

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Alena Grasserová

FYTOEXTRAKCE BENZODIAZEPINŮ Z VODNÝCH  
ROZTOKŮ

Phytoextraction of Benzodiazepines from Water Solutions

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14. května 2019.

## **Abstrakt, klíčová slova**

V této práci byly provedeny fytoextrakční experimenty se čtyřmi benzodiazepiny: chlordiazepoxidem, diazepamem, alprazolamem a bromazepamem, a to na rostlině kukuřici seté (*Zea mays*). Ke sterilně vysázeným rostlinám kukuřice seté bylo po 14 dnech růstu přidáno čerstvé médium (dle Murashiga a Skooga) obohacené o benzodiazepin o výchozí koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Médium bylo následně odebíráno vždy po 24 hodinách a koncentrace benzodiazepinu zjištěna metodou HPLC s UV detekcí. Při stejných podmínkách byly na HPLC po ukončení fytoextrakčních experimentů měřeny i vzorky extrahovatelných reziduí benzodiazepinů za účelem zjištění míry translokace léčiv do nadzemních částí rostlin.

Nejvyšší fytoextrakční účinnost (množství léčiva extrahovaného 1 gramem biomasy za 24 hodin) byla zjištěna pro chlordiazepoxid, následoval bromazepam a alprazolam, nejnižší fytoextrakční účinnost vykazoval diazepam.

Analýza extrahovatelných reziduí potvrdila translokaci do nadzemních částí rostliny u všech testovaných benzodiazepinů. Touto cestou může tedy docházet ke kontaminaci potravních řetězců živočichů.

Klíčová slova: fytoremediace, fytoextrakce, benzodiazepiny, extrahovatelná rezidua, HPLC.

## **Abstract, key words**

The aim of this thesis was to perform a phytoextraction experiment with benzodiazepines chlordiazepoxide, diazepam, alprazolam and bromazepam on corn plant (*Zea mays*). After 14 days of growing of sterile cultivation, new medium (Murashige and Skoog) contaminated with benzodiazepine was added. The starting concentration of benzodiazepine was  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . After every 24 hours, a sample of medium was collected. The actual concentration of benzodiazepine was measured on HPLC with UV detection. Extractable residues were also analysed to find out whether the benzodiazepine is being translocated to the upper parts of the plant. The same HPLC conditions were used for these samples.

The greatest phytoextraction efficiency (the amount of drug extracted by 1 gram of biomass in 24 hours) was observed for chlordiazepoxide, followed by bromazepam, alprazolam and diazepam respectively.

The extractable residues analysis confirmed the translocation to the upper parts of the plant for every of the benzodiazepines tested. That indicates a threat for the animals through the food chain contamination.

Key words: phytoremediation, phytoextraction, benzodiazepines, extractable residuals, HPLC.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala mému školiteli doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za jeho odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a jeho cenné rady v průběhu práce v laboratoři i při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za její podporu a poskytnutí zázemí během mých studií.

## Obsah

Prohlášení.....	- 2 -
Abstrakt, klíčová slova .....	- 3 -
Abstract, key words .....	- 4 -
Poděkování .....	- 5 -
Obsah .....	- 6 -
Seznam zkratk a symbolů .....	- 8 -
1 Úvod.....	- 10 -
2 Cíl práce.....	- 12 -
3 Teoretická část.....	- 13 -
3.1 Fytoremediace .....	- 13 -
3.1.1 Fytostabilizace .....	- 14 -
3.1.2 Rhizodegradace .....	- 15 -
3.1.3 Rhizofiltrace.....	- 15 -
3.1.4 Fytodegradace.....	- 15 -
3.1.5 Fytoextrakce .....	- 15 -
3.1.6 Fytovolatilizace.....	- 16 -
3.1.7 Výhody a nevýhody fytoremediace .....	- 17 -
3.1.8 Fytoremediace kukuřicí setou ( <i>Zea mays</i> ) .....	- 18 -
3.2 Benzodiazepiny .....	- 19 -
3.2.1 Struktura benzodiazepinů .....	- 22 -
3.2.2 Chlordiazepoxid.....	- 24 -
3.2.3 Diazepam.....	- 25 -
3.2.4 Alprazolam .....	- 26 -
3.2.5 Bromazepam .....	- 27 -
3.2.6 Benzodiazepiny v přírodě.....	- 28 -
3.2.7 Vliv benzodiazepinů na přírodu a organismy, bioakumulace .....	- 29 -
3.2.8 Benzodiazepiny v České republice .....	- 30 -
4 Experimentální část .....	- 32 -
4.1 Rostlinný materiál .....	- 32 -
4.2 Přístroje.....	- 32 -
4.3 Chemikálie.....	- 33 -
4.4 Pracovní postup .....	- 35 -

4.4.1	Sadba rostlin.....	- 35 -
4.4.2	Přidání léčiva a odběr vzorků média .....	- 36 -
4.4.3	Analýza vzorků na HPLC .....	- 37 -
4.4.4	Izolace extrahovatelných reziduí léčiv a jejich analýza na HPLC.....	- 39 -
5	Výsledky a diskuze .....	- 40 -
5.1	Chlordiazepoxid .....	- 40 -
5.2	Diazepam .....	- 43 -
5.3	Alprazolam .....	- 44 -
5.4	Bromazepam .....	- 48 -
5.5	Porovnání fytoextrakce benzodiazepinů .....	- 49 -
5.6	Analýza extrahovatelných reziduí .....	- 52 -
6	Závěr .....	- 54 -
	Použitá literatura .....	- 55 -

## Seznam zkratek a symbolů

ACN – acetonitril

API – aktivní farmaceutická substance (active pharmaceutical ingredient)

BDZ – benzodiazepiny

CNS – centrální nervová soustava

CYP3A4 – enzym cytochrom P450, izoforma 3A4

ČOV – čistírna odpadních vod

DDD – definovaná denní dávka

EDDS – ethylendiamindijantarová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

$FÚ$  – fytoextrakční účinnost [mg/g biomasy/24 h]

GABA –  $\gamma$ -aminomáselná kyselina

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

$IC_{50}$  – koncentrace pro 50% inhibici (inhibition concentration 50) [ $mg \cdot l^{-1}$ ]

$K_d$  – distribuční koeficient

$K_{ow}$  – koeficient oktanol-voda

$LC_{50}$  – koncentrace pro 50% úmrtnost organismu (lethal concentration 50) [ $mg \cdot l^{-1}$ ]

LOD – limit detekce (limit of detection) [ $mg \cdot l^{-1}$ ]

LOQ – limit kvantifikace (limit of quantification) [ $mg \cdot l^{-1}$ ]

MeOH – methanol

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

$M_w$  – molekulová hmotnost [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

p.a. – pro analýzu

pKa – záporný logaritmus kyselých disociačních konstant

rpm – otáčky za minutu (revolutions per minute)

SSRI – selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (selective serotonin reuptake inhibitor)

$t_{1/2}$  – biologický poločas [h]

TF – translokační faktor

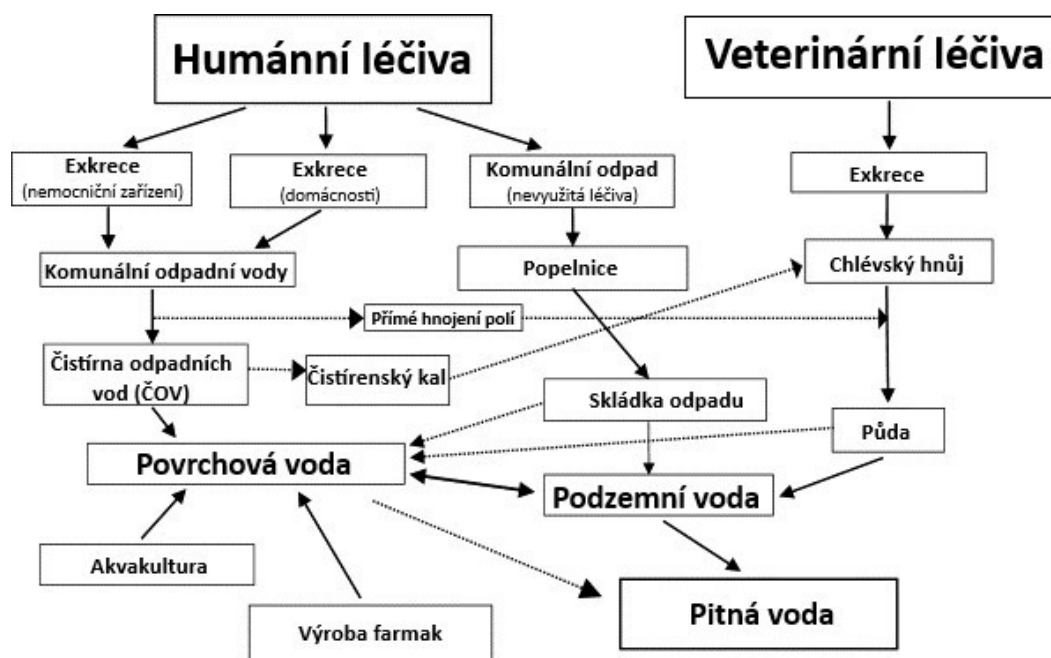
UV – ultrafialová oblast (ultraviolet)

v/v – objem/objem

v/v/v – objem/objem/objem

## 1 Úvod

Vývoj analytických metod během posledních desetiletí umožnil detekci látek, které byly dříve neznámé nebo se v přírodě vyskytovaly ve velmi nízkých, dříve užívanými metodami nedetekovatelných, koncentracích <sup>1,2</sup>. Mezi tyto „nové“ polutanty řadíme i léčiva, jež se užívají čím dál více jak v humánním, tak veterinárním lékařství <sup>3,4</sup>. Jejich rezidua byla zjištěna v odpadních vodách, vodě povrchové, podzemní i pitné <sup>2,5</sup>. Léčiva a jejich metabolity se do vody dostávají různými cestami. Nalezneme je v odpadních vodách z domácností nebo nemocničních zařízení. Další z cest je nevhodná likvidace nepoužitých léčiv nebo léčiv s prošlou dobou expirace. Léčiva se dále dostávají do čistíren odpadních vod (ČOV), z těch ale mnohdy nejsou dostatečně odstraněna a putují dále do vod povrchových a podzemních. Cesta veterinárních léčiv vede zpravidla přes chlévský hnůj užívaný k hnojení polí. Průsaky z polí a skládek pak ovlivňují jak vodu povrchovou, tak i vodu podzemní. Takto se léčiva a jejich rezidua dostávají potravním řetězcem do těl vodních i suchozemských organismů. Schéma možných zdrojů a cest léčiv ve vodě ukazuje obrázek číslo 1.



Obrázek č. 1: Schéma možných zdrojů a cest léčiv ve vodě, přeloženo do češtiny <sup>6</sup>.

Tyto polutanty se v životním prostředí hromadí již dlouhou dobu, nicméně jejich dopad na vodní organismy je předmětem zkoumání až v posledních letech. Zjištění jejich přítomnosti ve všech složkách přírody vyvolalo obavy z jejich negativních účinků na člověka a zvířata. Studie se také zabývají zkoumáním takzvaného koktejlového efektu, kdy v případě výskytu více aktivních látek může dojít k potenciaci výsledného účinku <sup>7</sup>. Aktivní farmaceutické substance (anglicky zkratka API) jsou komplexní molekuly, které jsou vyvíjeny a užívány pro jejich víceméně specifickou biologickou aktivitu. Tyto molekuly jsou většinou polární povahy, s molekulární hmotností od 200 do 1000 Da. Aby nedošlo k jejich předčasnému odbourání v organismu, jsou tyto látky často perzistentní, a tudíž dochází k bioakumulaci jak v organismech, tak v životním prostředí <sup>8</sup>.

Detekce mikropolutantů v životním prostředí má za následek nutnost studia nových remediačních metod účinných k odstranění dané látky. Tyto remediační metody mají za cíl úplné nebo částečné odstranění polutantu či jeho přeměnu v netoxickou látku <sup>9</sup>. Patří mezi ně například incinerace, chemická dekompozice nebo bioremediace, což je metoda využívající k odstranění polutantu v přírodě přirozeně se vyskytující bakterie, houby a rostliny.

## 2 Cíl práce

Stále rostoucí výroba i konzumace léčiv představuje hrozbu pro životní prostředí, neboť léčiva a jejich metabolity jsou vylučována do odpadních vod, ze kterých mnohdy nejsou zcela odstraněna. Dostávají se tak do přírody a mohou negativně ovlivňovat jak vodní, tak suchozemské organismy.

Benzodiazepiny, léčiva s anxiolytickým účinkem, byly při analýzách nalezeny ve vodách po celém světě a byl dokázán jejich negativní vliv na vodní živočichy. Tato diplomová práce má za cíl stanovit a porovnat fytoextrakční účinnost pro benzodiazepiny chlórdiazepoxid, diazepam, alprazolam a bromazepam rostlinou kukuřicí setou (*Zea mays*). Dále pak analýzou extrahovatelných reziduí zjistit míru translokace benzodiazepinů v rostlině.

