rekonstituované vzorky rostlinného materiálu byly analyzovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním analyzátozem typu trojitého kvadrupólu. Ionizace byla zajištěna měkkou ionizační technikou ESI (ionizace elektrosprejem). UHPLC byla prováděna na kapalinovém chromatografu Nexera s použitím kolony Zorbax RRHD Eclipse Plus C18. Tato kolona je vyrobena chemickým navázáním stacionární fáze dimethyl-n-oktadecylsilanu na speciálně připravený porézní nosič oxidu křemičitého ZORBAX. Tento nosič je navržen tak, aby snižoval nebo eliminoval silnou adsorpci bazických a vysoce polárních sloučenin (Agilent 2006). Konkrétní parametry kapalinového chromatografu jsou uvedeny v tabulce 9 a nastavení parametrů hmotnostního analyzátoru v tabulce 10.

**Tabulka 10** – Chromatografické podmínky

Kapalinový chromatograf	Nexera X2
Kolona	Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (150 x 2,1 mm x 1,8 µm)
Teplota	40 °C
Průtok	0,4 ml/min
Injekční objem	1 µl
Dávkovaný objem	10 µl
Mobilní fáze	A) voda + 0,1% kyseliny mravenčí B) acetonitrilu + 0,1% kyseliny mravenčí
Gradientový režim	0 min – 15% B 8 min – 40% B 10 min – 95% B následovala 1 minuta izokratické eluce
Detektor	MS
Vyhodnocování	Software LabSolution LC-MS ver. 5,93

**Tabulka 11 - Hmotnostní analyzátor**

MS	QqQ
Kapilární napětí	4,5 kV
Teplota tepelného bloku	400 °C
Teplota DL vedení	250 °C
Sušící a nebulizační plyn	dusík
Průtok sušícího plynu	12 l/min
Průtok nebulizačního plynu	2,5 l/min
Kolizní plyn	argon
Ionizační technika	ESI (v pozitivním iontovém režimu)
MS mód	SRM

Specifické podmínky SRM byly optimalizovány přímým vstříkáním standardních roztoků ABZ, ABZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub> a MBZ do přístroje. Všechny vzorky byly proměřeny 2x.

#### 4.5.1 Vyhodnocení chromatogramů

Ke stanovení množství ABZ a jeho transformačních produktů v trusu byla využívána metoda kalibrační křivky s přidavkem interního standardu (IS). Pro analýzu vzorků kde nebylo možné tuto metodu použít (množství analyzovaných látek bylo pod LOQ), byla použita semikvantitativní analýza. Kde byla porovnána plocha pod píkem stanovované látky s plochou pod píkem IS. Jako IS byl používán MBZ.

**Tabulka 12 – Validační parametry UHPLC-MS/MS metody ve vzorcích pícnin**

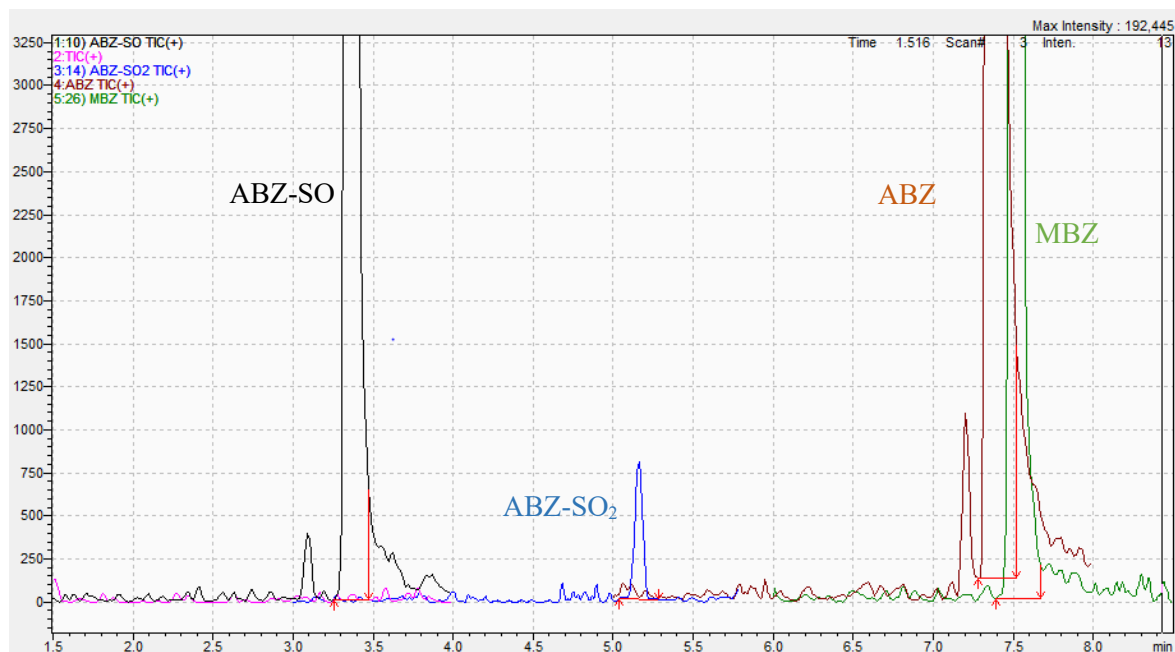
	<b>ABZ</b>	<b>ABZ-SO</b>	<b>ABZ-SO<sub>2</sub></b>
<b>Rozsah linearity (µg/ml)</b>	0,0026-1,3260	0,0028-1,4065	0,0029-1,4865
<b>Směrnice (slope)</b>	6,40125	2,18818	0,754602
<b>Úsek na ose y (intercept)</b>	0,000239738	0,000138943	9,24036e-005
<b>Korelační koeficient (r<sup>2</sup>)</b>	0,9838	0,9777	0,9441
<b>LOD (µg/ml)</b>	0,00214	0,00294	0,02583
<b>LOQ (µg/ml)</b>	0,00648	0,00891	0,07828
<b>Výtěžnost (%)</b>	45-93	87-112	47-54

**Tabulka 13** - Přesnost a preciznost metody

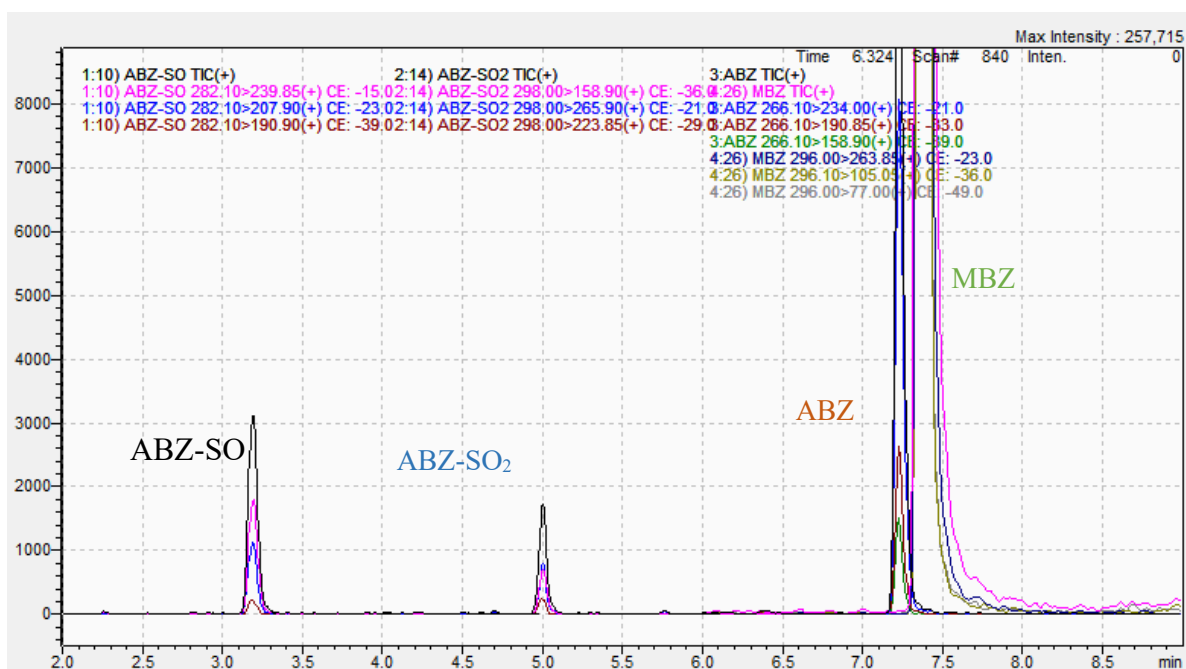
Koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABZ		ABZ-SO		ABZ-SO <sub>2</sub>	
	Přesnost (%)	Preciznost (%)	Přesnost (%)	Preciznost (%)	Přesnost (%)	Preciznost (%)
1.3265	109 ± 1	3,0	88 ± 3	2,1	89 ± 5	1,2
0.66325	102 ± 1	0,1	93 ± 2	3,0	89 ± 3	7,0
0.2653	99 ± 1	6,0	110 ± 3	1,0	125 ± 3	5,0
0.02653	94 ± 16	4,5	91 ± 6	2,9	96 ± 8	0,8

**Tabulka 14** – Retenční čas, molekulová hmotnost a vybrané SRM přechody

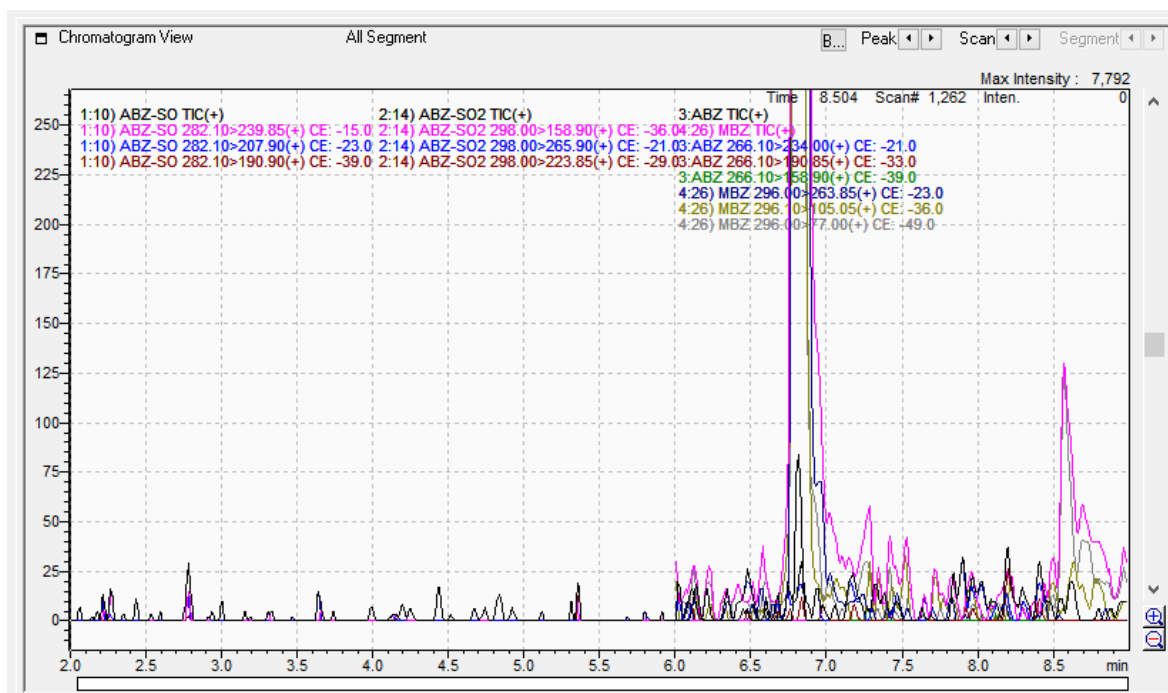
Sloučenina	$t_R$ (min)	$m/z$	Molekulární vzorec	Produktový iont $[M+H]^+$ , $m/z$ (kolizní energie)
ABZ-SO	3,259	282,10	$C_{12}H_{15}N_3O_3S$	239,85 (-15), 207,90 (-23), 190,90(-39)
ABZ-SO <sub>2</sub>	5,093	298,00	$C_{12}H_{15}N_3O_4S$	158,90(-36), 265,90(-21), 223,85(-29)
ABZ	7,224	266,10	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	234,00 (-21), 190,85 (-33) 158,90 (-39)
MBZ	7,426	296,00	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	263,85 (-23), 105,05 (-36) 77,00 (-49)