Projekt zahrnuje:

- a) Rešerši týkající se benzodiazepinů chlórdiazepoxidu, diazepamu, alprazolamu a bromazepamu a jejich vlivů na přírodu a živé organismy.
- b) Přípravu kultivačních médií pro rostliny *Zea mays*.
- c) Přípravu *in vitro* kultur celých rostlin *Zea mays*.
- d) Provedení fytoextrakčních kultivací ve sterilních podmínkách s postupnými odběry kultivačního média (fytoextrakční studie).
- e) Analýzu extrahovatelných reziduí z řad kultivací.
- f) HPLC analýzy a kvantifikaci benzodiazepinů v kultivačních médiích.
- g) Vyhodnocení fytoextrakčních experimentů.
- h) Posouzení kultivačních experimentů z hlediska fytoextrakce a kontaminace rostlin.

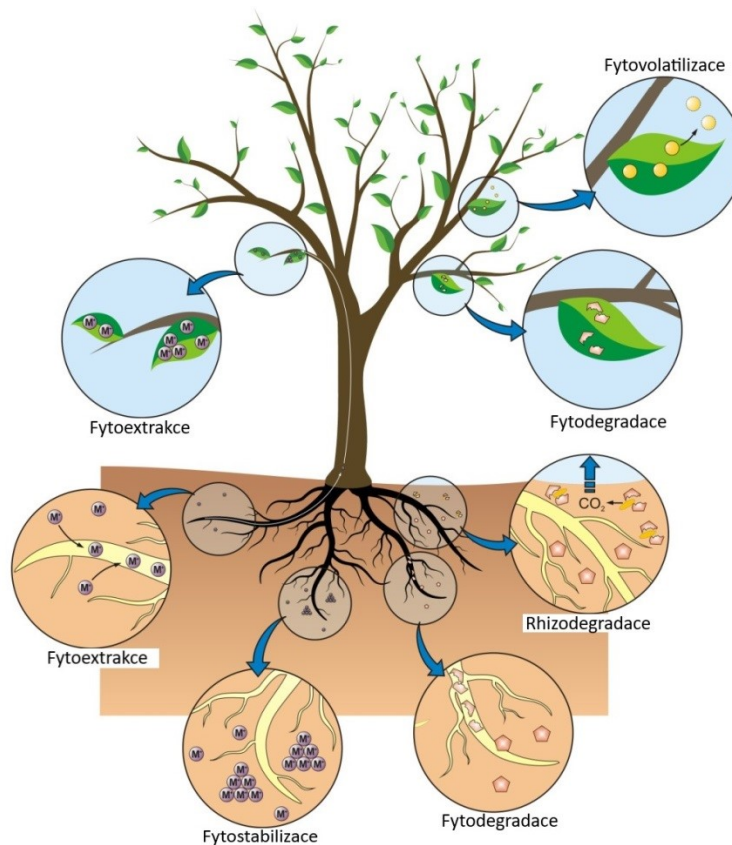
## 3 Teoretická část

### 3.1 Fytoremediace

Fytoremediace, z řeckého „*phyton*“ – *rostlina* a latinského „*remediare*“ – *napravit*, je metoda využívající rostliny k sanaci xenobiotikem znečištěné půdy, vody nebo vzduchu <sup>10</sup>. Jedná se o biologickou dekontaminaci, kam také řadíme dekontaminaci pomocí bakterií, mikroorganismů, užití biofiltrů a biofilmů nebo metodu aktivovaného kalu <sup>11</sup>. Rostliny se nacházejí přímo v zasažené oblasti, mluvíme tedy o *in-situ* dekontaminaci. V průběhu jejich růstu do sebe spolu s vodou a ostatními živinami rostliny absorbují i xenobiotikum, které je následně uloženo v rostlinných tkáních či v ideálním případě přeměněno na méně toxický produkt.

Procesy odbourávání se v rostlině liší na základě toho, jaké povahy je odstraňované xenobiotikum <sup>11,12</sup>. Xenobiotika anorganické povahy (těžké kovy a radionuklidy) jsou zpravidla rostlinou extrahována a translokována do nadzemních částí ve formě toxického kationtu nebo oxyaniontu <sup>12</sup>. V nich je xenobiotikum převedeno na méně toxickou formu. Anorganický polutant také může být uložen v kořenech rostliny. Mezi organická xenobiotika vhodná k odstranění fytoremediací patří například polychlorované bifenylly (dioxin), polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo[a]pyren), nitroaromáty (trinitrotoluen) a lineární halogenované uhlovodíky (trichlorethylen). Tyto látky jsou nejen toxické, ale mnohdy také teratogenní a karcinogenní. Při fytoremediaci těchto xenobiotik dochází ideálně až k mineralizaci za vzniku oxidu uhličitého, dusičnanů a amoniaku <sup>12,13</sup>.

Podle procesů, které v rostlině po přijetí xenobiotika probíhají, dělíme fytoremediaci na fytostabilizaci, rhizodegradaci, rhizofiltraci, fytodegradaci, fytoextrakci, fytoakumulaci a fytovolatilizaci <sup>11</sup>. Většinou se setkáváme s kombinací výše zmíněných dějů <sup>14</sup>. Schéma fytoremediačních strategií znázorňuje obrázek číslo 2.



Obrázek č. 2: Schéma fytoředivačních strategií, přeloženo do češtiny <sup>15</sup>.

### 3.1.1 Fytostabilizace

Proces fytostabilizace je prvním krokem fytoředivace <sup>11</sup>. Jedná se o imobilizaci kontaminantů pomocí adsorpce či akumulace na kořenovém systému rostliny. Cílem je zamezit migraci škodlivé látky do podzemní vody, jejímu šíření větrem a konečně jejímu vstupu do potravního řetězce <sup>16</sup>. Při této metodě jsou rozhodující půdní podmínky, které mají vliv na rozpustnost a mobilitu xenobiotika. Dále se uplatňují huminové látky, jež dokáží navázat kontaminant v půdě <sup>17</sup>. Fytostabilizace se často využívá pro finální úpravu ploch po použití jiných sanačních technologií.

### **3.1.2 Rhizodegradace**

Rhizodegradací rozumíme rozklad polutantu pomocí mikroorganismů žijících v blízkosti kořenů rostliny <sup>11,18</sup>. Rhizosféra je oblast asi 1 mm kolem kořenového systému, kterou rostlina ovlivňuje vylučováním kořenových exsudátů. Vzniká prostředí velice výživově bohaté, jež zvyšuje mikrobiální aktivitu 10 - 100krát.

Tato metoda je také nazývána rhizosférní degradací, fytostimulací nebo bioremediací s asistencí rostlin <sup>11</sup>.

### **3.1.3 Rhizofiltrace**

Rhizofiltrace využívá taktéž kořenového systému rostliny. Je to absorpce, adsorpce, zakoncentrování a precipitace léčiva pomocí kořenů <sup>19</sup>.

### **3.1.4 Fytodegradace**

Pokud rostlina degraduje cizorodou látku pomocí vlastních metabolických procesů, mluvíme o fytodegradaci <sup>11</sup>. Zapojují se rostlinné enzymy jako například oxygenasy nebo nitroreduktasy. Degradace se odehrává buď interně přímo v rostlině, nebo externě mimo rostlinu.

### **3.1.5 Fytoextrakce**

Fytoextrakce je příjem xenobiotika a jeho translokace z kořenů do nadzemních částí rostliny <sup>20</sup>. Ty jsou posléze sklizeny a spáleny, vzniká energie a popel, ze kterého lze v případě fytoextrakce kovu daný kov recyklovat. V literatuře se s ní též setkáme jako s fytoakumulací nebo fytoabsorpcí <sup>16</sup>.

### **3.1.6 Fytovolatilizace**

Těkavé organické látky jsou odbourávány především fytovolatilizací<sup>21</sup>. Jedná se o proces, kdy rostlina vylučuje xenobiotikum do ovzduší ve formě par. Pokud je cizorodá látka vylučována nadzemní částí rostliny, mluvíme o přímé fytovolatilizaci. Druhým typem je nepřímá fytovolatilizace, kdy je látka do ovzduší vylučována kořeny skrz půdu.

### 3.1.7 Výhody a nevýhody fytořediacce

Fytořediacce je relativně levná, ale časově náročná metoda <sup>15</sup>. Koncentrace xenobiotika a ostatních toxických látek musí být v tolerančním limitu rostliny, jinak dochází k zastavení růstu rostliny nebo k jejímu úhynu. Další výhody a nevýhody fytořediacce jsou uvedeny v tabulce číslo 1.

Tabulka č. 1: Výhody a nevýhody fytořediacce <sup>11,14,15,18,20</sup>.

Výhody fytořediacce	Nevýhody fytořediacce
levná metoda	časově náročná metoda
vhodná pro široké spektrum polutantů	velké množství vyprodukované biomasy
společensky dobře přijímaná	metabolity cizorodé látky mohou být pro rostliny toxické
kombinuje v sobě více dějů, pomocí kterých lze polutant odbourat lze provádět <i>in-situ</i>	polutant musí být v dosahu kořenového systému rostliny se stárnutím rostliny se snižuje její schopnost přijímat polutant
estetická metoda	rostlina s extrahovaným polutantem musí být správně zlikvidována po konzumaci rostliny s extrahovaným polutantem hrozí vnik polutantu do potravního řetězce průběh fytořediacce je značně závislý na podmínkách vnějšího prostředí kontaminanty mohou být mobilizovány do podzemní vody

### 3.1.8 Fytoremediace kukuřicí setou (*Zea mays*)

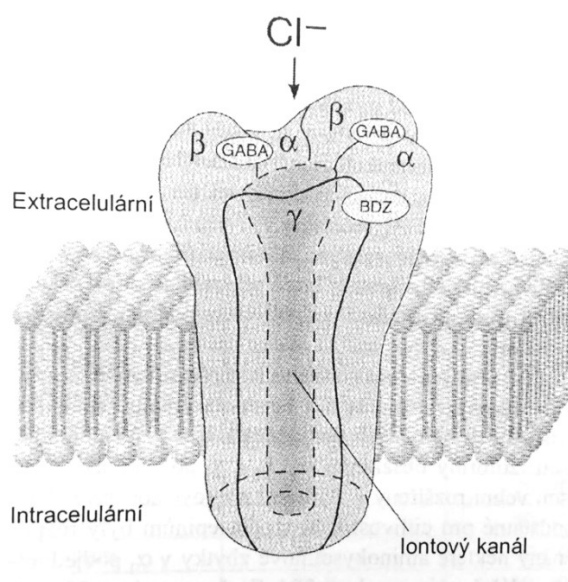
Kukuřice setá je hojně pěstovaná, rychle rostoucí obilnina s rozsáhlým vláknitým kořenovým systémem<sup>22</sup>. Vhodná k fytoremediaci je především proto, že dobře odolává nepříznivým podmínkám a její kultivace je snadná. Kukuřice setá je rezistentní vůči těžkým kovům a je schopná je akumulovat v listových částech.

Vysoká fytoakumulace byla pozorována především u kovů kadmia a olova<sup>23</sup>. Zkoumána byla i fytoakumulace organických látek, polycyklických aromatických uhlovodíků<sup>24</sup>. Fytoakumulační schopnosti kukuřice seté lze podpořit přidáním chelátů EDTA a EDDS nebo aplikací elektrického pole<sup>25,26</sup>.

### 3.2 Benzodiazepiny

Benzodiazepiny, hypnotika druhé generace, patří k dosud nejpoužívanějším anxiolytikům a sedativům<sup>27</sup>. Jako první byl na trh uveden chlordiazepoxid a diazepam, a to na počátku 60. let 20. století<sup>27,28</sup>.

Benzodiazepiny jsou vysoce účinné látky s převážně anxiolytickým účinkem<sup>29,30</sup>. U některých derivátů je potom vyjádřena zvýšená sedace či hypnotický efekt. V organismu se tyto látky váží na GABA<sub>A</sub> receptory, čímž alostericky zvýší účinek inhibičního transmiteru GABA ( $\gamma$ -aminomáselná kyselina). GABA zvyšuje vstup *Cl<sup>-</sup>* iontů do buňky chloridovým iontovým kanálem, dochází ke zvýšení membránového potenciálu buňky. GABA<sub>A</sub> receptory se mohou lišit uspořádáním podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , a to v různých pětičetných kombinacích. Existuje tak mnoho druhů těchto receptorů. Benzodiazepiny se zřejmě váží na  $\gamma$  podjednotku, GABA pak na podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$ . Model makromolekulárního komplexu GABA<sub>A</sub> znázorňuje obrázek číslo 3. K dalším účinkům benzodiazepinů řadíme také svalově-relaxační a antikonvulzivní účinek<sup>31</sup>. Vědci se domnívají, že pokud se podaří odhalit všechny podjednotky receptoru GABA<sub>A</sub> a jejich seskupení v receptoru, mohou být různorodé účinky benzodiazepinů eliminovány na jeden cíleně selektovaný.