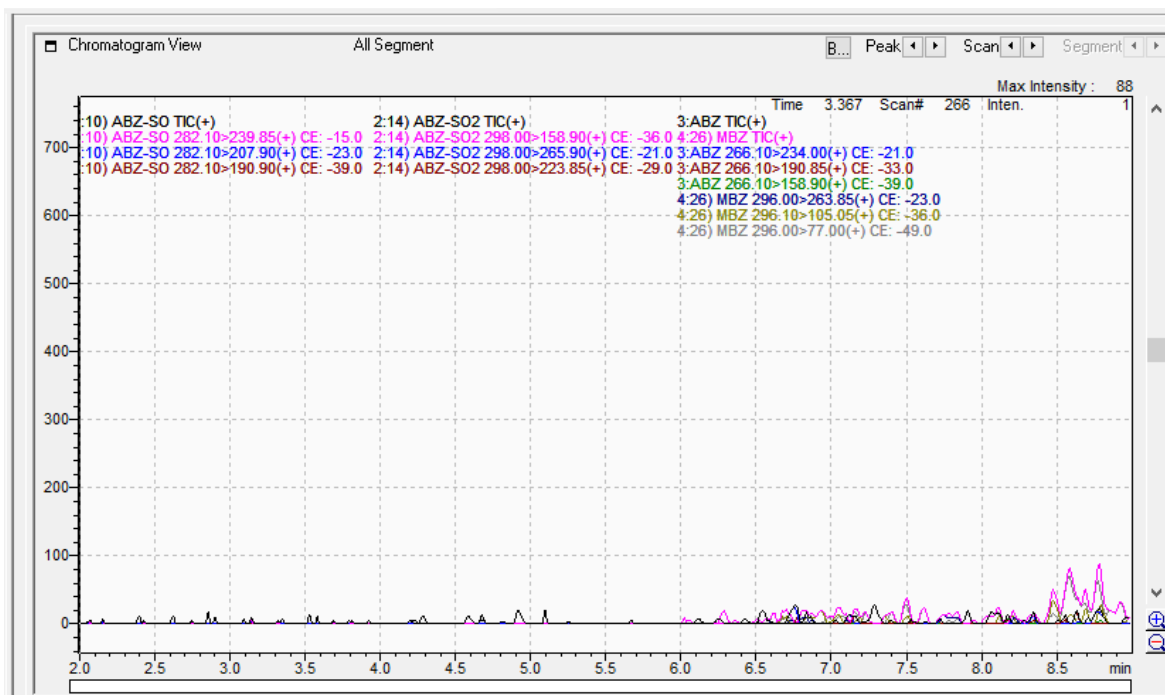
**Obrázek 24** - TIC (total ion chromatogram)



Obrázek 25 – SRM přechody jednotlivých sloučenin



Obrázek 26 – Blanková matrice s IS



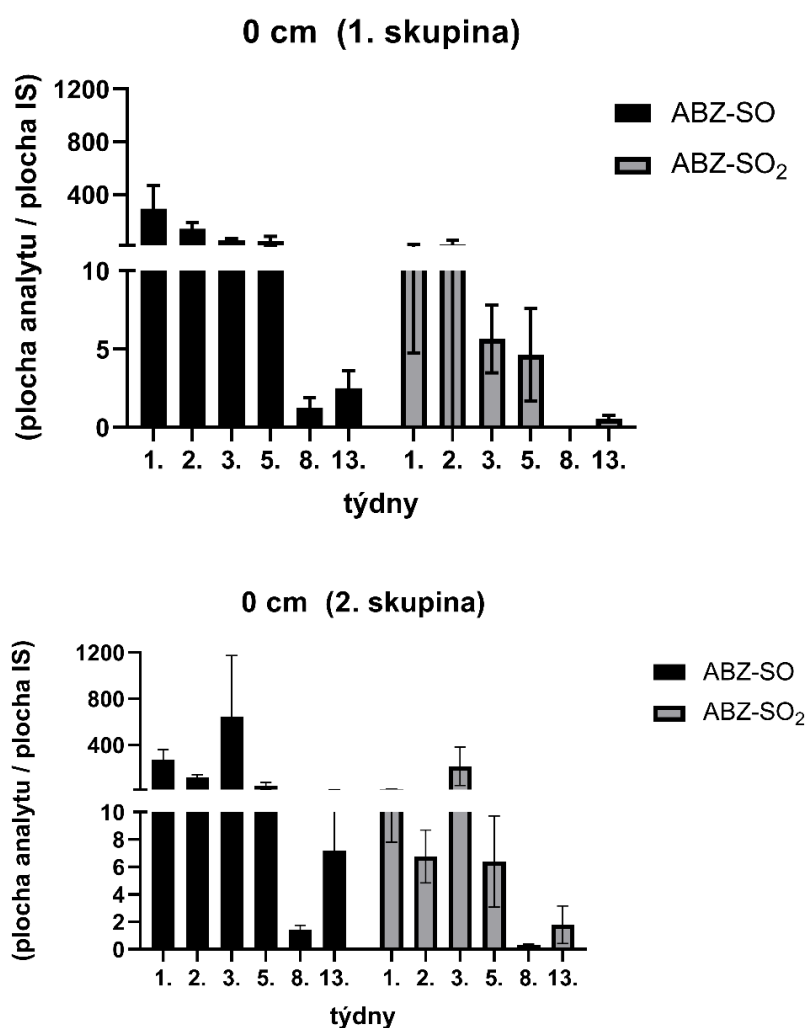
Obrázek 27 - Pozadí (30/70, ACN/H<sub>2</sub>O)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení metabolitů ABZ v jeteli

Pro experiment nám sloužilo 16 vybraných centrálních píceň (8 *T. pratense* a 8 *M. sativa*). Kolem prvních 4 rostlin jetele bylo aplikováno 35 g trusu (obsahující ABZ) a kolem zbylých 4 rostlin 105 g směsi trusu léčených ovcí. Vznikly tak 2 skupiny vzorků. Po dobu 13. týdnů docházelo v předem stanovených termínech k odběru rostlin a jejich následné lyofylizaci.

Lyofylizované vzorky jetele byly zpracovány metodou extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), rekonstituovány v 30% ACN a filtrací zbaveny nečistot. Následně byly analyzovány pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) spojené s hmotnostním analyzátořem (typu QqQ). Vyhodnocování výsledků probíhalo v softwaru LabSolution LC-MS. Výsledky byly zpracovány v Excelu (ver. 2019) a GraphPadu Prism 9.

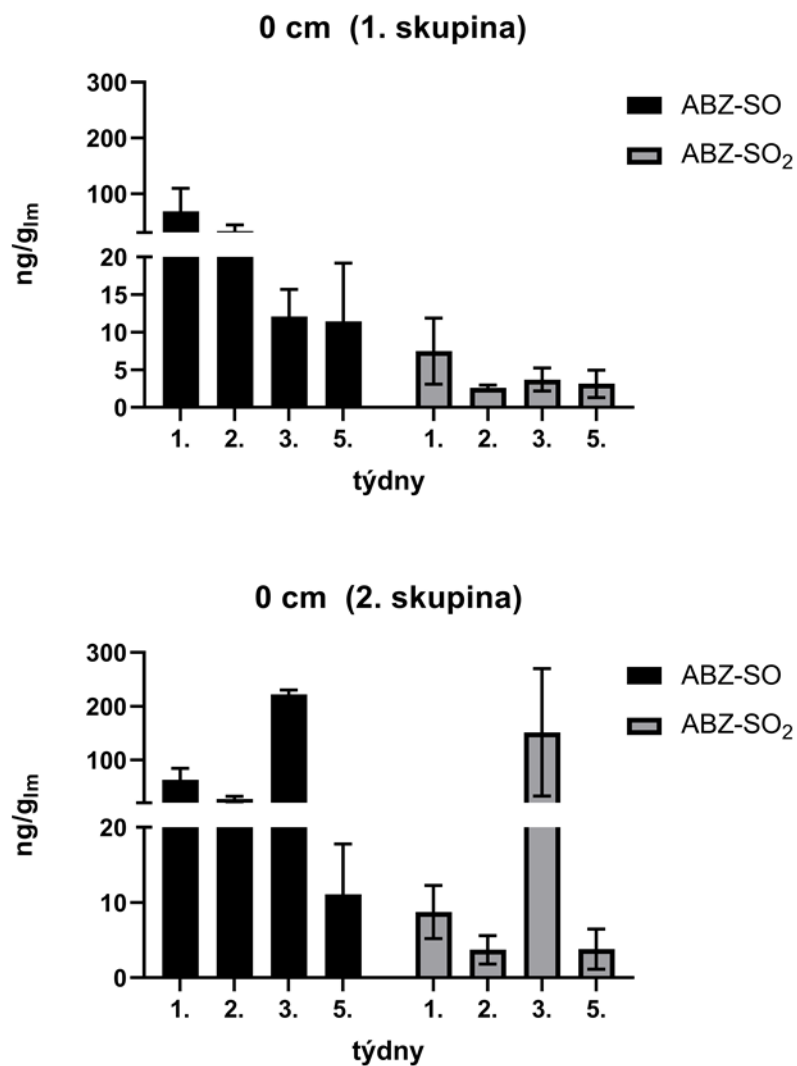


Obrázek 28 - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> v jeteli v 0 cm

V obr. 28 můžeme vidět výsledky měření koncentrace ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> v centrálních rostlinách jetele v průběhu 13 týdnů. Skupinu č. 1 tvoří jetel, kolem kterého bylo aplikováno 35 g trusu s obsahem ABZ-SO o koncentraci 499 µg a ABZ-SO<sub>2</sub> o koncentraci 42 µg. Skupinu č. 2 reprezentují rostliny jetele, které byly pohnojeny 105 g trusu s koncentracemi 1 496 µg ABZ-SO a 126 µg ABZ-SO<sub>2</sub>. Z grafů je zřejmé, že i po 13 týdnech od aplikace trusu se tyto látky nacházejí v rostlinách v detekovatelných koncentracích.

Od 1. do 5. týdne je množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> značně vysoké, proto jsme z těchto časových odběrů byli schopni koncentraci odečíst z kalibrační křivky a kvantifikovat příslušné transformační produkty.