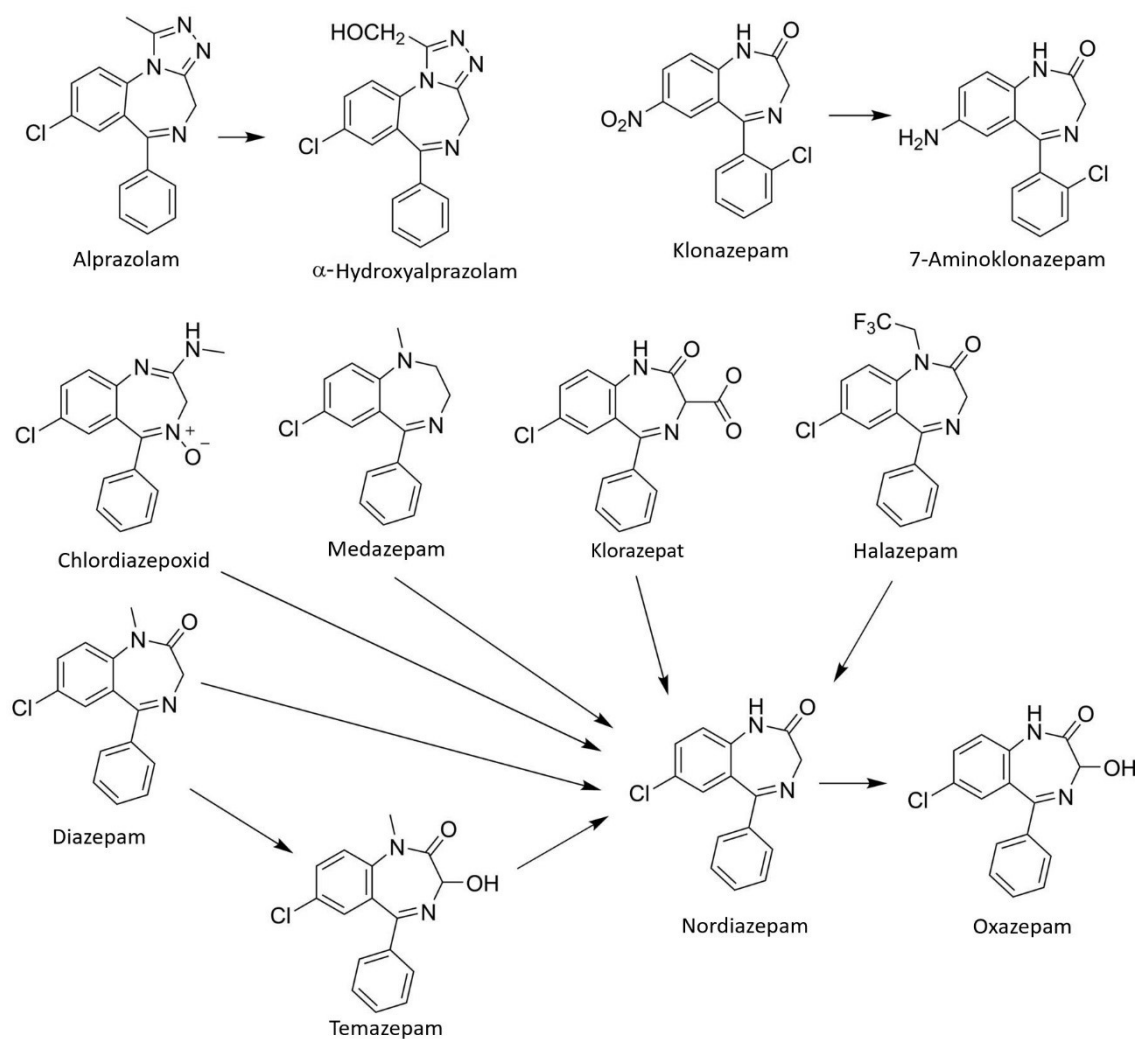
Obrázek č. 3: Makromolekulární komplex GABA<sub>A</sub><sup>30</sup>.

Terapeutická šíře benzodiazepinů je velká, jako antidotum lze použít flumazenil, který funguje jako antagonist na vazebných místech pro benzodiazepiny<sup>29</sup>. Jedná se o jediného antagonistu benzodiazepinových receptorů, jež je v současné době k dispozici pro klinické použití<sup>30</sup>. Užívá se ke zrušení tlumivého účinku na CNS při předávkování benzodiazepiny a v anestezii a diagnostice, pokud chceme po aplikaci benzodiazepinů urychlit návrat do normálního stavu pacienta. Vzhledem ke krátkému poločas flumazenilu (0,7 – 1,3 h) daném rychlou jaterní clearancí se účinky benzodiazepinů často vrací, je proto nutné opakované podání antagonisty.

Skupina benzodiazepinů je rozsáhlá, zástupci se ale podstatně liší hlavně svými farmakokinetickými vlastnostmi a metabolismem. Benzodiazepiny lze dělit buď na základě jejich farmakokinetických vlastností, nebo podle jejich klinické účinnosti<sup>28</sup>. Zástupce benzodiazepinů spolu s jejich rozdělením dle biologických poločasů nalezneme v tabulce číslo 2. Látky označené symbolem hvězdičky se v těle mění na aktivní metabolity, jež mají biologický poločas delší než parentní sloučenina. Většinou je tímto aktivním metabolitem desmethyldiazepam (nazýván také jako nordiazepam nebo nordazepam;  $t_{1/2} = 39 - 96$  h), u flurazepamu pak desalkylflurazepam ( $t_{1/2} = 36 - 120$  h). Vybrané benzodiazepiny a jejich metabolity jsou na obrázku číslo 4.

Tabulka č. 2: Rozdělení benzodiazepinů dle délky jejich biologického poločasu <sup>32</sup>. Látky označené symbolem hvězdičky (\*) se v těle mění na aktivní metabolity, jež mají biologický poločas delší než parentní sloučenina.

Rozdělení benzodiazepinů dle délky biologického poločasu	Benzodiazepin	Biologický poločas [h]
Dlouho působící ( $t_{1/2} > 48$ h)	diazepam*	20 – 70
	klorazepat*	
	prazepam*	
	oxazolam*	
	flurazepam*	velmi krátký
	chlordiazepoxid*	6 – 28
	desmethyldiazepam	36 – 96
	medazepam*	1 – 2
	chlordesmethyldiazepam	60 – 78
	pinazepam*	10 – 15
Středně dlouho působící ( $t_{1/2} = 24 - 48$ h)	flunitrazepam	10 – 40
	nitrazepam	20 – 30
	bromazepam	20 – 30
	estazolam	20 – 30
Krátkce působící ( $t_{1/2} < 24$ h)	lorazepam	10 – 20
	oxazepam	5 – 15
	temazepam	8 – 20
	lormetazepam	8 – 20
	alprazolam	8 – 15
Velmi krátce působící ( $t_{1/2} = 1 - 7$ h)	triazolam	1,5 – 5
	midazolam	1 – 4
	brotizolam	4 – 7
	klotiazepam	4 – 6
	etizolam	5 – 7

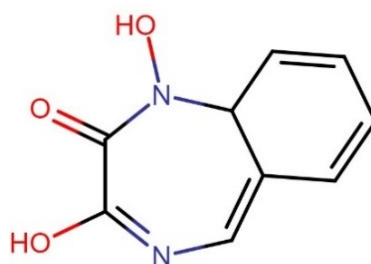


Obrázek č. 4: Vybrané benzodiazepiny a jejich metabolity, přeloženo do češtiny<sup>33</sup>.

### 3.2.1 Struktura benzodiazepinů

Třemi společnými strukturálními znaky benzodiazepinů jsou<sup>27</sup>:

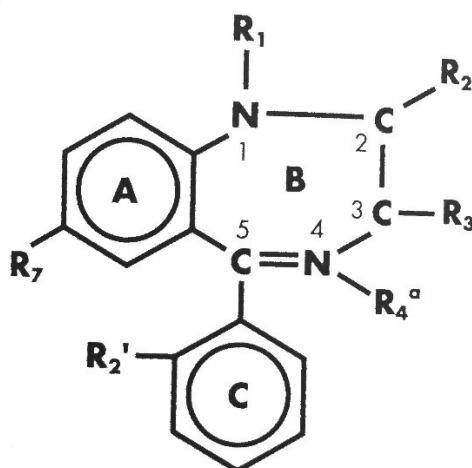
Skelet 1,3-dihydroxobenzo[e][1,4]diazepin-2-onu, jež je znázorněn na obrázku číslo 5. Oxoskupina v poloze 2 může být nahrazena kyanoskupinou, která je buď součástí imidazolového cyklu, nebo 1,2,4-triazolového cyklu kondenzovaného s benzodiazepinem.



Obrázek č. 5: Strukturní vzorec 1,3-dihydrobenzo[e][1,4]diazepin-2-onu.

Druhým strukturálním znakem benzodiazepinů je substituovaná fenylová skupina v poloze 5. Se substitucí tohoto fenylu halogenem, nejčastěji fluorem či chlorem, v poloze *ortho* vzrůstá účinnost daného benzodiazepinu.

Posledním strukturálním znakem je substituce v poloze 7, a to elektronegativní skupinou (chlor či nitroskupina, která obvykle zvýrazňuje hypnotický účinek). Obecný strukturální vzorec benzodiazepinů najdeme na obrázku číslo 6.

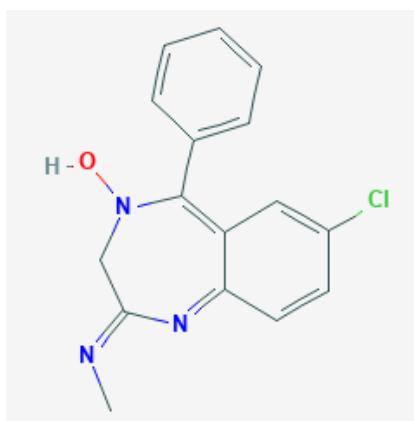


Obrázek č. 6: Obecný strukturální vzorec benzodiazepinů <sup>34</sup>.

### 3.2.2 Chlordiazepoxid

Chlordiazepoxid (*Librium*) byl prvním syntetizovaným benzodiazepinem, a to polským organickým chemikem Leem Henrykem Sternbachem, který si ho nechal v roce 1958 patentovat <sup>28,35</sup>. Jeho účinky jsou přirovnávány k účinkům barbiturátů či alkoholu <sup>36</sup>. Užívá se především k potlačení úzkostných stavů a abstinenčních příznaků z odnětí alkoholu, například při deliriu tremens. Dále ho užívají pacienti s poruchami spánku, křečovými stavy, migrénami, žaludečními vředy či syndromem dráždivého tračníku. K častým nežádoucím účinkům chlordiazepoxidu patří závratě, ospalost, poruchy spánku, zmatenost, bolesti hlavy a podrážděnost <sup>37</sup>.

Chlordiazepoxid se řadí k benzodiazepinům s delším biologickým poločasem. Poločas samotného chlordiazepoxidu je v rozmezí 6 – 28 hodin, biologický poločas jeho aktivního metabolitu desmethyldiazepamu je ale mnohem delší, dosahuje až 200 hodin <sup>32,38</sup>. Chlordiazepoxid nevyvolává okamžité účinky, ale jeho výhoda je v tom, že v těle dokáže udržet konstantní hladinu účinné látky (aktivního metabolitu desmethyldiazepamu), což je právě u dlouhodobé anxiolytické léčby žádoucí <sup>29</sup>. Strukturální vzorec chlordiazepoxidu je na obrázku číslo 7. Název dle IUPAC zní: 7-chlor-2-methylamino-5-fenyl-3H-1,4-benzodiazepin-4-oxid.

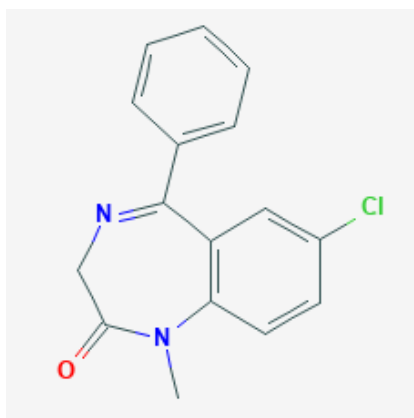


Obrázek č. 7: Strukturální vzorec chlordiazepoxidu.

### 3.2.3 Diazepam

Krátce po chlordiazepoxidu se v roce 1965 dostal na trh ještě účinnější benzodiazepin, diazepam<sup>39</sup>. Diazepam (*Valium*) se zanedlouho po jeho objevení stal jedním z nejprodávanějších léčiv všech dob, a to především díky vysoké účinnosti, vysoké biodostupnosti a rychlému nástupu účinku. Diazepam se užívá k léčbě úzkostí, panických záchvatů, při nespavosti, k uklidnění a potlačení epileptických záchvatů, k potlačení svalových křečí, k léčbě závislosti na alkoholu, benzodiazepinech i opiátech a konečně k léčbě Menièreovy choroby (onemocnění vnitřního ucha)<sup>40</sup>. Dále se může podávat před operačními zákroky k uvolnění napětí a potlačení úzkosti pacienta nebo k navození anestezie. Nejčastěji pozorovanými nežádoucími účinky diazepamů jsou ospalost, únava, ztráta koordinace, bolest hlavy nebo alergické kožní projevy<sup>41</sup>.