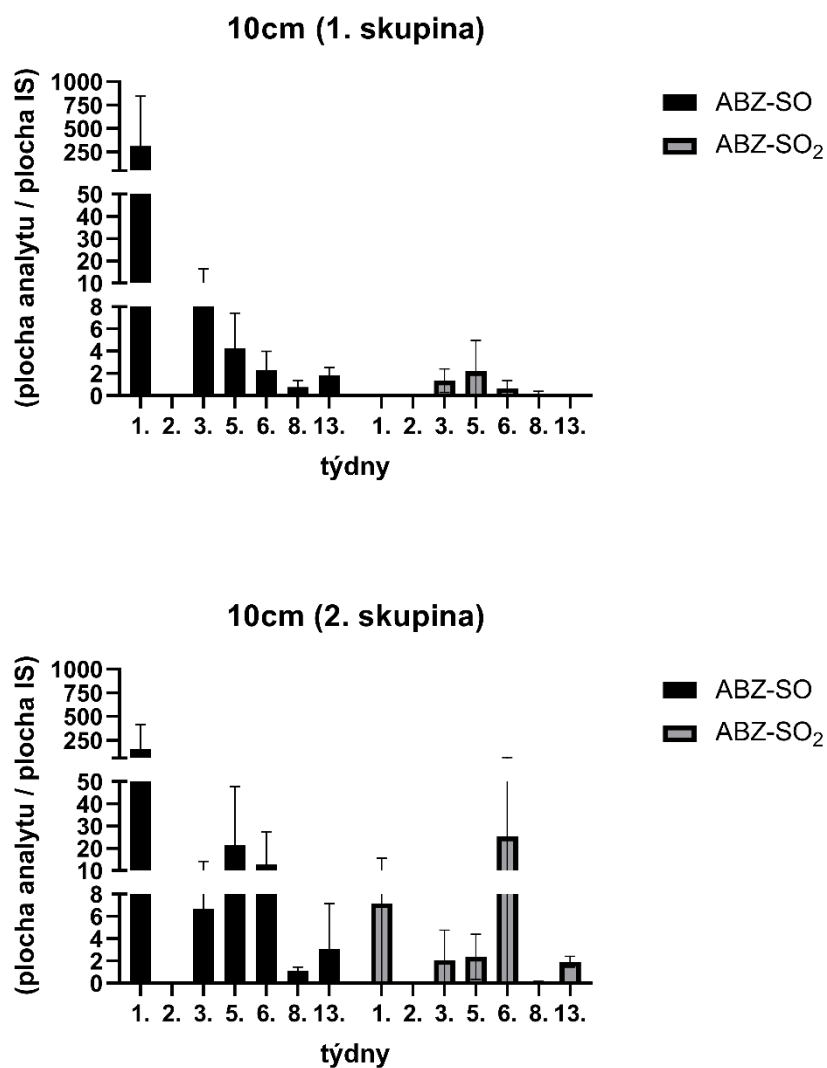
Z obr. 29 lze vidět změnu koncentrace ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> u 1. skupiny jetele v průběhu prvních 5 týdnů experimentu. V 1. týdnu se koncentrace ABZ-SO pohybovala v hodnotách 68,03 ng/g lyofylovaných rostlin, ABZ-SO<sub>2</sub> se v jeteli vyskytoval v nižších koncentracích (32,79 ng/g). S výjimkou 3. týdne se koncentrace TP ABZ postupem času snižovala. V 5. týdnu dosahovala u ABZ-SO 11,43 ng/g a u ABZ-SO<sub>2</sub> 3,14 ng/g.



**Obrázek 29** - Kvantifikace ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> ve vzorcích jetele v 0 cm

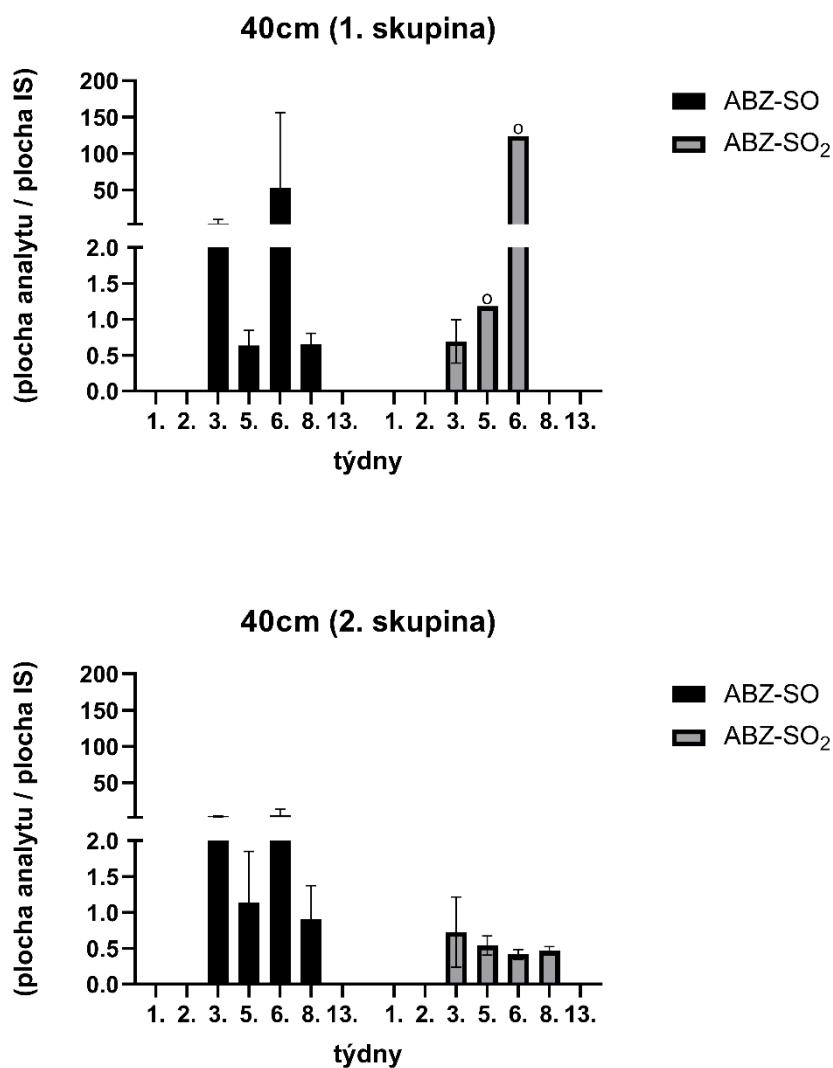
Při porovnání 1. a 2. skupiny vzorků jetele si lze všimnout, že se koncentrace TP ABZ příliš neliší, přestože na skupinu vzorků č. 2 bylo aplikováno větší množství trusu (105 g).





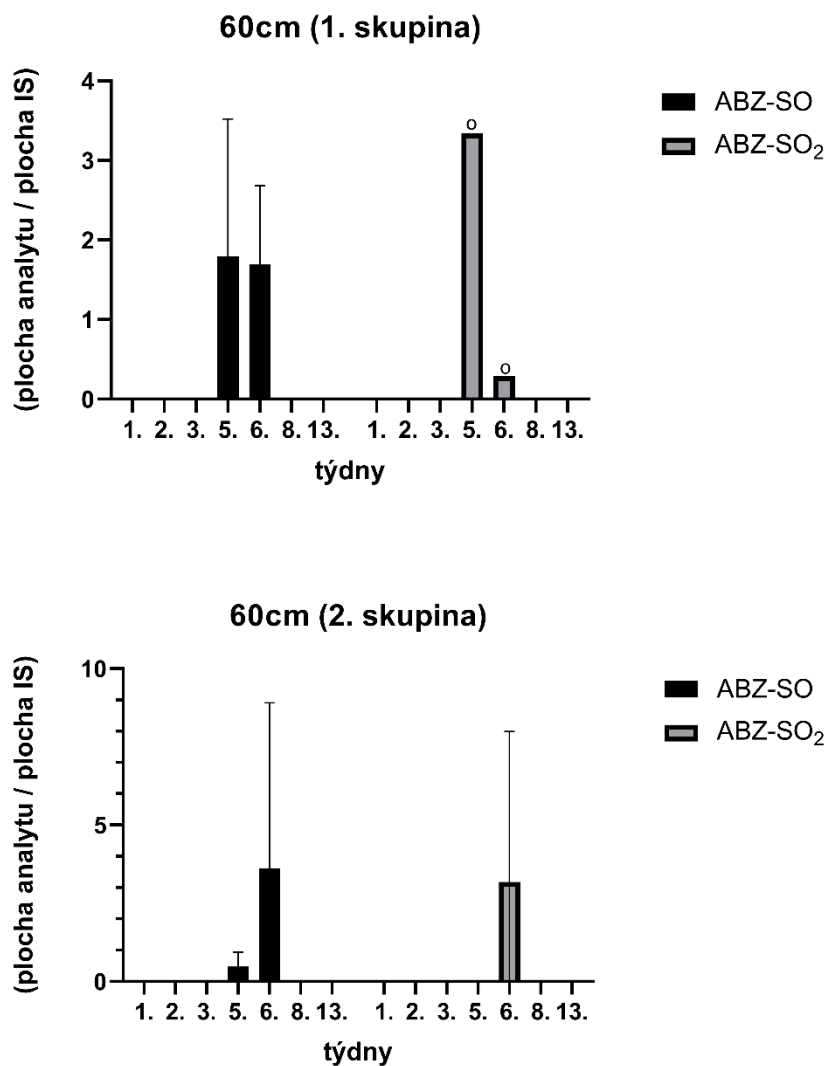
**Obrázek 30** - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> v jeteli ve 10 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

Obr. 30 znázorňuje množství TP ABZ ve vzdálenosti 10 cm od centrální rostliny jetele pomocí area ratio (plocha píku analytu/ plocha píku IS).



**Obrázek 31** - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> v jeteli ve 40 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

S rostoucí vzdáleností odebraných vzorků od centrální rostliny klesá množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub>. Ve vzdálenosti 40 cm od centrální rostliny byly detekovány TP ABZ od 3. do 8. týdne. U první skupiny se v 5. a 6. týdnu nacházel ABZ-SO<sub>2</sub> pouze v jednom ze čtyř vzorků jetele.