Diazepam je velmi dobře rozpustný v tucích, s tím souvisí jeho vysoká biodostupnost a rychlá distribuce do tkání<sup>42</sup>. Biologický poločas diazepamů se pohybuje v rozmezí 20 – 70 hodin<sup>32</sup>. Je odbouráván v játrech enzymem CYP3A4 na aktivní metabolit desmethyl-diazepam (nordiazepam). Hydroxylací desmethyl-diazepamů vzniká další aktivní metabolit, oxazepam, který je následně glukuronidací přeměněn na oxazepam glukuronid. Hlavní účinnou látkou je desmethyl-diazepam, oxazepam je konjugován téměř ihned po jeho vzniku. Strukturální vzorec diazepamů je na obrázku číslo 8. Název dle IUPAC zní: 7-chlor-1-methyl-5-fenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-on.

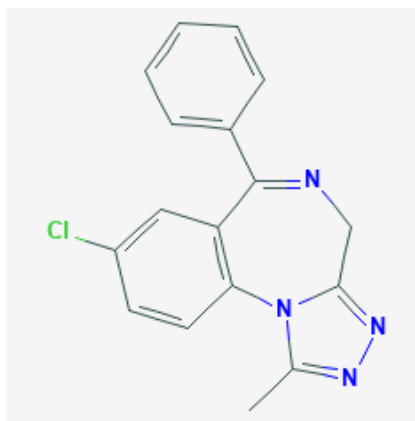


Obrázek č. 8: Strukturální vzorec diazepamů.

### 3.2.4 Alprazolam

Alprazolam (*Xanax*) je nejčastěji předepisovaným benzodiazepinem, v letech 2013, 2011, 2009 a 2005 se ve Spojených státech amerických stal nejčastěji předepisovaným psychofarmakem <sup>43,44</sup>. Alprazolam je benzodiazepinovým derivátem, obsahuje triazolový kruh. Tento triazolobenzodiazepin se užívá především k léčbě úzkostí a panických poruch <sup>45</sup>. Jako nejčastější nežádoucí účinky se uvádí ospalost, závratě, únava, bolest hlavy, dysartrie (motorická porucha řeči), porucha paměti či deprese.

Alprazolam řadíme mezi benzodiazepiny s kratším biologickým poločasem, který se pohybuje v rozsahu 8 – 15 hodin <sup>32</sup>. Odbouráván je v játrech mikrosomální oxidací pomocí cytochromu P450 (CYP3A4) <sup>46</sup>. Identifikováno bylo 29 metabolitů, ale 80 % léčiva opouští tělo v nezměněné podobě. Hlavními metabolity jsou 4-hydroxyalprazolam a  $\alpha$ -hydroxyalprazolam, jež ale vykazují nižší benzodiazepinovou aktivitu než samotný alprazolam <sup>47</sup>. Strukturální vzorec alprazolamu je na obrázku číslo 9. Název dle IUPAC zní: 8-chlor-1-methyl-6-fenyl-4*H*-[1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]benzodiazepin.

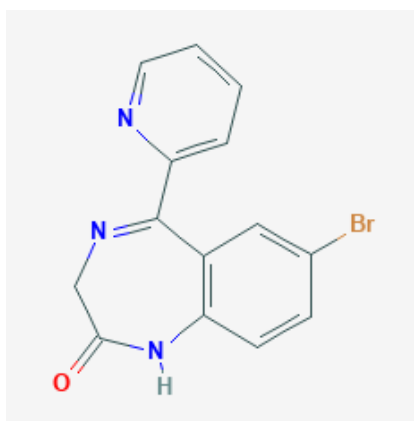


Obrázek č. 9: Strukturální vzorec alprazolamu.

### 3.2.5 Bromazepam

Bromazepam (*Lexaurin*) je 2-oxobenzodiazepin <sup>32</sup>. Používá se hlavně k léčbě úzkostí, ale i k léčbě nespavosti, gastrointestinálních spasmů a enurézy. Mezi nežádoucí účinky naopak patří zmatenost, přecitlivělost, otok obličeje a hrdla, porucha libida, emoční porucha, deprese, kožní reakce nebo také porucha paměti <sup>48</sup>.

Bromazepam řadíme mezi benzodiazepiny se středně dlouhým biologickým poločasem, jež činí 20 – 30 hodin <sup>32</sup>. Je odbouráván v játrech oxidativní biotransformací <sup>49</sup>. Hlavním metabolitem je 3-hydroxybromazepam, ten je následně konjugován a vyloučen, biologicky aktivní je tedy samotný bromazepam. Strukturní vzorec bromazepamu je na obrázku číslo 10. Název dle IUPAC zní: 7-brom-5-pyridin-2-yl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-on.



Obrázek č. 10: Strukturní vzorec bromazepamu.

### 3.2.6 Benzodiazepiny v přírodě

Rozšířené užívání benzodiazepinů má za následek jejich detekci v životním prostředí. V odpadní vodě se jedná o koncentrace v řádech nanogramů, dokonce i mikrogramů na litr. Diazepam byl nalezen v povrchových a odpadních vodách v Německu, a to v koncentracích  $0,033 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $0,053 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  <sup>50</sup>. Dále pak v odpadních vodách v Belgii v koncentraci  $1,18 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  <sup>51</sup>. Při jiné studii byla zjištěna přítomnost benzodiazepinů v 86 % vzorcích odebraných ze 30 různých evropských řek (včetně řeky Blanice v České republice a řeky Dunaj) <sup>52</sup>. Z 13 testovaných benzodiazepinů jich bylo detegováno 9, přičemž nejčastěji detegován byl oxazepam, temazepam, klobazam a bromazepam. Průměrná koncentrace benzodiazepinů byla stanovena na  $9,6 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ . Studie prováděna na Slovinsku kvantifikující benzodiazepiny v odpadních vodách místních nemocnic uvádí nejvyšší koncentraci  $158 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  pro bromazepam,  $111 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  pro diazepam a  $72 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  pro oxazepam <sup>53</sup>. V odpadních vodách nemocnic Šanghaje, nejlidnatějšího města Číny, byla nalezena koncentrace lorazepamu  $11,31 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ , alprazolamu  $2,46 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ , diazepamu  $1,83 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a bromazepamu  $1,50 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  <sup>54</sup>. Benzodiazepiny lorazepam, diazepam a alprazolam byly kvantifikovány i v povrchových vodách v oblasti Madridu ve Španělsku <sup>55</sup>. Zjištěné hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $34,1 - 167,0 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  pro lorazepam,  $3,4 - 55,7 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  pro diazepam a  $2,9 - 9,1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  pro alprazolam. Koncentrace benzodiazepinů byla sledována i ve vodě mořské. V laguně Mar Menor, nacházející se u pobřeží Španělska (Středozemní moře), byl kvantifikován lorazepam, a to koncentrace až  $41,8 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  <sup>56</sup>. Jeho naměřená průměrná koncentrace byla mnohem vyšší v zimním období než v letním, což je podle autorů nejspíše dáno zvýšenou konzumací tohoto léčiva právě v zimním období. Některé benzodiazepiny vykazují značnou rezistenci vůči fotodegradaci, což ještě zvyšuje pravděpodobnost jejich perzistence v životním prostředí <sup>57</sup>.

### 3.2.7 Vliv benzodiazepinů na přírodu a organismy, bioakumulace

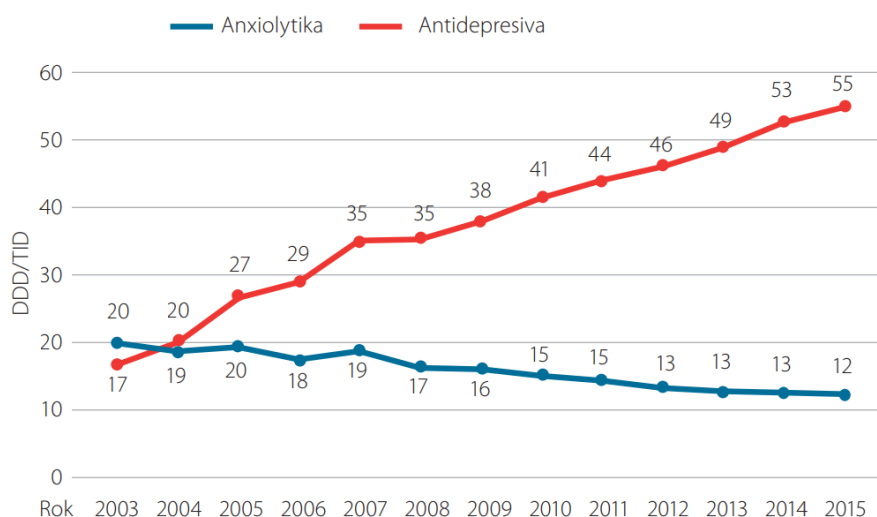
Léčiva a jejich aktivní metabolity, které se dostanou do komunálních odpadních vod, jsou hrozbou předně pro vodní organismy. Toxicita těchto látek je zkoumána nejčastěji na řasách, mušlích a rybách. Alprazolam byl například nalezen v ústřicích (*Crassostrea gigas*) v deltě řeky Ebro ve Španělsku<sup>58</sup>. Jeho koncentrace byla stanovena na  $0,8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  suché hmotnosti organismu. Při stejné studii byl detegován i diazepam, a to v mořských řasách *Saccharina latissima* a *Laminaria digitata*. Dále bylo zkoumáno chování ryby okouna říčního (*Perca fluviatilis*) ve vodě znečištěné  $1,8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  oxazepamu<sup>59</sup>. Léčivo u ryb vyvolalo zvýšenou aktivitu, sníženou společenskost a zkrácení časového intervalu mezi jednotlivými kmeními. Článek také zmiňuje, že v případě oxazepamu dochází k vysoké bioakumulaci, jeho průměrná koncentrace v rybí tkáni byla po sedmi dnech expozice  $18 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Neuroendokrinní změny byly pozorovány u danií pruhovaných (*Danio rerio*) po akutní expozici diazepamem<sup>60</sup>. Akutní toxicita diazepamem byla zkoumána také na mořské řase *Tetraselmis chuii* ( $\text{IC}_{50} = 16,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), korýšovi *Artemia parthenogenetica* ( $\text{LC}_{50} = 12,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a euryhalinní rybě *Gambusia holbrooki* ( $\text{LC}_{50} = 12,7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )<sup>61</sup>.

Fytoakumulace benzodiazepinů byla prokázána u oxazepamem a lorazepamem u trávy *Zoysia Matrella*<sup>54</sup>. Další studie se zaměřila na fytořemediaci sedmi benzodiazepinů (chlordiazepoxid, klonazepam, diazepam, flurazepam, oxazepam, temazepam a triazolam) pomocí ředkve (*Raphanus sativus*) a červené řepy (*Beta vulgaris*)<sup>62</sup>. Největší příjem byl zaznamenán u neutrálních benzodiazepinů, benzodiazepinů s nízkým distribučním koeficientem  $K_d$  nebo u benzodiazepinů, jejichž logaritmus koeficientu oktanol-voda ( $\log K_{ow}$ ) měl při pH 6,3 hodnoty kolem 2. Příklad benzodiazepinů s vysokým  $K_d$  obsahujících ionizovatelné skupiny byl naopak u použitých druhů rostlin limitován. Na konci experimentu bylo v obou rostlinách detegováno všech sedm benzodiazepinů. Nejvyšší koncentrace byla změřena pro oxazepam, nejméně se pak fytoakumuloval flurazepam. Při nedávno prováděné studii byla zkoumána fytořemediace diazepamem, a to při akutní expozici (7 dní/koncentrace  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) i expozici chronické (28 dní/koncentrace  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )<sup>63</sup>. Pro experiment byly

použity rostliny zeleniny okurky (*Cucumis sativus*) a ředkve (*Raphanus sativus*), dále pak buněčná kultura rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Pomocí HPLC-MS byly v rostlinách detegovány tři hlavní metabolity diazepamu – nordiazepam, temazepam a oxazepam.

### 3.2.8 Benzodiazepiny v České republice

Z údajů zveřejněných na webových stránkách SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv) vyplývá, že nejužívanějšími antipsychotiky v ČR jsou antidepresiva<sup>64</sup>. Deprese je nejčastější psychická porucha, dle průzkumů jí v České republice trpí až 7,2 % obyvatel. V posledních 25 letech se spotřeba psychofarmak zvedla šestinásobně, mohou za to především „moderní“ antidepresiva – selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) – jež v mnohých případech nahrazují právě benzodiazepiny<sup>65</sup>. Od benzodiazepinů se ustupuje předně kvůli velkému množství nežádoucích účinků včetně vzniku závislosti. Nárůst spotřeby antidepresiv a pokles spotřeby anxiolytik v minulých letech je znázorněn v grafu na obrázku číslo 11. Předpokládá se, že spotřeba antidepresiv na úkor benzodiazepinových anxiolytik bude růst i v letech budoucích.



Obrázek č. 11: Spotřeba antidepresiv a anxiolytik v definovaných denních dávkách na 1000 obyvatel (DDD/TID) v České republice v letech 2003 – 2015<sup>66</sup>, zdroj dat: sukl.cz.

Tabulka číslo 3 uvádí běžně užívané benzodiazepiny v České republice spolu s jejich komerčními názvy.

Tabulka č. 3: Benzodiazepiny a jejich komerční názvy v České republice <sup>67</sup>.

Benzodiazepin	Komerční název v České republice
chlordiazepoxid	<i>Elenium</i>
diazepam	<i>Apaurin, Diazepam Slovakofarma, Diazepam Desitin</i>
alprazolam	<i>Frontin, Helex, NeuroI, Xanax</i>
bromazepam	<i>Lexaurin</i>

## 4 Experimentální část

### 4.1 Rostlinný materiál

Fytoextrakce vybraných benzodiazepinů byla zkoumána na kukuřici seté (*Zea mays*), kultivaru DKC3969. Semena poskytla firma Monsanto ČR s.r.o.

### 4.2 Přístroje

Sterilizace nádobí a médií byla provedena v tlakovém hrnci *Morphy Richards Rapid Cook*. Sterilní sadba semen rostlin a následné odběry médií byly prováděny v laminárním boxu *Labox FBB 120*, tepelná sterilizace nástrojů a povrchů pak s využitím kahanu *Fuego pro WLD-TEC*. Odebrané vzorky a vzorky kalibrační řady byly uchovávány v mrazicím boxu *Liebherr* při cca  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ , případně v lednici *Liebherr* při cca  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Centrifugace vzorků před HPLC analýzou byla provedena na centrifuze *Labnet Spectrafuge 16M* (poloměr rotoru 50 mm, 14 000 rpm). Léčivá látka alprazolam byla vážena na analytických vahách *KERN ABT 120-5DNM*. Zásobní roztoky léčiv byly centrifugovány na centrifuze *Hettich EBA 21* (poloměr rotoru 70 mm, 6 000 rpm). K sonikaci zásobních roztoků léčiv, homogenizovaných vzorků rostlin a k odplynění mobilní fáze byla použita ultrazvuková lázeň *Fisherbrand FB 15050*. Po ukončení kultivace byla hmotnost rostlin stanovena na předvážkách *Adam AQT-600*. Zvážené rostliny určené k analýze extrahovatelných reziduí byly homogenizovány pomocí přístroje *IKA T18 digital ULTRA TURRAX*. Homogenizované a zfiltrované extrakty rostlin byly odpařeny na rotační vakuové odparce *Heidolph Hei-VAP Precision*. Dávkování roztoků bylo prováděno automatickými pipetami *Nichirio* (Japonsko) s nastavitelným objemem.

Koncentrace léčiv v kultivačních médiích rostlin byla zjišťována pomocí HPLC sestavy, jež se skládala z vysokotlakého čerpadla *Shimadzu LC-20AD* a z UV detektoru *Shimadzu SPD-20A*. Analýzy byly provedeny na koloně *Agilent Eclipse XDB-C18*

o rozměrech 4,6 x 150 mm a částicemi o velikosti 5 µm s předkolonou *XDB-C18*. Nástřik probíhal pomocí dávkovacího ventilu *Rheodyne* s dávkovací smyčkou 20 µl. K vyhodnocení dat byl použit program *Clarity DataApex*.

### 4.3 Chemikálie

V tabulce číslo 4 jsou uvedeny názvy použitých benzodiazepinů spolu s jejich výrobcem.

Tabulka č. 4: Vybraná benzodiazepinová léčiva pro experiment.

Léčivo	Komerční název	Výrobce	Obsah léčivé látky v jedné tabletě	Čistota
chlordiazepoxid	<i>Elenium</i>	Polfa Tarchomin S.A.	10 mg	z tablety
diazepam	<i>Diazepam Spofa</i>	Slovakofarma	10 mg	z tablety
alprazolam	Alprazolam C-IV	Sigma-Aldrich	x	min. 98,0 %
bromazepam	<i>Lexaurin</i>	Krka d.d.	3 mg	z tablety

K odmaštění semen byl použit 70% roztok ethanolu, k jejich sterilizaci dále pak 20% a 10% roztok *SAVA*, výrobce *Unilever ČR, spol s.r.o.* Semena rostlin byla kultivována ve sterilně připraveném médiu bez cukru dle Murashiga a Skooga s pH upraveným na 5,5. Složení tohoto média je uvedeno v tabulce číslo 5. Chemikálie na přípravu médií byly čistoty p.a.

Tabulka č. 5: Složení média dle Murashiga a Skooga <sup>68</sup>.

Složky média	Chemikálie	Koncentrace [mg · l <sup>-1</sup> ]
Makrosložky	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650
	KNO <sub>3</sub>	1 900
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Mikrosložky	KI	0,83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	22,3
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8,3
Železitý komplex	Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8

Deionizovaná voda na přípravu médií a mobilních fází pro HPLC byla připravena přístrojem *IWA 5 roso Watek s.r.o.* Ostatní rozpouštědla a chemikálie použité při experimentu jsou uvedeny v tabulce číslo 6.

Tabulka č. 6: Použitá rozpouštědla a jiné chemikálie.

Chemikálie	Výrobce	Čistota
methanol	Lachner	HPLC gradient grade
ethanol	Lachner	p.a.
dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	min. 99,5 %
acetonitril	VWR Chemicals	HPLC super gradient
kyselina trihydrogenfosforečná (85 %)	Sigma-Aldrich	HPLC grade
dichlormethan	VWR Chemicals	HPLC gradient grade
síran sodný bezvodý p.a.	LACHEMA, a.s.	min. 99,0 %

## 4.4 Pracovní postup

### 4.4.1 Sadba rostlin

Semena rostlin kukuřice seté byla nejprve odmaštěna v 70% roztoku ethanolu po dobu 1 minuty. Poté byla sterilizována SAVEM, a to jeho 20% roztokem po dobu 10 minut a 10% roztokem po dobu 20 minut. Následně byla semena v laminárním boxu čtyřikrát promyta sterilizovanou vodou, přičemž ve čtvrtém přidavku byla semena cca 10 minut ponechána. Pomocí sterilní pinzety opálené v plameni kahanu byla semena přenesena do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml obsahujících 15 ml sterilního média bez cukru dle Murashiga a Skooga. Do každé z baněk byla vnesena 4 semena, hrdlo baněk bylo za účelem zabránění kontaminace opáleno v plameni kahanu a uzavřeno aluminiovou folií. Pro každé léčivo bylo takto připraveno šest baněk, které byly poté umístěny do kultivační místnosti s teplotou vzduchu 26 °C. Osvětlení bylo realizováno zářivkami *Cool White (Phillips)* ze vzdálenosti 40 cm, 36 W/m<sup>2</sup>, a to ve světelném režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma. Ukázka sterilně kultivované rostliny kukuřice seté po 14 dnech od vysazení je na obrázku číslo 12.



Obrázek č. 12: Ukázka sterilně kultivované rostliny kukuřice seté.

#### 4.4.2 Přidání léčiva a odběr vzorků média

Poté, co rostliny dosáhly optimálního vzrůstu, cca 14 dní po vysazení semen, byly zbytky původního média z baněk odlity. Následně bylo do baněk přidáno 100 ml čerstvého sterilního média. Léčiva byla přidávána vždy jako roztok v dimethylsulfoxidu; do baněk bylo přidáno takové množství zásobního roztoku léčiva, aby jeho teoretická počáteční koncentrace v médiu byla vždy  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U alprazolamu byla zkoumána ještě fytoextrakce na nižší koncentrační hladině léčiva, kdy teoretická počáteční koncentrace léčiva v médiu činila  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Zároveň byla připravena kontrolní kultivace obsahující jen médium a příslušné léčivo, abychom potvrdili, že se léčivo nerozkládá samovolně působením světla či ostatních složek média. Bezprostředně po přidání média obohaceného léčivem byl ze všech kultivačních baněk proveden odběr (vzorek číslo 1) ke zjištění skutečné počáteční koncentrace léčiva v médiu. Odběry byly

prováděny sterilně v laminárním boxu pomocí injekční stříkačky s jehlou, a to vždy po cca 0,7 ml. Realizace provádění odběrů v laminárním boxu je zdokumentována na obrázku číslo 13. Vzorky v Eppendorf zkumavkách byly uchovávány v mrazicím boxu. Další odběry médií se uskutečňovaly vždy po 24 hodinách, a to až do doby, než musely být kvůli kontaminacím ve formě plísní či bakterií kultivace rostlin ukončeny. Poté byly rostliny vyjmuty z baněk, omyty vodou, osušeny a rozděleny na kořenové a nadzemní části. Byla stanovena čerstvá hmotnost kultivovaných rostlin, které byly následně zamraženy.



Obrázek č. 13: Ukázka provádění odběrů vzorků v laminárním boxu.

#### **4.4.3 Analýza vzorků na HPLC**

Analýze vzorků na HPLC předcházelo nalezení vhodné mobilní fáze, průtoku a také vlnových délek měření. Použité hodnoty podmínek měření pro každé léčivo jsou obsahem tabulky číslo 7.

Tabulka č. 7: Hodnoty podmínek měření koncentrace léčiv v médiu na HPLC.

Koncentrace H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> byla min. 85 %.

Léčivo	Složky mobilní fáze	Poměry složek mobilní fáze (v/v/v) nebo (v/v)	Vlnová délka [nm]	Průtok [ml · min <sup>-1</sup> ]
chlordiazepoxid	ACN : H <sub>2</sub> O : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	28 : 72 : 0,1	235	0,7
diazepam	MeOH : H <sub>2</sub> O : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	60 : 40 : 0,1	225	1,0
alprazolam	ACN : H <sub>2</sub> O	40 : 60	254	0,5
bromazepam	ACN : H <sub>2</sub> O : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	28 : 72 : 0,1	233	1,0

Pro každé studované léčivo byl nejdříve sestrojen kalibrační graf. Kalibrační roztoky jednotlivých léčiv byly připraveny v methanolu a jejich koncentrace byla: 1; 2,5; 5; 10 a 15 mg · l<sup>-1</sup>. Na základě ploch jejich píků byla programem *Clarity* vyhodnocena kalibrační závislost. Vzorky médií byly po rozmražení centrifugovány po dobu 20 minut a následně analyzovány na HPLC s UV detekcí. Koncentrace léčiv byla stanovena pomocí programu *Clarity* na základě předchozí externí kalibrace. Mez detekce byla vypočtena jako trojnásobek šumu základní linie, mez kvantifikace pak jako desetinásobek šumu základní linie. Mez detekce (limit of detection – LOD) a mez kvantifikace (limit of quantification – LOQ) léčiv je uvedena v tabulce číslo 8.

Tabulka č. 8: Mez detekce a mez kvantifikace stanovovaných léčiv.

Léčivo	LOD [mg · l <sup>-1</sup> ]	LOQ [mg · l <sup>-1</sup> ]
chlordiazepoxid	0,06	0,20
diazepam	0,01	0,04
alprazolam (pro 5 mg · l <sup>-1</sup> )	0,03	0,10
alprazolam (pro 10 mg · l <sup>-1</sup> )	0,01	0,04
bromazepam	0,02	0,05

#### **4.4.4 Izolace extrahovatelných reziduí léčiv a jejich analýza na HPLC**

Po rozmražení nadzemních a kořenových částí rostlin z fytoextrakčních experimentů bylo ke všem částem přidáno 50 ml destilované vody. Takto vytvořená směs byla dále homogenizována pomocí homogenizačního přístroje. Poté bylo přidáno 50 ml dichlormethanu a roztok byl vložen do ultrazvukové lázně na 20 minut. Poté byl roztok přenesen do dělicí nálevky a řádně protřepán. V dělicí nálevce byl roztok ponechán do úplného rozdělení fází, spodní fáze dichlormethanu se sledovanou látkou byla oddělena a zbavena vody bezvodým síranem sodným. Druhý den bylo sušidlo odfiltrováno a filtráty byly odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce. Odparek byl dále rozpuštěn vždy ve 2 ml methanolu. Roztoky byly ponechány v lednici a analyzovány na HPLC s UV vždy za stejných podmínek jako vzorky fytoextrakčních experimentů. Pokud došlo k překročení koncentračních mezí kalibrační přímky, byly vzorky extrahovatelných reziduí dále zředěny a skutečná koncentrace látky ve vzorku byla zpětně dopočítána. Identita stanovovaných látek byla potvrzena měřením vzorku rezidua s přídatkem standardního roztoku léčiva.