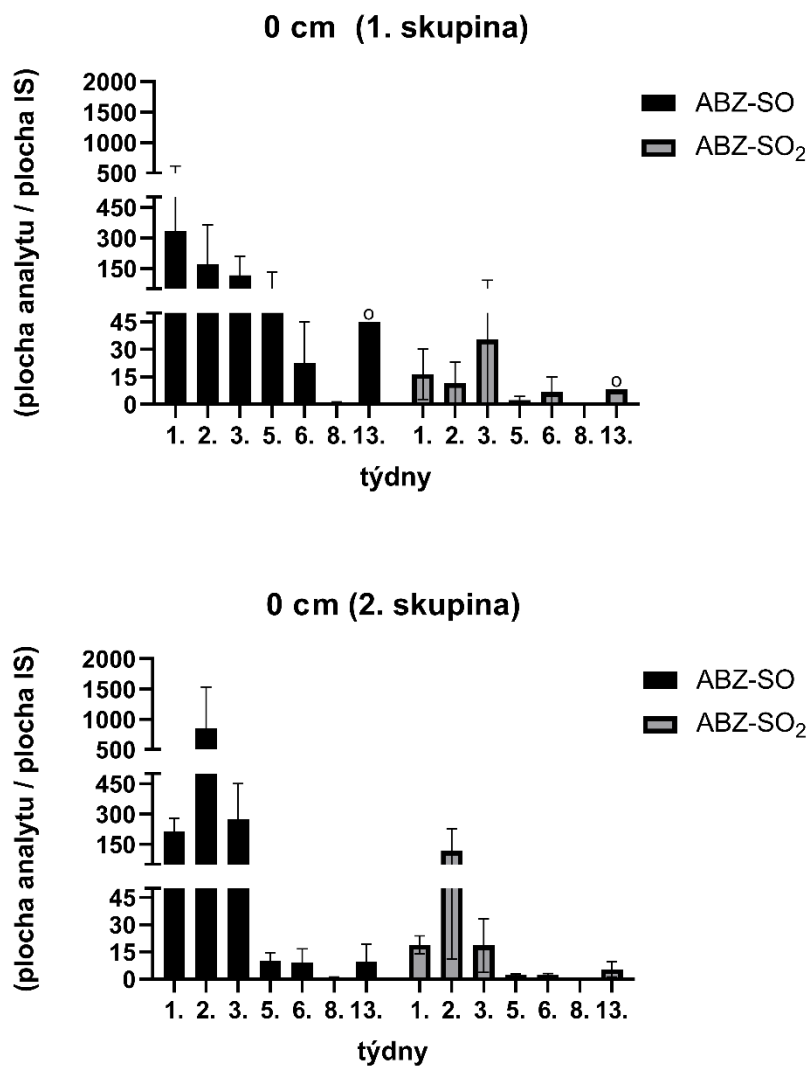


**Obrázek 32** - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> v jeteli v 60 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

Ve vzdálenosti 60 cm byly naměřeny hodnoty koncentrací ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> pouze v 5. a 6. týdnu. U 1. skupiny se ABZ-SO<sub>2</sub> nacházel pouze v jednom ze čtyř vzorků jetele. U 2. skupiny se ABZ-SO<sub>2</sub> nepodařilo naměřit již ani v 5. týdnu.

## 5.2 Stanovení metabolitů ABZ ve vojtěšce

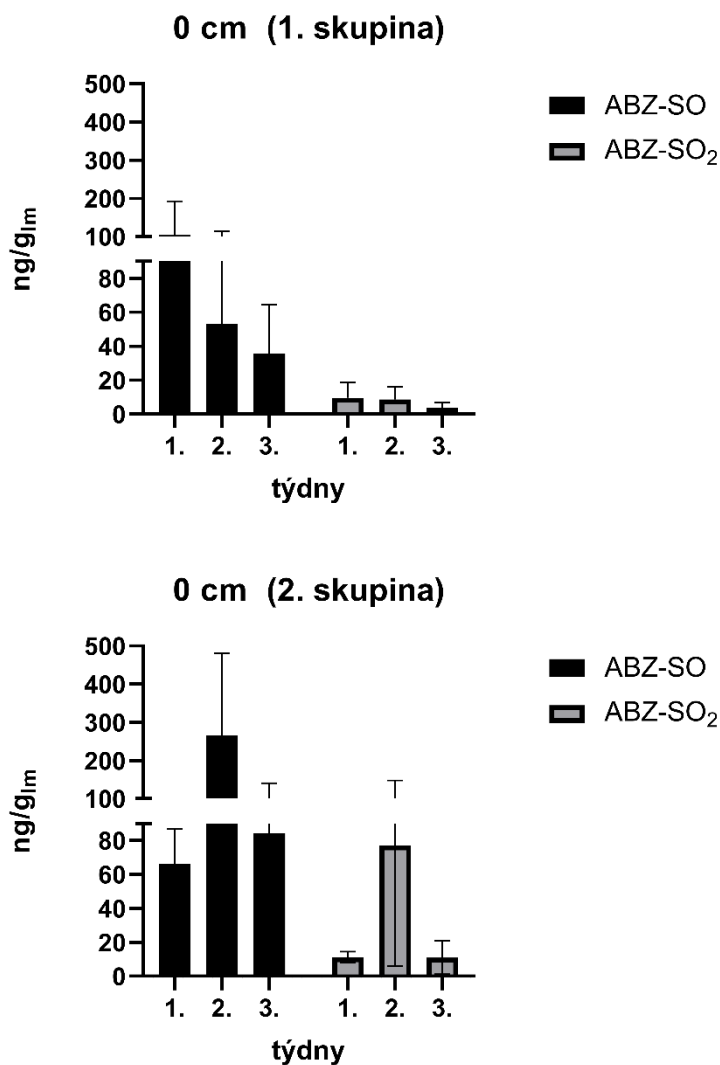
Aplikace směsi trusu léčených ovcí (obsahující ABZ) kolem rostlin, vzorkování, zpracování i analýza vojtěšky probíhala stejným způsobem jako u jetele. K vyhodnocování výsledků byl použit software LabSolution LC-MS a k následnému zpracování výsledků Excel (ver. 2019) a GraphPad Prism 9.



Obrázek 33 - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> ve vojtěšce v 0 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

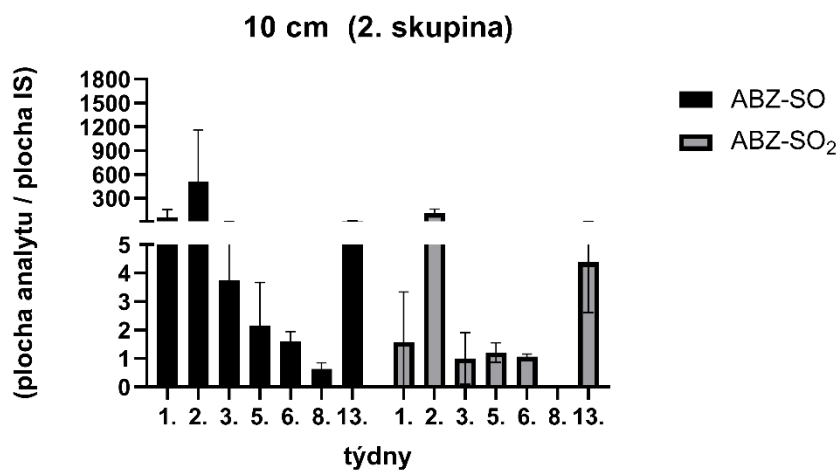
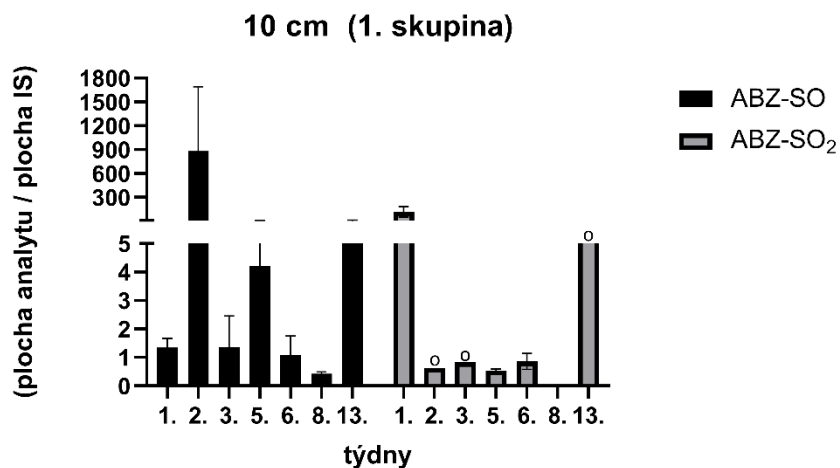
Z obr. 33 lze vidět množství naměřeného ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> v centrálních rostlinách vojtěšky v průběhu 13 týdnů, kdy probíhal tento experiment. Stejně, jak tomu bylo u jetele, tak také u vojtěšky tvoří skupinu č. 1 rostliny, kolem kterých bylo aplikováno 35 g trusu s obsahem ABZ-SO o koncentraci 499  $\mu\text{g}$  a ABZ-SO<sub>2</sub> o koncentraci 42  $\mu\text{g}$ . Skupinu č. 2

reprezentuje vojtěška, která byla pohnojena 105 g trusu s koncentracemi 1 496  $\mu\text{g}$  ABZ-SO a 126  $\mu\text{g}$  ABZ-SO<sub>2</sub>. Graf č. 8 ukazuje, že i ve vojtěšce byly v celé délce průběhu experimentu detekovány dané TP ABZ. U skupiny 1 byl ABZ-SO i ABZ-SO<sub>2</sub> naměřen pouze v jednom ze čtyř vzorků vojtěšky.



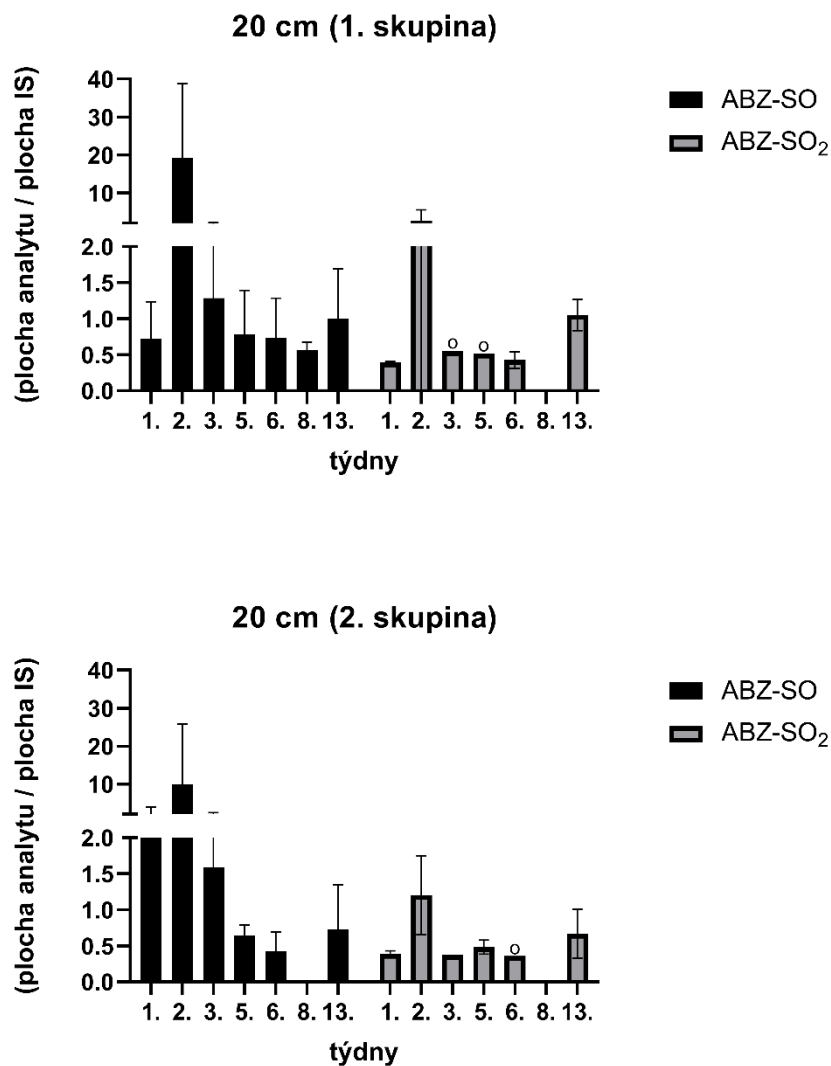
**Obrázek 34** - Kvantifikace ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> ve vzorcích vojtěšky v 0 cm

U vojtěšky byly značně vysoké koncentrace TP ABZ naměřeny v 1. – 3. týdnu. Proto byly následující 3 týdny kvantifikovány. Z kalibrační křivky byla odečtena koncentrace ABZ-SO, která se u 1. skupiny pohybovala v hodnotách 103,63 ng/g, 53,00 ng/g, 35,63 ng/g a u 2. skupiny 66,09 ng/g, 265,69 ng/g a 84,41 ng/g. Koncentrace ABZ-SO<sub>2</sub> se u 1. skupiny vojtěšky pohybovala v poměrně nízkých koncentracích 9,65 ng/g, 8,74 ng/g a 3,79 ng/g. V 2. skupině došlo k výraznějšímu zvýšení koncentrace ABZ-SO v 2. týdnu (77,17 ng/g).