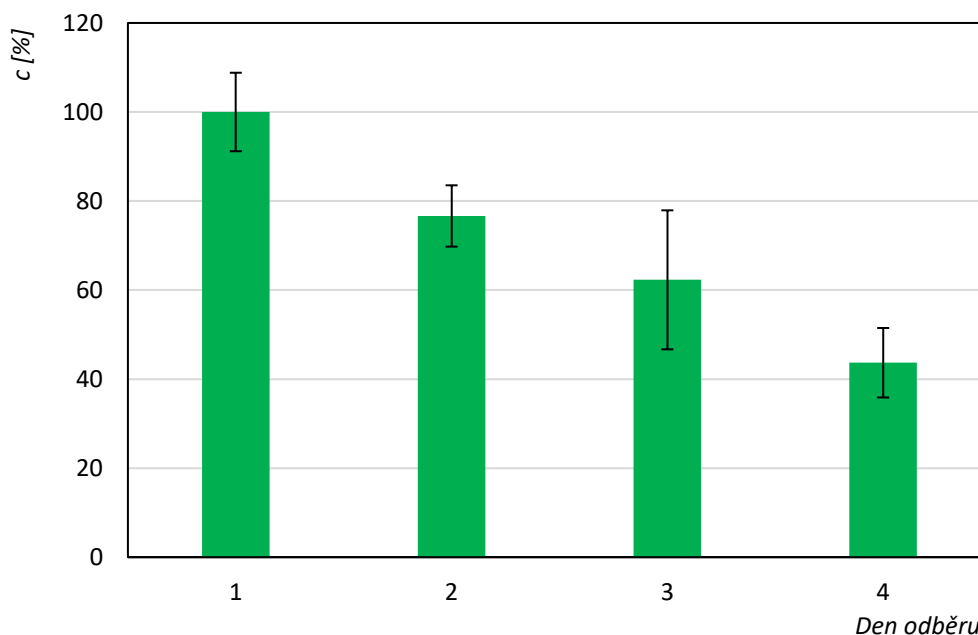
## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Chlordiazepoxid

Teoretická výchozí koncentrace v médiu pro chlordiazepoxid, stejně jako pro ostatní zkoumané benzodiazepiny, byla  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Ihned po přidání zásobního roztoku léčiva bylo médium krouživým pohybem baňky promícháno a byl proveden první odběr ke zjištění přesné výchozí koncentrace chlordiazepoxidu v médiu. Hodnota přístrojem změřené výchozí koncentrace se od teoretické zpravidla liší. Pokud je změřená hodnota vyšší než ta teoretická, můžeme to přičítat nižšímu objemu média, jež je sterilizováno v tlakovém hrnci přikryto jen aluminiovou folií a může tedy docházet k jeho částečnému odpaření. Nižší hodnoty koncentrace mohou být naopak vysvětleny okamžitou sorpcí média na kořenový systém rostliny, jež se dá také považovat za počátek fytoimediačních procesů rostliny. Dalším důvodem může být naředění předchozím médiem, jež nemohlo být z baňky kvůli zachování sterility celého procesu zcela odstraněno.

Další odběry média byly prováděny ve sterilním prostředí vždy po cca 24 hodinách. Odběry byly prováděny až do té doby, než byly v baňkách pozorovány známky kontaminace média či úhynu rostliny. Naměřené hodnoty koncentrací byly vyjádřeny jako procento koncentrace výchozí. Průměr těchto hodnot byl pro každý den zaznamenán do sloupcového grafu. Směrodatná odchylka výsledků je vyjádřena ve formě chybových úseček. Výsledky fytoextrakční studie chlordiazepoxidu jsou součástí grafu na obrázku číslo 14.

## Fytoextrakce chlordiazepoxidu



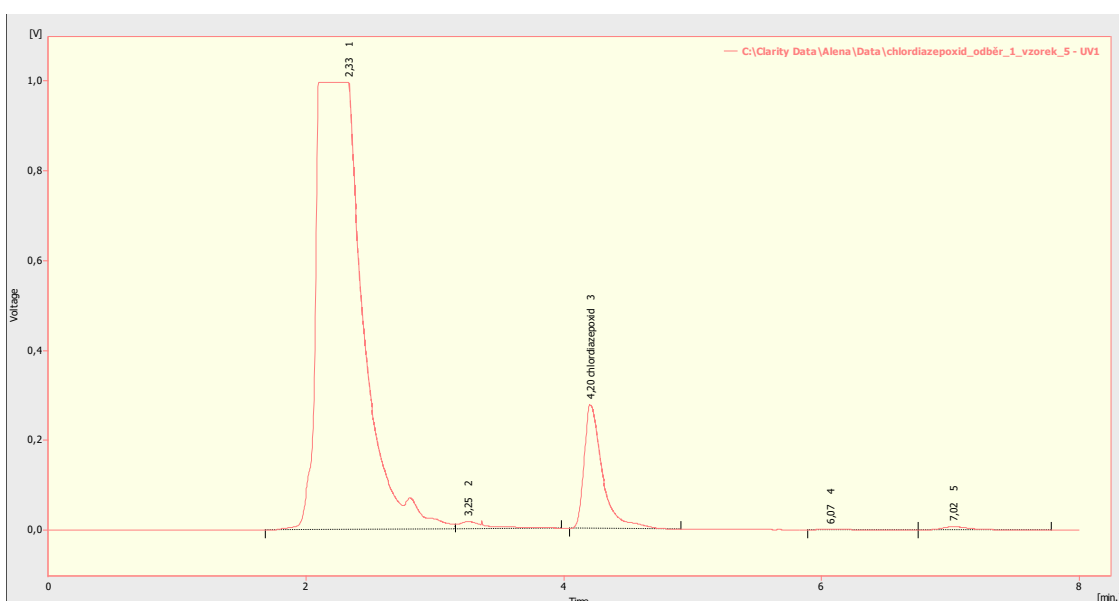
Obrázek č. 14: Pokles koncentrace chlordiazepoxidu v kultivačním médiu. Na ose x se nachází veličina času, *Den odběru* (1 den = 0 hodin, 2 dny = 24 hodin, 3 dny = 48 hodin, 4 dny = 72 hodin). Na ose y se nachází koncentrace chlordiazepoxidu vyjádřená jako procento koncentrace výchozí.

Z grafu výše je patrné, že fytoextrakce chlordiazepoxidu měla vcelku lineární průběh. V prvním dnu byl zaznamenán pokles 23 %, v dalším 14 % a v posledním 19 % vůči koncentracím z předchozího dne. Lze tedy předpokládat, že kdyby experiment nemusel být kvůli kontaminacím v kultivačních médiích ukončen, koncentrace chlordiazepoxidu v médiu by klesala i nadále. Celkově byl pokles koncentrace během 72 hodin 56 %. Největší pokles koncentrace chlordiazepoxidu v médiu byl pozorován první den, což může být vysvětleno například tím, že docházelo k další sorpci léčiva na kořenový systém kukuřice. Dalším vysvětlením by mohla být difuze do kořenového systému rostliny řízená koncentračním spádem. V neposlední řadě je nutné brát v potaz i to, že zkoumaná látka může být pro rostlinu toxická, čímž dojde ke zpomalení

či zastavení růstových a tím i fytoextrakčních procesů v dalších dnech v důsledku abiotického stresu.

Během 72 hodin bylo extrahováno cca 3,0 mg chlordiazepoxidu, fytoextrakční účinnost kukuřice seté tedy byla stanovena na 0,02 mg chlordiazepoxidu na gram rostlinné biomasy za 24 hodin (při výchozí koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

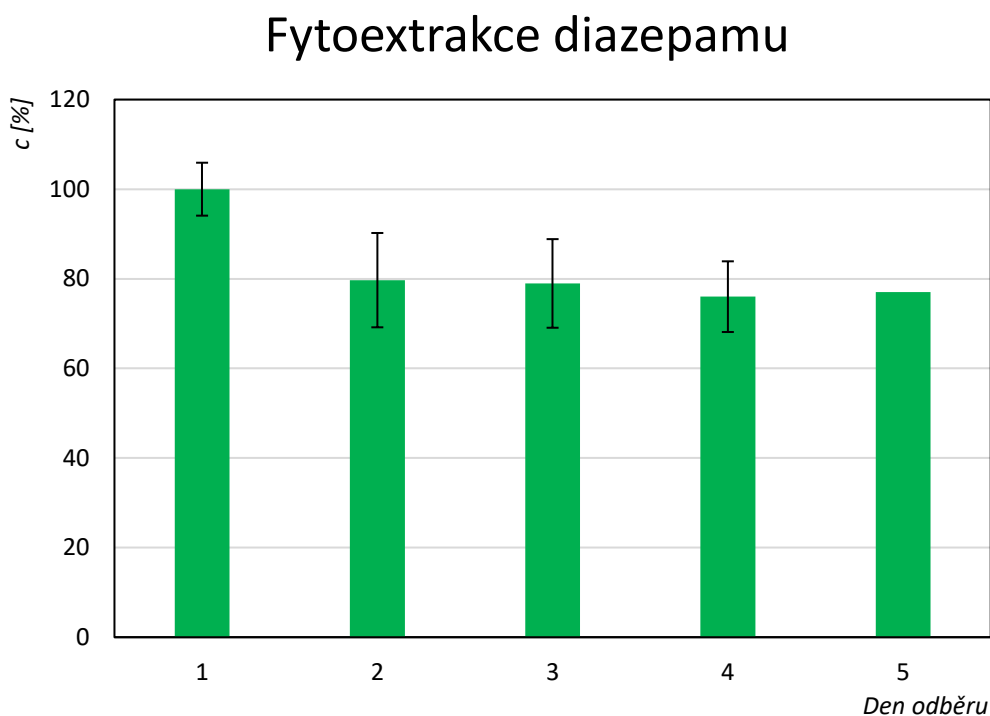
Na obrázku číslo 15 je příklad chromatogramu kultivačního média obohaceného chlordiazepoxidem.



Obrázek č. 15: Příklad chromatogramu kultivačního média z analýzy na HPLC s UV detekcí při 235 nm. Pík eluující kolem 4. minuty je chlordiazepoxid o koncentraci  $9,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kolem 2. minuty eluují složky kultivačního média.

## 5.2 Diazepam

Pokles koncentrace diazepamu v kultivačním médiu je vyjádřen v grafu na obrázku číslo 16.



Obrázek č. 16: Pokles koncentrace diazepamu v kultivačním médiu. Na ose x se nachází veličina času, *Den odběru* (1 den = 0 hodin, 2 dny = 24 hodin, 3 dny = 48 hodin, 4 dny = 72 hodin, 5 dnů = 144 hodin; o víkendu nebyly vzorky odebírány; 5. den byl odebrán jen jeden vzorek, ostatní média v kultivačních baňkách již byla kontaminována, proto pátý sloupec neobsahuje chybovou úsečku. Na ose y se nachází koncentrace diazepamu vyjádřená jako procento koncentrace výchozí.

Stejně jako tomu bylo u chlordiazepoxidu, u diazepamu byl nejmarkantnější pokles koncentrace léčiva v médiu zaznamenán hned v prvním dnu. Koncentrace v kultivačních médiích poklesla o 20 % oproti koncentraci výchozí. Další dny

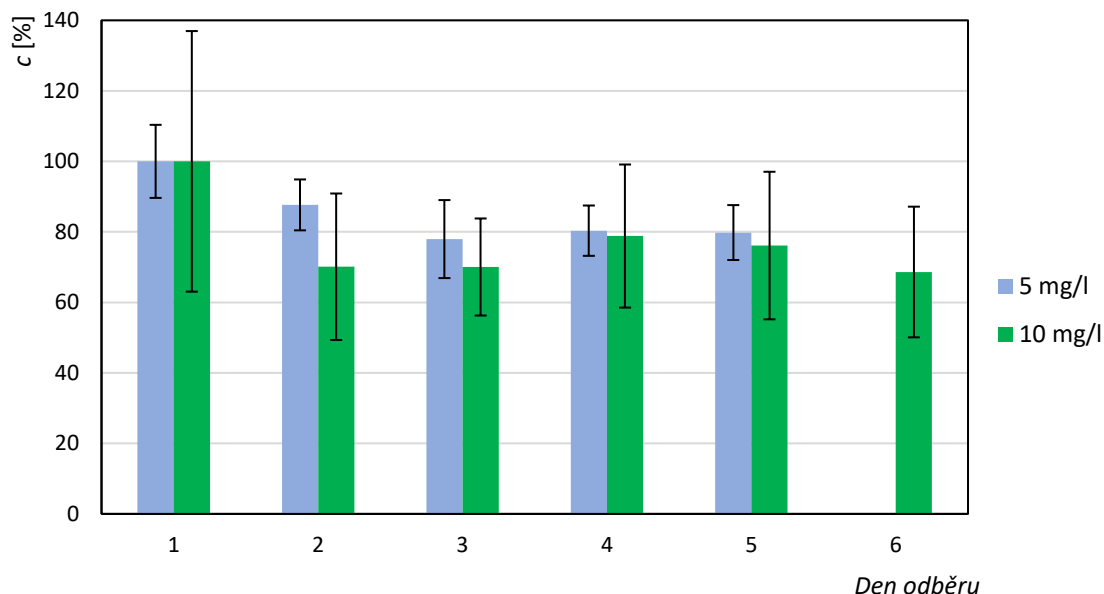
koncentrace léčiva klesala už jen minimálně, a to o 1 % během druhého dne a o 3 % během dne třetího. V posledním dnu koncentrace léčiva v médiu naopak o 1 % vzrostla. Nárůst koncentrace v posledním odběru je nevýrazný a průběh svědčí o poměrně časném zastavení fytoextrakčního procesu. Celkový pokles v kultivačním médiu během 4 dnů byl 24 %.