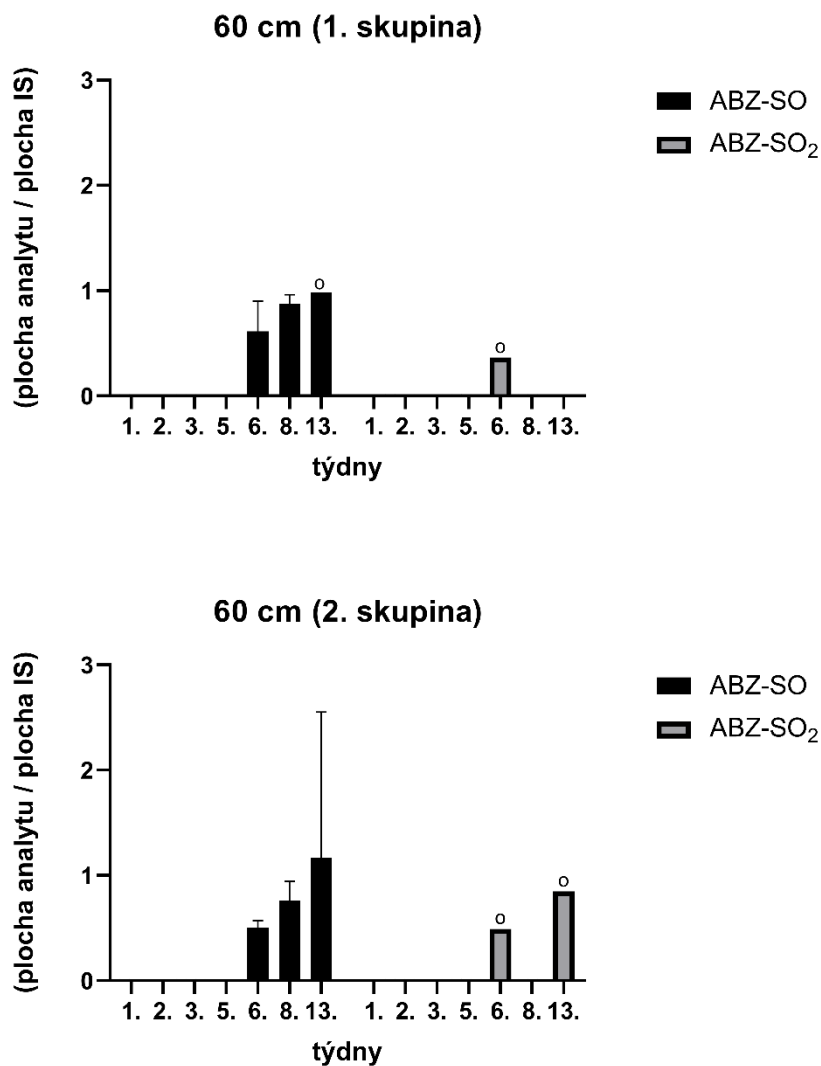
**Obrázek 35** - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> ve vojtěšce v 10 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

Obr. 35 znázorňuje naměřené množství analytů ve vzdálenosti 10 cm od centrální rostliny. Z výsledků je patrné výrazné snížení koncentrace v 8. týdnu a následné zvýšení ve 13. týdnu.



**Obrázek 36** - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> ve vojtěšce v 20 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

Ve vzdálenosti 20 cm od centrálních rostlin již area ratio (plocha píku analytu/plocha píku IS) není větší než 20. Kromě 8. týdne se však oba TP ABZ v rostlinách vojtěšky nacházejí. V některých týdnech (3., 5. u skupiny 1 a 6. u skupiny 2) byl ABZ-SO<sub>2</sub> detekován pouze v jednom ze 4 vzorků vojtěšky.



**Obrázek 37** - Množství ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> ve vojtěšce v 20 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků)

Z obr. 37 lze vidět, že ve vzdálenosti 60 cm od centrální rostliny byl ABZ-SO detekován v 6., 8. a 13. týdnu. ABZ-SO<sub>2</sub> se nacházel pouze v jednom ze vzorků vojtěšky v 6. týdnu u skupiny 1 a v 6. a 13. týdnu u skupiny 2.



## 6 DISKUZE

V současnosti je známo, že léky mohou být významným zdrojem znečištění životního prostředí. Až 90 % konzumovaných léčiv prostupuje do půdy a podzemních vod, kde mohou mít nepříznivé účinky na živé organismy a celý ekosystém. Obzvláště nebezpečné jsou léky s vysokou perzistencí (Adamek et al. 2017).

Existuje několik studií zabývajících se šířením benzimidazolových anthelmintik do životního prostředí a následným účinkem na živočichy. Jedna z nich sledovala účinek fenbendazolu a flubendazolu na vodní ekosystém, kdy toxicita těchto benzimidazolů byla pozorována hlavně u korýšů (*Daphnia magna*) (Wagil et al. 2014). Při studiu ABZ kumulujícího se v půdě bylo zjištěno, že působí toxicky na půdní živočichy, např. žížalu (*Eisenia fetida*) (Wang et al. 2009, Gao et al. 2015). Carlsson et al. (2011) a Mattsson et al. (2012) ve svých studiích poukazují na embryotoxicitu ABZ u ryb (*Danio rerio*). Toxicita ABZ byla prokázána i u vodní bakterie *Vibrio fischeri* a korýšů (*Daphnia magna*) (Oh et al. 2006).

Kromě účinku na živočichy, mohou benzimidazolová anthelmintika postupně přecházet z půdy a vody do rostlin (Stuchlíková et al. 2017). Přestože jsou anthelmintika jedny z nejčastěji používaných léčiv ve veterinární praxi, studií zaměřených na fytotoxicitu těchto xenobiotik bylo provedeno velice málo. Většina studií věnovaných fytotoxicitě léčiv je zaměřena na antibiotika. Migliore et al. (2003) ve své laboratorní studii potvrdili fytotoxicitu enrofloxacinu na okurku, salát a ředkvičky. Liu et al. (2009) uvedli, že sulfamethoxazol, sulfamethoazin a trimethoprim jsou toxické pro růst sladkého ovsa, rýže a okurky. Fytotoxicitu antibiotik dokumentuje řada dalších prací (shrnuto v review Bártíková et al. 2016).

Vzhledem k omezeným informacím k problematice fytotoxicity anthelmintických léčiv byly na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové prováděny studie na rostlinách *Campanula rotundifolia* (Stuchlíková et al. 2016), *Phragmites australis* (Podlipná et al. 2013), *Plantago lanceolata* (Raisová et al. 2017) a *M. sativa* (Stuchlíková et al. 2020). Pomocí regenerantů a buněčných suspenzí sloužících jako modelové systémy bylo zjištěno, že rostliny jsou schopny přijímat anthelmintika a biotransformovat je různými cestami. Avšak ve všech zmíněných studiích byly testovány koncentrace anthelmintik výrazně vyšší, než jsou jejich reálné koncentrace v životním prostředí.

Proto nás zajímalo, jestli k přestupu anthelmintického léčiva do rostlin bude docházet i v reálných polních podmínkách. Tato diplomová práce zaměřila na monitorování ABZ a jeho transformačních produktů v krmných rostlinách *M. sativa* a *T. pratense*. Jako zástupce

antiparazitárních léčiv byl vybrán ABZ, protože je v současnosti jedním z nejvíce používaných benzimidazolových anthelmintik pro léčbu hospodářských zvířat. *M.sativa* a *T. pratense* zase řadíme mezi hospodářsky nejvýznamnější rostliny, které se pěstují za účelem zisku krmiva. V praxi se tedy často dostávají do kontaktu s exkrementy ošetřených zvířat antiparazitárními léčivy.

Spolu s kolegyní Bc. Danielou Vrabřovou, která se v rámci své diplomové práce také zabývala transportem ABZ do životního prostředí, jsme zjistily, že ABZ přestupuje z trusu léčených ovcí do půdy, kde byly nalezeny značné koncentrace parentní látky i jejich metabolitů. Následně se z půdy transportují spolu s vodou a dalšími živinami do rostlin, kde mohou být ukládány do kompartmentů nebo biotransformovány na řadu metabolitů. Studie provedené na půdě naznačují, že fytoxicita se může u jednotlivých druhů rostlin zásadně lišit a závisí na kinetice sorpce příslušné sloučeniny, půdní organické látce a pH půdy (Kumar et al. 2012).

Z našich výsledků jsme zjistili, že se v pícech nachází jen malá koncentrace parentní látky. V mnohem vyšších koncentracích byly detekovány transformační produkty. Stuchlíková et al. (2020) zjistili, že *M. sativa* je schopna přijmout a transformovat ABZ na 21 metabolitů, které je možno považovat za anthelminticky aktivní (kromě ABZ-SO<sub>2</sub>) nebo velice málo stabilní. Z toho důvodu je používání exkrementů léčených zvířat k hnojení zemědělské půdy nebo ponechání ošetřených zvířat volně na pastvě považováno za riskantní. Dochází tím k negativnímu ovlivnění fyziologických procesů v rostlinách a kontaminaci ekosystému.

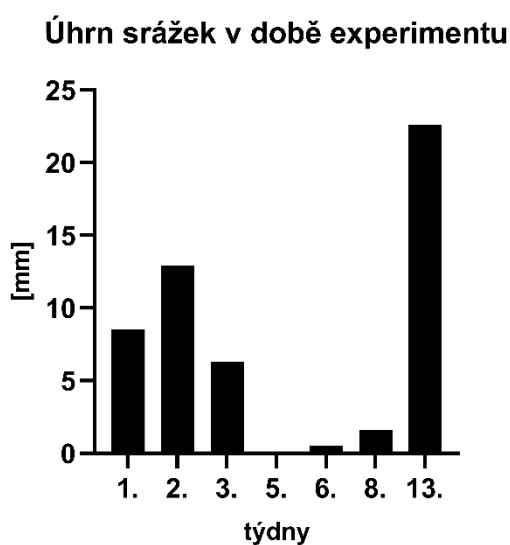
V naší studii jsme sledovali pouze dva transformační produkty (ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub>), protože tyto dva metabolity jsou do trusu ovce vylučovány v nejvyšších koncentracích. Důvodem je rychlý first-pass metabolismus v játrech, při kterém je až 90 % ABZ oxidován na aktivní produkt ABZ-SO a následně sulfoxidován na neaktivní formu ABZ-SO<sub>2</sub> (Dayan 2003; Alvarez et al. 2003). Pro kvanfitikaci ABZ a jeho metabolitů byla využita UHPLC metoda spojená s hmotnostním analyzátozem typu QqQ. Tato instrumentace neumožnila detekci dalších metabolitů ABZ, které se v rostlinách mohly nacházet v nižších koncentracích než byla naše mez detekce.

Součástí studie bylo změření vzdáleností, do jakých se parentní látka a její transformační produkty rozšířily. ABZ-SO i ABZ-SO<sub>2</sub> byly detekovány i v pícech vzdálených 60 cm od centrálních rostlin. Vzorok píce byly vysoce variabilní. Koncentrace TP ABZ se v průběhu času různě měnila. Důvodem mohla být velikost rostliny a množství odebrané části. Na začátku jara byla rostlina malého vzrůstu, takže při odbírání vzorku došlo k odběru celé

rostliny s veškerým léčivem i jeho metabolity. Vzárustem pícnin se obsah ABZ a jeho metabolitů může v odebrané části nacházet jen v určitém poměru celkové koncentrace. Dalším důvodem měnících se koncentrací v čase mohla být schopnost rostlin metabolizovat léčivo nebo si ho ukládat do podzemní kořenové části. Přestup TP ABZ mohla být ovlivňována mnoha dalšími faktory jako jsou např. srážky, umístění rostliny, apod.

Při porovnání 1. a 2. skupiny vzorků pícnin se koncentrace TP ABZ příliš neliší, přestože na skupinu vzorků č. 2 bylo aplikováno větší množství trusu (105 g). Z toho lze usuzovat, že rostlina je schopna přijmout pouze určité limitní koncentrace těchto látek.

V 0 cm bylo množství TP produktů v prvních 5 týdnech u jetele a prvních 3 týdnech u vojtěšky značně vysoké, proto jsme z těchto časových odběrů byli schopni koncentraci odečíst z kalibrační křivky a kvantifikovat tak příslušné transformační produkty. ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> se v rostlinách nacházel i 2 měsíce po prvním kontaktu s exkrementy léčených ovcí. Nárůst koncentrace metabolitů ABZ v 13. týdnu byl pravděpodobně způsoben zvýšeným množstvím srážek a následným přestupem metabolitů ABZ z půdy do pícnin.



**Obrázek 38** - Srážky v době experimentu v Pardubickém kraji (Byšť) (web 5)

Přítomnost nízkých koncentrací TP v krmných rostlinách představuje nebezpečí pro býložravé bezobratlé živočichy, ale může také hrát další roli ve vývoji rezistence ABZ u helmintů.

Tato práce doplňuje předchozí studie prováděné v laboratorních podmínkách a ukazuje, že k absorpci i biotransformaci anthelmintických léčiv z půdy do rostlin dochází i v reálných podmínkách. Zároveň nechává prostor pro výzkum a kvantifikaci dalších metabolitů ABZ, které byly v *M. sativa* identifikovány v rámci laboratorních experimentů (Stuchlíková 2020).

## 7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla věnována cirkulaci ABZ a jeho metabolitů v životním prostředí. Konkrétně se zabývala přestupem tohoto léčiva z trusu ovce domácí do jetele lučního (*T. pratense*) a tolíce vojtěšky (*M. sativa*) po aplikaci směsi trusu léčených ovcí na pastvině.

Výsledky můžeme shrnout následně:

- V centrálních rostlinách, na kterých byl přímo aplikován trus z léčených zvířat, byl kvantifikován ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> a sledováno jejich množství v čase. K výraznějšímu poklesu jejich množství došlo až 8. týden po aplikaci trusu.
- ABZ-SO a ABZ-SO<sub>2</sub> byly detekovány v rostlinách vzdálených až 60 cm od centrálních rostlin.
- Metabolity ABZ byly v některých rostlinách detekovatelné i 2 měsíce po aplikaci trusu.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ABZ	albendazol
ABZ-SO	albendazol sulfoxid
ABZ-SO <sub>2</sub>	albendazol sulfon
ATP	adenosintrifosfát
CYP	cytochrom P450
cDNA	komplementární vlákno DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MFO	mixed-function oxygenase
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát redukovaný
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
ABA	kyselina abscisová
FMO	flavinová monooxygenasa
FAD	flavin adenin dinukleotid
POX	peroxidasy
ADH	alkoholdehydrogenasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
AKR	aldoketoreduktasa
GST	glutathion-S-transferasa
DHAR	dehydroaskorbatreduktasa
UDP	uridindifosfát
PAPS	3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát
ABC transportéry	ATP-binding cassette transportéry
MATE transportéry	multidrug and toxins extrusion transportéry
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction)
SPE	extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction)

PP	srážení proteinů (protein precipitation)
K	distribuční koeficient
$R_n$	výtěžek extrakce
$V_{org}$	objem organické fáze
$V_{aq}$	objem vodné fáze
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
SF	stacionární fáze
MF	mobilní fáze
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
TPP	plně porézní částice (totally porous particles)
SPP	povrchově porézní částice (superficially porous particles)
EI	elektronová ionizace
CI	chemická ionizace
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ESI	ionizace elektrosprejem
MALDI	ionizace desorpcí laserem za účasti matrice
API technika	technika prováděna za atmosférického tlaku
RP	rozlišovací schopnost
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól
TOF	analyzátor doby letu
B	elektromagnetický sektor
LIT	lineární iontová past
IT	sférická iontová past

Orbitrap	orbitální past
ICR	iontová cyklotronová rezonance
SIM	monitorování jednoho iontu (single ion monitoring)
SCAN	skenovací režim
SRM	selektivní záznam jedné reakce (selected reaction monitoring)
MRM	selektivní záznam více reakcí (multiple reaction monitoring)
$A_i$	plochu píku analytu
$A_{IS}$	plocha píku interního standardu
$A_s$	plocha píku referenčního standardu
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
CID	kolizní cela
MBZ	mebendazol
DMSO	dimethylsulfoxid
ACN	acetonitril
IS	interní standard
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
TP	transformační produkt

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

### 9.1 Obrázky

<b>Obrázek 1</b> - Struktura benzimidazolů .....	10
<b>Obrázek 2</b> - Struktura albendazolu (5-propylthio-1H-benzimidazol-2-yl).....	13
<b>Obrázek 3</b> - Albendazol sulfon .....	14
<b>Obrázek 4</b> - Albendazol sulfoxid .....	14
<b>Obrázek 6</b> - <i>Trifolium pratense</i> – květ a list .....	17
<b>Obrázek 5</b> - Jetel luční .....	17
<b>Obrázek 7</b> - <i>Medicago sativa</i> .....	18
<b>Obrázek 8</b> - <i>Medicago sativa</i> – květ a listy .....	18
<b>Obrázek 9</b> - Základní schéma instrumentace HPLC .....	33
<b>Obrázek 10</b> – Povrchově porézní částice (SPP).....	34
<b>Obrázek 11</b> - Silikagel typu C (záměně Si-OH skupiny za Si-H).....	35
<b>Obrázek 12</b> - Povrch silikagelu s různými modifikacemi – silikagel typu A (3), silikagel typu B (2).....	36
<b>Obrázek 13</b> - Schéma hmotnostního spektrometru .....	37
<b>Obrázek 14</b> - Volba ionizační techniky .....	39
<b>Obrázek 15</b> - Schéma ionizace elektrosprejem .....	40
<b>Obrázek 16</b> - Kvadrupól (Q) .....	42
<b>Obrázek 17</b> - Analýza ve skenovacím (SCAN) a statickém (SIM) režimu .....	43
<b>Obrázek 18</b> - Schéma distribuce ABZ v rostlině .....	49
<b>Obrázek 19</b> - Schéma odběru vzorků rostlin.....	50
<b>Obrázek 20</b> - Filtrace pomocí injekčních stříkaček a PTFE filtrů .....	56
<b>Obrázek 21</b> - Kalibrační křivka ABZ-SO .....	53
<b>Obrázek 22</b> - Kalibrační křivka ABZ-SO <sub>2</sub> .....	53
<b>Obrázek 23</b> - Kalibrační křivka ABZ.....	54
<b>Obrázek 24</b> - TIC (total ion chromatogram) .....	59
<b>Obrázek 26</b> – MRM přechody jednotlivých sloučenin .....	60
<b>Obrázek 27</b> - Matrice s IS .....	60
<b>Obrázek 28</b> - Pozadí (30/70, ACN/H <sub>2</sub> O) .....	61
<b>Obrázek 29</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> v jeteli v 0 cm.....	62
<b>Obrázek 30</b> - Kvantifikace ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> ve vzorcích jetele v 0 cm .....	64



<b>Obrázek 31</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> v jeteli ve 10 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	65
<b>Obrázek 32</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> v jeteli ve 40 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	66
<b>Obrázek 33</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> v jeteli v 60 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	67
<b>Obrázek 34</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> ve vojtěšce v 0 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	68
<b>Obrázek 35</b> - Kvantifikace ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> ve vzorcích vojtěšky v 0 cm.....	69
<b>Obrázek 36</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> ve vojtěšce v 10 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	70
<b>Obrázek 37</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> ve vojtěšce v 20 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	71
<b>Obrázek 38</b> - Množství ABZ-SO a ABZ-SO <sub>2</sub> ve vojtěšce v 20 cm (o – analyt detekovaný pouze v jednom ze čtyř vzorků).....	72
<b>Obrázek 39</b> - Srážky v době experimentu v Pardubickém kraji (Byšť).....	75

## 9.2 Tabulky

<b>Tabulka 1</b> - Příklady terapeutického využití benzimidazolů.....	10
<b>Tabulka 2</b> - Různé funkce cytochromu P450 v rostlinách (Pandian et al. 2020).....	22
<b>Tabulka 3</b> - Ionizační techniky (Web 13, Gottvald 2013).....	38
<b>Tabulka 4</b> - Dělení analyzátorů na průletové a past'ové.....	40
<b>Tabulka 5</b> - Dělení analyzátorů podle rozlišovací schopnosti (RP).....	41
<b>Tabulka 6</b> - Typy záznamů (Friedecký a Lemr 2012; Nováková, Douša a kolektiv 2013)..	44
<b>Tabulka 7</b> - Rozdělení píceňin do skupin.....	50
<b>Tabulka 8</b> - Tabulka s jednotlivými koncentracemi.....	53
<b>Tabulka 9</b> - Rovnice lineární regrese vybrané kalibrační křivky konstruované v rostlinné matici.....	54
<b>Tabulka 10</b> – Chromatografické podmínky.....	57
<b>Tabulka 11</b> - Hmotnostní analyzátor.....	58
<b>Tabulka 12</b> – Validační parametry UHPLC-MS/MS metody ve vzorcích píceňin.....	58
<b>Tabulka 13</b> - Přesnost a preciznost metody.....	59
<b>Tabulka 14</b> – Retenční čas, molekulová hmotnost a vybrané SRM přechody.....	59

## 10 LITERATURA

ADAMEK, E., W. BARAN a A. SOBCZAK. Which factors make drugs persistent? A look at sulphonamides in Polish rivers. *Science for Environment Policy* [online]. 2017, **480** [cit. 2021-3-23]. Dostupné z:

[https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/which\\_factors\\_make\\_drugs\\_persistent\\_sulphonamides\\_polish\\_rivers\\_480na4\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/which_factors_make_drugs_persistent_sulphonamides_polish_rivers_480na4_en.pdf)

*Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18: Data Sheet* [online]. USA: Agilent Technologies, 2006, 1-2 [cit. 2021-5-5]. Dostupné z:

<https://www.agilent.com/cs/library/specifications/public/820114-002.pdf>

AICHELE, Dietmar. *Co tu kvete? Kvetoucí rostliny střední Evropy ve volné přírodě*. 3. vyd. EUROMEDIA GROUP, 2007. ISBN 978-80-242-1762-8.