Během 72 hodin bylo extrahováno cca 1,2 mg diazepam, fytoextrakční účinnost kukuřice seté tedy byla stanovena na 0,006 mg diazepam na gram rostlinné biomasy za 24 hodin (při výchozí koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

### **5.3 Alprazolam**

Pokles koncentrace alprazolamu byl zkoumán na dvou koncentračních hladinách, jednalo se o teoretické výchozí koncentrace 5 a  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Výsledky fytoextrakce pro obě koncentrační hladiny jsou součástí grafu na obrázku číslo 17.

## Fytoextrakce alprazolamu



Obrázek č. 17: Pokles koncentrace alprazolamu v kultivačním médiu. Na ose x se nachází veličina času, *Den odběru* (1 den = 0 hodin, 2 dny = 24 hodin, 3 dny = 48 hodin, 4 dny = 72 hodin, 5 dní = 96 hodin, 6 dní = 168 hodin; o víkendu nebyly vzorky odebrány). Na ose y se nachází koncentrace alprazolamu vyjádřená jako procento koncentrace výchozí.

Z grafu vyjadřující pokles koncentrace alprazolamu v kultivačním médiu lze vypočítat určité trendy společné pro nižší i vyšší počáteční koncentraci alprazolamu. Nejvyšší pokles byl u obou koncentračních hladin, stejně jako u ostatních zkoumaných benzodiazepinů, v prvním dni. V případě nižší koncentrační hladiny alprazolamu se jednalo o 12 %, v případě vyšší koncentrační hladiny byl pak pokles dokonce 30 %. Z těchto hodnot lze tedy usuzovat, že pokud je výchozí koncentrace léčiva vyšší, zvýší se i fytoextrakční účinnost. To může být logicky vysvětleno již zmíněným difusním jevem. Látka o vyšší koncentraci přechází do nenasyceného prostředí rychleji než látka o koncentraci nižší. Součástí uvedeného jevu může být i prostá adsorpce na povrch kořenů, která je rovněž řízena rozdílem koncentrací.

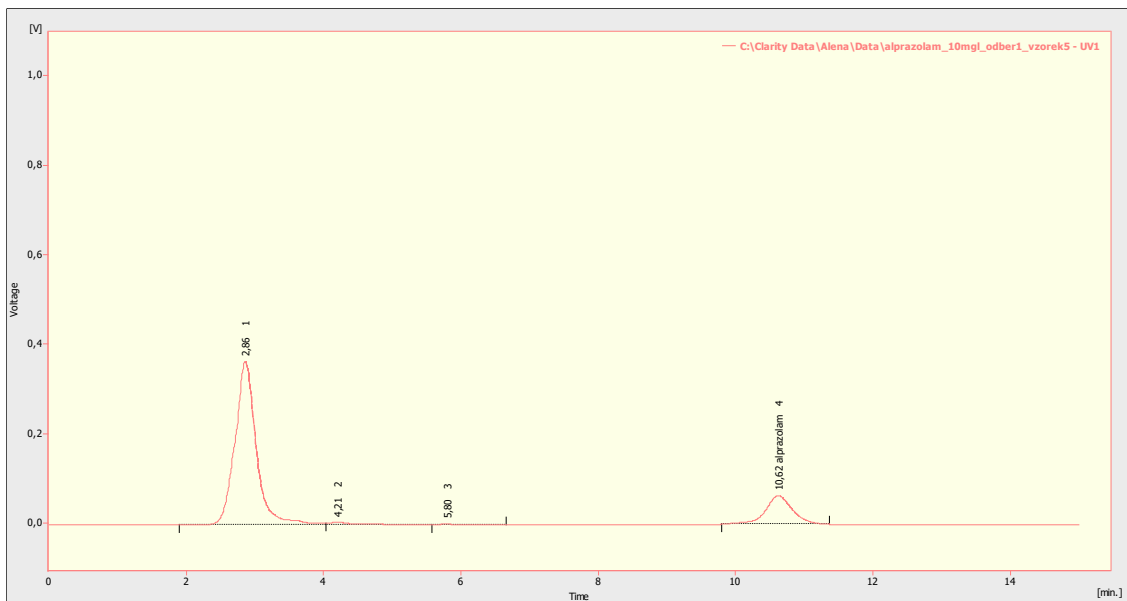
V druhém dni byl pokles pro nižší koncentrační hladinu 10 % vůči předchozímu dni, v dalším dni byl pak zaznamenán vzrůst o 2 % vůči dni předchozímu. Poslední den měření byla koncentrace v kultivačních médiích víceméně stejná jako den předchozí.

U vyšší koncentrační hladiny alprazolamu v médiu byl během druhého dne zaznamenán pokles jen minimální, v dalším dni koncentrace alprazolamu v médiu vzrostla, a to o 9 % oproti dni předchozímu. Během dalších 24 hodin došlo opět k poklesu, a to o 2 %. Během víkendu, tedy po 72 hodinách od předešlého odběru, koncentrace alprazolamu v kultivačním médiu klesla o 8 %.

Při sledování fytoextrakce alprazolamu jsme se setkali s jevem, kdy byl nejprve zaznamenán pokles koncentrace látky v kultivačním médiu, následně ale koncentrace látky v médiu začala stoupat. Příčinou může být okamžitá adsorpce přidané látky na kořenový systém rostliny. Během druhého a třetího dne se pak ustavuje rovnováha mezi tímto adsorbovaným léčivem na kořenovém systému a mezi léčivem rozpuštěným v kultivačním médiu. Dalším vysvětlením může být to, že rostlina začne postupně odumírat a vyplavovat ze svých tkání jak léčivo adsorbované, tak i léčivo absorbované. Vzhledem k tomu, že v posledních dnech došlo k opakovanému poklesu koncentrace látky v médiu, první z uvedených možných příčin se jeví jako logičtější.

Během 72 hodin bylo na vyšší ze dvou zkoumaných koncentračních hladin extrahováno 1,7 mg alprazolamu, fytoextrakční účinnost kukuřice seté tedy byla stanovena na 0,009 mg alprazolamu na gram rostlinné biomasy za 24 hodin (při výchozí koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

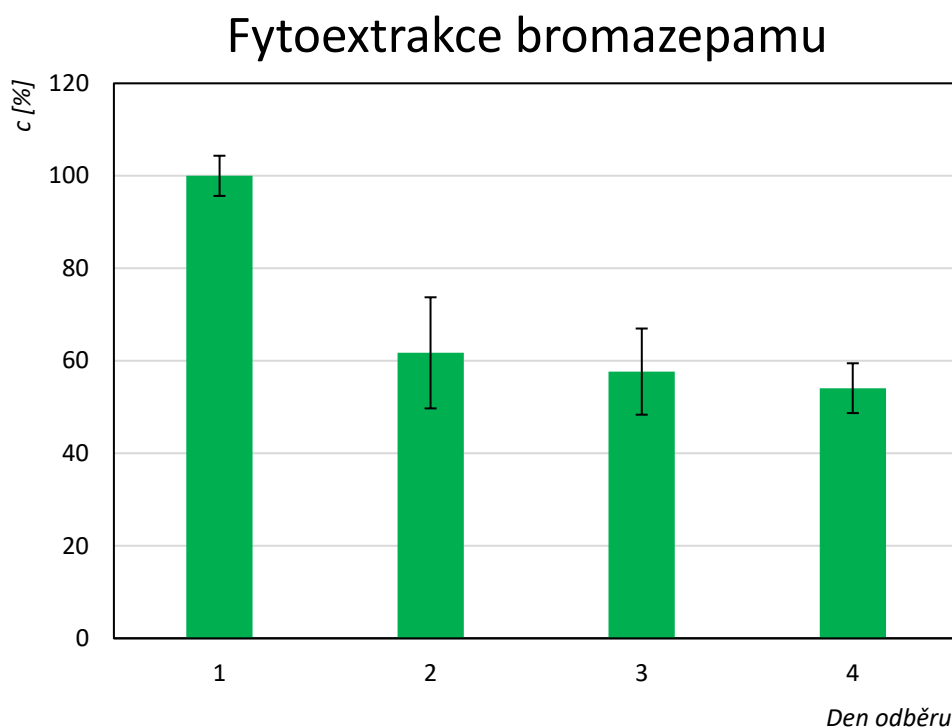
Na obrázku číslo 18 je příklad chromatogramu kultivačního média obohaceného alprazolamem.



Obrázek č. 18: Příklad chromatogramu kultivačního média z analýzy na HPLC s UV detekcí při 254 nm. Pík eluující kolem 10. minuty je alprazolam o koncentraci  $9,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Kolem 2. minuty eluují složky kultivačního média.

## 5.4 Bromazepam

Pokles koncentrace látky bromazepamu v kultivačním médiu je znázorněn v grafu na obrázku číslo 19.



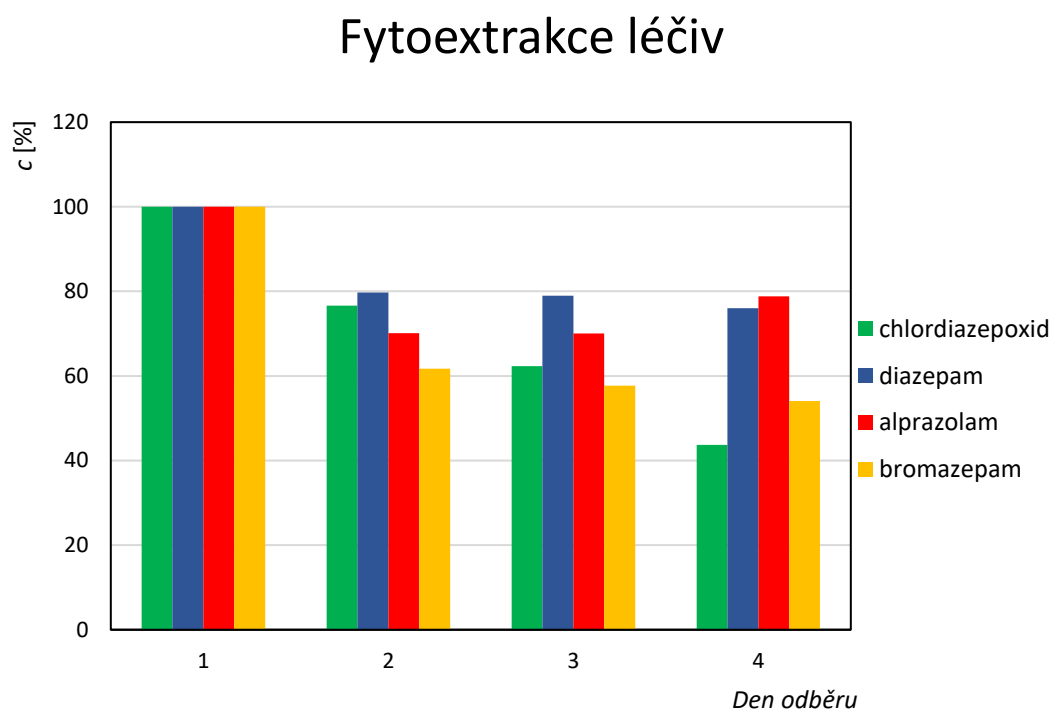
Obrázek č. 19: Pokles koncentrace bromazepamu v kultivačním médiu. Na ose x se nachází veličina času, *Den odběru* (1 den = 0 hodin, 2 dny = 24 hodin, 3 dny = 48 hodin, 4 dny = 72 hodin). Na ose y se nachází koncentrace bromazepamu vyjádřená jako procento koncentrace výchozí.

Z grafu výše vyplývá, že největší pokles koncentrace bromazepamu byl pozorován, tak jako u ostatních zkoumaných benzodiazepinů, během prvních 24 hodin po jeho přidání. Během prvního dne byl tedy pokles koncentrace 38 %, během dalších dnů pak 4 % a necelá 4 % vůči dni předchozímu. Celkový pokles bromazepamu v kultivačním médiu byl 46 %.

Během 72 hodin bylo extrahováno 2,0 mg bromazepamu, fytoextrakční účinnost kukuřice seté tedy byla stanovena na 0,01 mg bromazepamu na gram rostlinné biomasy za 24 hodin (při výchozí koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ).

## 5.5 Porovnání fytoextrakce benzodiazepinů

Porovnání fytoextrakčních účinností všech čtyř vybraných benzodiazepinových anxiolytik je znázorněno v grafu na obrázku číslo 20.