ALVAREZ, Ana I., Gracia MERINO, Antonio J. MOLINA, José L. GARCIA, Mivis M. PULIDO a Julio G. PRIETO. Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *Internat. Journal of Pharmaceutics* [online]. 2003, **263**(1-2), 123-132 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: [doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00369-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00369-7).

AZAD, A.K., K. JAHAN, T. S. SATHI, R. SULTANA, S. A. ABBAS a ABMH UDDIN. Improvement of dissolution properties of albendazole from different methods of solid dispersion. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [online]. 2018, **8**(5), 475-480 [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: [dx.doi.org/10.22270/jddt.v8i5.1942](https://dx.doi.org/10.22270/jddt.v8i5.1942)

BANSAL, Yogita a Om SILAKARI. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **20**(21), 6208-6236 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013).

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Lenka SKÁLOVÁ, Lucie STUHLÍKOVÁ, Ivan VOKŘÁL, Tomáš VANĚK a Radka POLIPNÁ. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2015, **47**(3), 374-387 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [doi.10.3109/03602532.2015.1076437](https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1076437)

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Radka PODLIPNÁ a Lenka SKÁLOVÁ. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* [online]. 2016, **144**, 2290-2301 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [doi.10.1016/j.chemosphere.2015.10.137](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137)

BERK, Zeki. *Food Process Engineering and Technology*. 3. Academic Press, 2018 [cit. 2021-5-5]. ISBN 978-0-12-812018-7.

BORGES, Endler M. Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2015, **53**(4), 580–597 [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: 10.1093/chromsci/bmu090

BOROVCOVÁ, Lucie, Vladimír HAVLÍČEK a Karel LEMR. Rychlé chromatografické separace. *Chemické Listy* [online]. 2019, (113), 407–414 [cit. 2021-04-02]. Dostupné z: <https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/918091f140c34e3aa9a552eef677a4ef/RYCHLE-CHROMATOGRAFICKE-SEPARACE.pdf>

CARLSSON, Gunnar, Johan PATRING, Erik ULLERAS a Agneta OSKARSSON. Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology* [online]. 2011, **32**(1), 129-137 [cit. 2021-4-24]. ISSN 08906238. Dostupné z: 10.1016/j.reprotox.2011.05.015

CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8.

CRHOVÁ, Anna. *Biotransformace monepantelu u rostlin (Campanula rotundifolia, Plantago lanecolata)*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta.

CVILINK, Viktor, Jiří LAMKA a Lenka SKÁLOVÁ. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism* [online]. 2009, **41**(1), 8-26 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.10.1080/03602530802602880

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism* [online]. 2003, **3**(6), 561-597 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.10.2174/1389200023337054

DAYAN, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica* [online]. 2003, **86**(2-3), 141-159 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0001-706X. Dostupné z: doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00031-7

DIXON, David P., Mark SKIPSEY a Robert EDWARDS. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* [online]. 2010, **71**(4), 338-350 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012)

DOBŠÍKOVÁ, Radka a Zuzana ŠIROKÁ. *Farmakologie v produkci potravin a rezidua léčiv v potravinách*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 104 s. ISBN 978-80-7305-749-7.

DOLAN, John W. Calibration Curves, Part IV: Choosing the Appropriate Model. *LCGC* [online]. North America, 2009, **27**(6), 472–479 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/calibration-curves-part-iv-choosing-appropriate-model>

DOLAN, John W. When Should an Internal Standard be Used? *LCGC North America* [online]. 2012, **30**(6), 474–480 [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/when-should-internal-standard-be-used-0>

DOLEŽAL, P. a J. SKLÁDANKA. Vliv vegetačního stádia vojtěšky seté na chemické složení a in sacco stravitelnost organické hmoty. In: *Sborník Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*. LVI. Brno, 2008, s. 55-64.

DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1464-7.

DUNN, Warwick B. Mass Spectrometry in Systems Biology: An Introduction. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 2011, s. 15-35. ISBN 978-0-12-385118-5.

EDWARDS, Robert a David P. DIXON. Plant Glutathione Transferases. *Methods in Enzymology* [online]. 2005, **401**, 169-186 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01011-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01011-6)

ELIŠKA, Syslová, Landa PŘEMYSL, Lucie RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, et al. Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in *Arabidopsis thaliana* and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere* [online]. 2019, **218**, 662-669 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.135](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.135).

EPE, Christian a Roland KAMINSKY. New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology* [online]. 2013, **29**(3), 129-134 [cit. 2021-02-21]. ISSN 1471-4922. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.001](https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.001)

ÉVA, Csaba, Helga ZELENYÁNSZKI, Rita TÖMÖSKÖZI-FARKAS a László TAMÁS. Transgenic barley expressing the *Arabidopsis* AKR4C9 aldo-keto reductase enzyme exhibits

enhanced freezing tolerance and regenerative capacity. *South African Journal of Botany* [online]. 2014, **93**, 179-184 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.sajb.2014.04.010](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.04.010)

FEKETE, Szabolcs, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **63**, 2-13 [cit. 2021-04-02]. ISSN 01659936. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007](https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007)

FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2012, **20**(41), 152–157 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>

FURTADO, Luis Fernando Viana, Ana Cristina Passos DE PAIVA BELLO a Élide Mara Leite RABELO. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta Tropica* [online]. 2016, **162**, 95-102 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0001-706X. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.021](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.021).

GAO, Yuhong, Xuemei LI, Jianjun GUO, Xinsheng SUN a Zhenjun SUN. Reproductive responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to antiparasitic albendazole exposure. *Chemosphere* [online]. 2015, **120**, 1-7 [cit. 2021-4-24]. ISSN 00456535. Dostupné z: [10.1016/j.chemosphere.2014.05.030](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.030)

GOTTVALD, Tomáš. *Vývoj metody pro stanovení entekaviru v biologických materiálech s využitím UHPLC-MS/MS*. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova.

GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry: A textbook*. 2nd Edition. Springer International Publishing, 2011. ISBN 978-3-642-10709-2.

GUILLARME, Davy, Isabelle KOHLER, Serge RUDAZ a Szabolcs FEKETE. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **87**, 105-119 [cit. 2021-04-02]. ISSN 07317085. Dostupné z: [10.1016/j.jpba.2013.03.012](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.012)

HAAG, A.M., H. MIRZAEI a M. CARRASCO. *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications Editors*. Cham: Springer, 2016. ISBN 978-3-319-41446-1.

HIRSCHMANN, Felix, Florian KRAUSE a Jutta PAPENBROCK. The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and

functions. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2014, **5**, 556 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.10.3389/fpls.2014.00556

HO, C.S., C.W.K. LAM, M.H.M. CHAN a R.C.K. CHEUNG. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* [online]. 2003, **21**(1), 3-12 [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/>

HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

HUBERA, Christian, Martina PREISB, Patricia J. HARVEYB, Sylvia GROSSEC, Thomas LETZELC a Peter SCHRÖDER. Emerging pollutants and plants – Metabolic activation of diclofenac by peroxidases. *Chemosphere* [online]. 2016, **146**, 435-441 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.059

HUSSAIN, Chaudhery M., Deepak RAWTANI, Gaurav PANDEY a Maithri THARMAVARAM. HPLC for the toxicological analysis of forensic samples. *Handbook of Analytical Techniques for Forensic Samples*. Elsevier, 2021, s. 129-147. ISBN 978-0-12-822300-0.

JACHETTA, J. J., L. BOERSMA a A. P. APPLEBY. Apoplastic and Symplastic Pathways of Atrazine and Glyphosate Transport in Shoots of Seedling Sunflower. *Plant Physiology* [online]. 1986, **82**, 1000-1007 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1104/pp.82.4.1000

KAMANNA, Kantharaju. *Synthesis and Pharmacological Profile of Benzimidazoles* [online]. 2019 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.85229

KAŠPAROVÁ, Marie. Fytoestrogeny z jetele lučního. *Praktické lékárenství* [online]. 2013, **9**(4-5), 201-203 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2013/04/11.pdf>

KATZUNG, Bertram G., Susan B. MASTERS a Anthony J. TREVOR. *Basic And Clinical Pharmacology*. 12. USA: McGraw-Hill Education, 2012. ISBN 978-0-07-176402-5.

KNAUEROVÁ, Marta a Jana DRNKOVÁ. *Atlas bylin*. Brno: Edika, 2017. ISBN 978-80-266-1096-0.

KNEJZLÍK, Zdeněk, Jan KÁŠ a Tomáš RUMML. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*. 2000, **94**(10), 913-918 [cit. 2021-03-18].

KÖHLER, Peter. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology* [online]. 2001, **31**(4), 336-345 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0020-7519. Dostupné z: doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00131-X

KRUEGER, S. K. a D. E. WILLIAMS. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2005, **106**(3), 357-387 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.001

KUMAR, Ramasamy Rajesh, Jae Taek LEE a Jae Young CHO. Fate, occurrence, and toxicity of veterinary antibiotics in environment. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* [online]. 2012, **55**(6), 701-709 [cit. 2021-4-25]. ISSN 1738-2203. Dostupné z: 10.1007/s13765-012-2220-4

KYLE, P. B. Toxicology: GCMS. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Academic Press, 2017, s. 131-163. ISBN 978-0-12-800871-3.

LAMKA, Jiří a Lubimír DUCHÁČEK. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 4. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2790-8.

LEHMAN-MCKEEMAN, Lois D. a Stefan U. RUEPP. *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. 3rd Edition. Academic Press, 2018, s. 15-33. ISBN 978-0-12-809841-7.

LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-373-0.

LIU, Feng, Guang-Guo YING, Ran TAO, Jian-Liang ZHAO, Ji-Feng YANG a Lan-Feng ZHAO. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* [online]. 2009, **157**(5), 1636-1642 [cit. 2021-4-25]. ISSN 02697491. Dostupné z: 10.1016/j.envpol.2008.12.021

Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Academic Press, 2017, s. 1-15. ISBN 978-0-12-800871-3.

MATTSSON, Anna, Erik ULLERAS, Johan PATRING a Agneta OSKARSSON. Albendazole causes stage-dependent developmental toxicity and is deactivated by a mammalian metabolization system in a modified zebrafish embryotoxicity test. *Reproductive Toxicology* [online]. 2012, **34**(1), 31-42 [cit. 2021-4-24]. ISSN 08906238. Dostupné z: 10.1016/j.reprotox.2012.02.007

- MEECH, Robyn, John O. MINERS, Benjamin C. LEWIS a Peter I. MACKENZIE. The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: Versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2012, **134**(2), 200-218 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.009
- MENN, J. J. Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environmental Health Perspectives* [online]. 1978, **27** [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1289/ehp.7827113
- MIGLIORE, Luciana, Salvatore COZZOLINO a Maurizio FIORI. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* [online]. 2003, **52**(7), 1233-1244 [cit. 2021-4-25]. ISSN 00456535. Dostupné z: 10.1016/S0045-6535(03)00272-8
- MÜNKER, Bertram. *Plané rostliny střední Evropy*. Vyd. 2. V Praze: Knižní klub, 2005. Průvodce přírodou. ISBN 80-242-1365-6.
- NARAWONGSANONT, R., S. KABINPONG, B. AUIYAWONG a Ch. TANTITADAPITAK. Cloning and Characterization of AKR4C14, a Rice Aldo-Keto Reductase, from Thai Jasmine Rice. *The Protein Journal* [online]. 2012, **31**, 35-42 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1007/s10930-011-9371-8
- NAVRÁTILOVÁ, Martina, Lucie RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, Lenka SKÁLOVÁ, Barbora SZOTÁKOVÁ, Lenka LANGHANSOVÁ a Radka PODLIPNÁ. Pharmaceuticals in environment: the effect of ivermectin on ribwort plantain (*Plantago lanceolata* L.). *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2020, **27**(25), 202-210 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.10.1007/s11356-020-09442-4
- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- OH, Su Jin, Jeongim PARK, Min Jung LEE, So Young PARK, Jong-Hyeon LEE a Kyungho CHOI. Ecological hazard assessment of major veterinary benzimidazoles: acute and chronic toxicities to aquatic microbes and invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2006, **25**(8) [cit. 2021-4-24]. ISSN 0730-7268. Dostupné z: 10.1897/05-493R.1



PAREDES, A., T. DE CAMPOS LOURENCO, M. MARZAL, et al. In Vitro Analysis of Albendazole Sulfoxide Enantiomers Shows that ( )-(R)-Albendazole Sulfoxide Is the Active Enantiomer against *Taenia solium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(2), 944-949 [cit. 2021-4-24]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: 10.1128/AAC.01465-12

PARTRIDGE, Frederick A., Ruth FORMAN, Carole J. R. BATAILLE, Graham M. WYNNE, Marina NICK, Angela J. RUSSELL, Kathryn J. ELSE a David B. SATTELLE. Anthelmintic drug discovery: target identification, screening methods and the role of open science. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* [online]. 2020, **16**, 1203-1224 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: doi:10.3762/bjoc.16.105

PELIKÁN, Jan a Miroslav HÝBL. *Rostliny čeledi Fabaceae LINDL. (bobovité) České republiky: (se zvláštním zaměřením na druhy významné pro zemědělství)*. Troubsko: Zemědělský výzkum Troubsko, 2012. ISBN 978-80-905080-2-6.

PENNER, Natalia, Caroline WOODWARD a Chandra PRAKASH. Appendix: Drug metabolizing enzymes and biotransformation reactions. *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*. 2012, s. 545-565. ISBN 9780470542781. Dostupné z: doi.10.1002/9781118180778.app1

PILÁT, Albert a Otto UŠÁK. *Kapesní atlas rostlin: pom. kniha pro zákl. devítileté školy, stř. všeobec. vzdělávací, zeměd. a pedagog. školy. 7*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976. ISBN 14-166-76.

PODLIPNÁ, Radka, Lenka SKÁLOVÁ, Helena SEIDLOVÁ, et al. Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology* [online]. 2013, **144**, 216-224 [cit. 2021-4-24]. ISSN 09608524. Dostupné z: 10.1016/j.biortech.2013.06.105

PRASAIN, Jeevan K. *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*. Croatia: InTech, 2012 [cit. 2021-04-06]. ISBN 978-953-51-0141-3.

SALAHUDDIN, Mohammad SHAHARYAR a Avijit MAZUMDER. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2017, **10**(1), 157-173 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017

SALAHUDDIN, Mohammad SHAHARYAR a Avijit MAZUMDER. Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2017, **10**(1), 157-173 [cit. 2021-03-17]. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017.

SCHLAICH, Nikolaus L. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends in Plant Science* [online]. 2007, **12**(9), 412-418 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.009

SKÁLOVÁ, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. ISBN 978-80-2463-733-4.

SKLÁDANKA, Jiří. *Picinářství*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-111-6.

SMITH, R. Waddell. Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Second Edition. Academic Press, 2013, s. 603-608. ISBN 978-0-12-382166-9.

SON, Deok-Soo, Eun-Sook LEE a Samuel E. ADUNYAH. The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs. *Immune network* [online]. 2020, **20**(4), e29 [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: doi:10.4110/in.2020.20.e29

STIBOROVÁ, Marie, Jiří HUDEČEK, Jan PÁCA a Václav MARTÍNEK. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy*. 2004, **98**, 876-890 [cit. 2021-03-18].

STUHLÍKOVÁ, Lucie R., Radka PODLIPNÁ, Eliška SYSLOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ. Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2017, **141**, 37-42 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.10.1016/j.ecoenv.2017.03.014

STUHLÍKOVÁ, Lucie, Martina NAVRÁTILOVÁ, Lenka LANGHANSOVÁ, Kateřina MOŤKOVÁ, Radka PODLIPNÁ, Barbora SZOTÁKOVÁ a Lenka SKÁLOVÁ. The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (*Medicago sativa*). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(16) [cit. 2021-4-24]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: 10.3390/ijms21165943

STUHLÍKOVÁ, Lucie, Robert JIRÁSKO, Lenka SKÁLOVÁ, František PAVLÍK, Barbora SZOTÁKOVÁ, Michal HOLČAPEK, Tomáš VANĚK a Radka PODLIPNÁ. Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula*

rotundifolia). *Chemosphere* [online]. 2016, **157**, 10-17 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi.10.1016/j.chemosphere.2016.05.015

ŠANTRŮČEK, Jaromír. *Encyklopedie pícninářství*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2011. ISBN 978-80-213-1605-8.

ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8.

The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development. USA: Agilent Technologies, 2016. ISBN 1-800-227-9770.

VAN EERD, L. L., R. M. ZABLOTOWICZ, R. E. HOAGLAND a J. Ch. HALL. Pesticide Metabolism in Plants and Microorganisms. *Weed Science* [online]. 2003, **51**(4), 472 - 495 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2

VOLNÝ, Michael. Kvantitativní analýza s využitím hmotnostní spektrometrie. *Chemické Listy* [online]. 2020, **114**, 179–186 [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/application::paper.paper/3560-Article-Text-5132-1-10-20200309.pdf>

WAGIL, Marta, Anna BIAŁK-BIELIŃSKA, Alan PUCKOWSKI, Katarzyna WYCHODNIK, Joanna MASZKOWSKA a Ewa MULKIEWICZ. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2015, **22**(4), 2566–2573 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: doi.10.1007/s11356-014-3497-0

WANG, Y, Y TANG, LL XU a XP DIAO. Ecotoxicological effects of albendazole on *Eisenia fetida*. *The Journal of Applied Ecology* [online]. 2009, **20**(9), 2296-2300 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/20030157>

WEXLER, Philip. *Encyclopedia of Toxicology*. 3. San Diego, United States: Academic Press, 2014. ISBN 9780123864543.

XIAN, Feng, Shuwei LI a Siqi LIU. Rapid Biosynthesis of Stable Isotope-Labeled Peptides from a Reconstituted In Vitro Translation System for Targeted Proteomics. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 2015, s. 347-366. ISBN 978-0-12-803048-6.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, Maciej J., Keith A. HOFFMASTER, Ken-ichi NEZASA, Melanie N. TALLMAN a Kim L. R. BROUWER. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and

glutathione metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2006, **27**(5), 447-486 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [doi.org/10.1016/j.ejps.2005.12.007](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.12.007)

## 10.1 Elektronické zdroje (weby)

**Web 1:** FONTANA, Josef, Martina ŠAJDÍKOVÁ a Patrik MAŘA. Játra a biotransformace xenobiotik. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta* [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <http://fblt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>

**Web 2:** *InterPro: Classification of protein families* [online]. [cit. 2021-5-5]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR000960/>

**Web 3:** STEJSKALOVÁ, Lucie a Alice RULCOVÁ. *Základy ADME a toxického hodnocení léčiv v preklinickém vývoji OCH/ADME* [online]. Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, s. 1-121 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/OCH\\_ADME-5.-Metabolismus.pdf?fbclid=IwAR1V9SvcjLnWNQ92UTqANnX5t3zbuFgV598ZdMT47OJkH6jSVmfArW2pt68](http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/OCH_ADME-5.-Metabolismus.pdf?fbclid=IwAR1V9SvcjLnWNQ92UTqANnX5t3zbuFgV598ZdMT47OJkH6jSVmfArW2pt68)

**Web 4:** VERCRUYSE, Jozef a Edwin CLAEREBOU. Benzimidazoles. *MSD MANUAL: Veterinary Manual* [online]. Kenilworth, NJ, USA: Merck Sharp & Dohme, 2014 [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://www.msddvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/benzimidazoles>

**Web 5:** Český hydrometeorologický ústav [online]. [cit. 2021-5-3]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/>

**Web 6:** Shimadzu: *Excellence in Science* [online]. [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html)

**Web 7:** *High Performance Liquid Chromatography – HPLC* [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>

**Web 8:** Michal Holčapek – *Mass Spectrometry Group* [online]. University of Pardubice [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [https://holcapek.upce.cz/teaching/04\\_MS\\_analyzatory\\_cast1.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/04_MS_analyzatory_cast1.pdf)

**Web 9:** PubChem: Open Chemistry database. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Albendazole>

**Web 10:** *Vodní režim rostlin: Výchovný program* [online]. s. 1-27 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <http://atraktivnibiologie.upol.cz/docs/pdf/Vodni%20rezim%20rostlin.pdf>

**Web 11:** JUNQUERA, Pablo. Benzimidazoles for veterinary use as Anthelmintics in cattle, sheep, goats, pig, poultry, horses, dogs and cats against parasitic worms. *PARASITIPEDIA.net: Parasites of Dogs, Cats, Horses & Livestock: Biology & Control* [online]. 2018 [cit. 2021-03-17]. Dostupné z: [https://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2440&Itemid=2701](https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2440&Itemid=2701)

**Web 12:** *Waters: The science of what's possible* [online]. [cit. 2021-04-01]. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_CZ/Industries/nav.htm?cid=514263&locale=en\\_CZ](https://www.waters.com/waters/en_CZ/Industries/nav.htm?cid=514263&locale=en_CZ)

**Web 13:** *Michal Holčapek – Mass Spectrometry Group* [online]. University of Pardubice [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: [https://holcapek.upce.cz/teaching/02-03\\_Ionizacni\\_techiky.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/02-03_Ionizacni_techiky.pdf)

**Web 14:** SKLÁDANKA, Jiří. Vojtěška setá: *Medicago sativa* L. *Multimediální učební texty pícninářství: Ústav výživy zvířat a pícninářství MZLU v Brně* [online]. 2005 [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_222\\_multitext/picniny/sklady.php?odkaz=medicago.html](https://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/picniny/sklady.php?odkaz=medicago.html)

**Web 15:** NIKOLOVA, Irina. *Chromatografické metody* [online]. Dostupné také z: [http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke\\_metody\\_2014.pdf](http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf)

**Web 16:** DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>