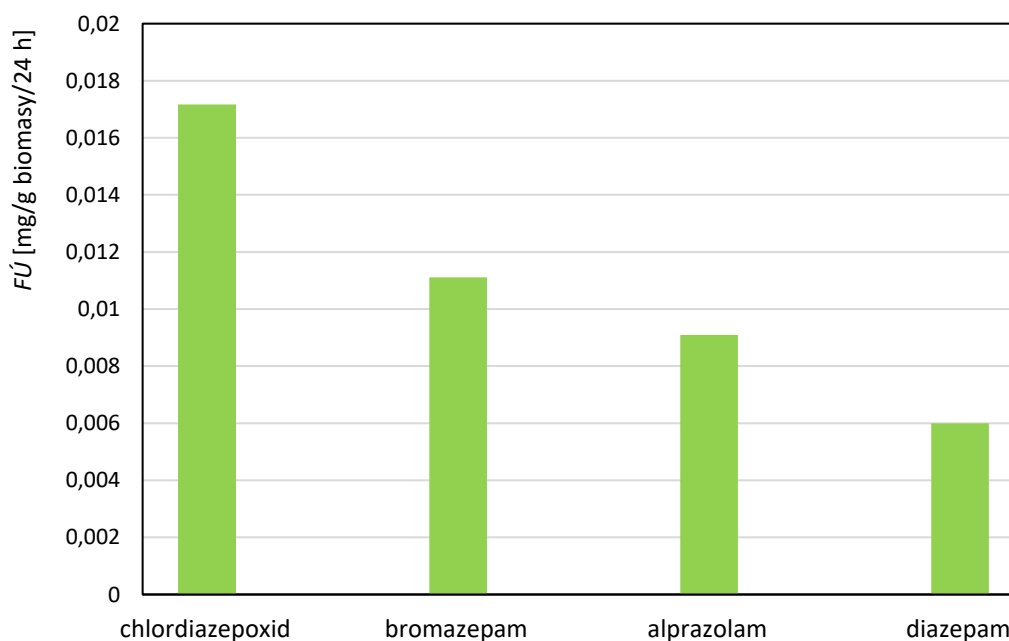


Obrázek č. 20: Pokles koncentrace chlordiazepoxidu, diazepam, alprazolamu a bromazepamu v kultivačních médiích. Na ose x se nachází veličina času, *Den odběru* (1 den = 0 hodin, 2 dny = 24 hodin, 3 dny = 48 hodin, 4 dny = 72 hodin). Na ose y se nachází koncentrace benzodiazepinu vyjádřená jako procento koncentrace výchozí. Pro tento srovnávací graf byly pro alprazolam použity hodnoty z experimentu s výchozí teoretickou koncentrací  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Po 72 hodinách od počátku experimentu byl zaznamenán největší pokles koncentrace v médiu pro látku chlórdiazepoxid. Pokles činil 56 %. Druhým nejvíce fytoextrahovaným benzodiazepinem byl bromazepam s celkovým poklesem 46 %. Následoval diazepam, jehož pokles koncentrace v médiu během 72 hodin byl 24 %. Nejnižší pokles koncentrace po 72 hodinách vykazoval benzodiazepin alprazolam, a to pokles o 21 %.

Vypočítaná fytoextrakční účinnost ukazuje, jaké množství léčiva je rostlina (1 gram čerstvé rostlinné biomasy) schopná extrahovat za 24 hodin. Nejvyšší fytoextrakční účinnost byla zjištěna pro chlórdiazepoxid, následoval bromazepam, dále alprazolam a jako poslední diazepam. Fytoextrakční účinnost je graficky znázorněna na obrázku číslo 21.

## Fytoextrakční účinnost



Obrázek č. 21: Porovnání fytoextrakční účinnosti pro jednotlivé benzodiazepiny.

Přestože je struktura benzodiazepinů (benzodiazepinové jádro) shodná, jejich postranní řetězce se liší. Právě postranní řetězce pak mají vliv na farmakologické a

fyzikálně-chemické vlastnosti benzodiazepinů. Takovou vlastností je například hydrofobicita (vyjádřena jako  $\log K_{ow}$ ), jež má mít velký vliv na záchyt a akumulaci neiontových látek rostlinami<sup>69</sup>. V literatuře se uvádí, že nejlépe se fytoextrahují látky s hodnotou  $\log K_{ow}$  kolem 2<sup>62,69,70</sup>. Lze předpokládat, že lipofilní látky se koncentrují na kořenových lipidech, polární látky pak mohou být translokovány do nadzemních částí rostlin. Pokud je látka ionizovaná, nabízí se procesy jako iontový záchyt nebo elektrostatické interakce s buněčnými membránami rostliny. V literatuře se často diskutuje souvislost mezi fytoextrakční účinností a fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiva. Fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných benzodiazepinů jsou uvedeny v tabulce číslo 9.

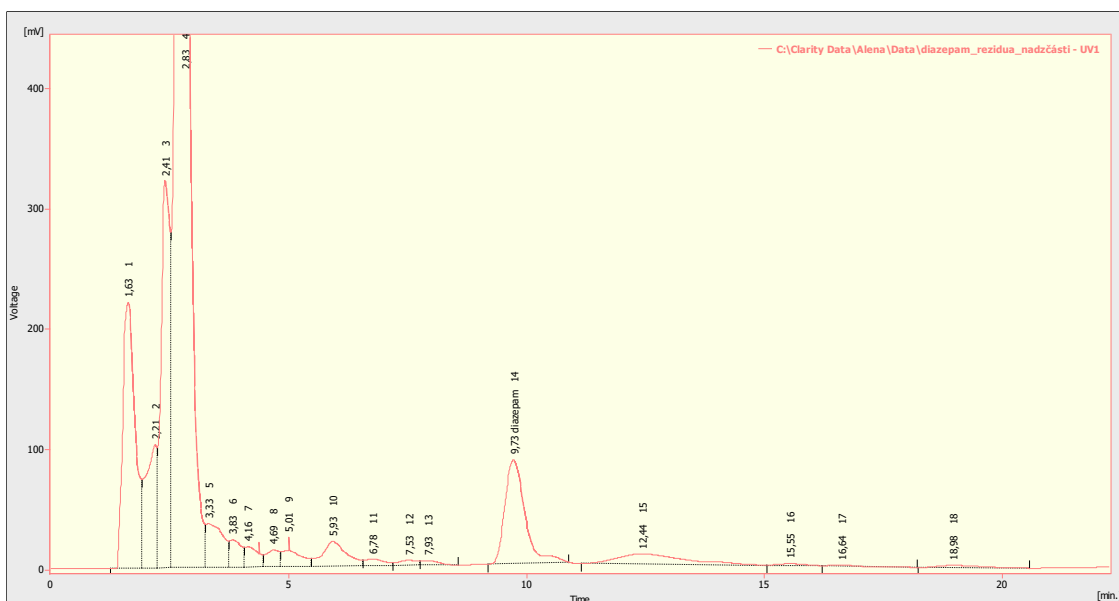
Tabulka č. 9: Vybrané benzodiazepiny a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti.

Látka	Pořadí fytoextrakční účinnosti	$M_w$ [g · mol <sup>-1</sup> ]	Substituent	$\log K_{ow}$	pKa
chlordiazepoxid	1	299,8	-Cl, -NHCH <sub>3</sub> , -NO, -H	2,44	4,8
bromazepam	2	316,2	-Br, -NH, =O, -H	2,05	2,7
alprazolam	3	308,8	-Cl, triazol, -H	2,12	2,4
diazepam	4	284,7	-Cl, -CH <sub>3</sub> , =O, -H	2,88	3,4

Nezdá se, že by v tomto případě existovala přímá souvislost fytoextrakční účinnosti s hodnotami  $\log K_{ow}$ . Určitá tendence se jeví v případě porovnání hodnot pKa, i když ani ta plně neodpovídá získaným experimentálním výsledkům. Zkoumaný děj je zřejmě superpozicí uvedených a dalších faktorů především struktury extrahovaného benzodiazepinu. Významnou roli nejspíše hraje kromě sterických a elektronických faktorů souvisejících se strukturou zkoumané látky i stupeň ionizace v závislosti na hodnotách pH média, které se může během kultivace odchýlit od primárně nastaveného vlivem změn složení a exkrece rostlinných exsudátů.

## 5.6 Analýza extrahovatelných reziduí

Analýza extrahovatelných reziduí byla provedena z řad kultivací po ukončení fytoextrakčního experimentu. Hmotnost extrahovatelných reziduí byla sledována zvlášť v kořenových a zvlášť v nadzemních částech rostlin. Na obrázku číslo 22 je ukázka chromatogramu z analýzy extrahovatelných reziduí diazepamu v nadzemních částech kukuřice seté.



Obrázek č. 22: Analýza extrahovatelných reziduí diazepamu v nadzemních částech rostliny. Pík elující kolem 10. minuty je pík diazepamu o koncentraci  $9,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Postup získání výsledku hmotnosti extrahovatelných reziduí na hmotnost biomasy pro každý zkoumaný benzodiazepin je uveden v tabulce číslo 10.

Tabulka č. 10: Výpočet hmotnosti extrahovatelných reziduí na hmotnost biomasy (části rostliny uvedeny zkratkami jako K – kořeny, NČ – nadzemní části).

léčivo a rostlinná část uvedena indexem	celková hmotnost rostlinných částí [g]	koncentrace ve 2 ml vzorku [ $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	hmotnost léčiva ve vzorku [mg]	hmotnost léčiva na gram biomasy [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	translokační faktor ( <i>TF</i> )
chlordiazepoxid <sup>K</sup>	45,2	13,7	0,03	$6 \cdot 10^{-4}$	1,1
chlordiazepoxid <sup>NČ</sup>	12,4	4,3	0,01	$7 \cdot 10^{-4}$	
diazepam <sup>K</sup>	45,0	44,4	0,09	$2 \cdot 10^{-3}$	0,5
diazepam <sup>NČ</sup>	19,6	9,3	0,02	$9 \cdot 10^{-4}$	
alprazolam <sup>K</sup>	46,2	57,4	0,11	$2 \cdot 10^{-3}$	0,6
alprazolam <sup>NČ</sup>	17,5	12,3	0,02	$1 \cdot 10^{-3}$	
bromazepam <sup>K</sup>	44,3	105,9	0,21	$5 \cdot 10^{-3}$	0,9
bromazepam <sup>NČ</sup>	14,6	30,9	0,06	$4 \cdot 10^{-3}$	

Translokační faktor (*TF*) byl vypočítán jako podíl hmotnosti léčiva na gram biomasy nadzemních částí a hmotnosti léčiva na gram biomasy kořenových částí rostlin. Pokud je tedy hodnota větší než jedna, znamená to, že se léčivo ve větší míře translokuje do nadzemních částí rostliny. Translokační faktor lze tedy brát jako ukazatel toho, v jaké míře dochází v případě konkrétní látky a rostliny ke kontaminaci potravních řetězců živočichů.

Závěrem je nutné dodat, že práce s rostlinami, stejně jako s ostatními biologickými materiály, může být mnohdy komplikovaná a rostliny mohou vykazovat v rámci biodiverzity zcela odlišné chování. Naším výsledkem je tedy průměrná hodnota z řady šesti vzorových kultivací. Sterilně kultivované rostliny jsou velice náchylné ke kontaminacím, úhyn rostliny jejich vlivem či vlivem léčiva lze ale často vypožorovat až zpětně, což také výrazně stěžuje provádění a vyhodnocování experimentů.

## 6 Závěr

Se zvyšujícími se nároky na kvalitu života stoupá i konzumace léčiv, které se pak vinou jejich nadužívání či nevhodnou likvidací dostávají do přírody a negativně ji ovlivňují. Benzodiazepiny a jejich aktivní metabolity byly nalezeny ve vodách různých částí světa a byl prokázán jejich negativní vliv na vodní organismy včetně bioakumulace v jejich tkáních.

Tato diplomová práce byla vypracována za účelem porovnat míru fytoextrakce, fytoextrakční účinnost a míru translokace v rostlině pro čtyři benzodiazepiny – chlordiazepoxid, diazepam, alprazolam a bromazepam. Pokles koncentrace v kultivačním médiu byl měřen pomocí HPLC s UV detekcí. Největší pokles koncentrace během 72 hodin byl zaznamenán pro chlordiazepoxid (56 %), následoval bromazepam (46 %), diazepam (24 %) a alprazolam (21 %). Vypočítaná fytoextrakční účinnost pak byla nejvyšší pro chlordiazepoxid (0,02 mg/g biomasy/24 h), následoval bromazepam (0,01 mg/g biomasy/24 h), alprazolam (0,009 mg/g biomasy/24 h) a diazepam (0,006 mg/g biomasy/24 h). Analýza extrahovatelných reziduí potvrdila translokaci všech zkoumaných benzodiazepinů do nadzemních částí rostlin, prostřednictvím jejichž konzumace rezidua léčiv kontaminují potravní řetězce živočichů.

Fytoextrakce benzodiazepinů chlordiazepoxidu a bromazepamu se ukázala jako reálná, nutno ale podotknout, že se jednalo o modelové experimenty, při nichž jsme kvůli vyhodnocovacím metodám byli nuceni použít koncentrace benzodiazepinů mnohonásobně vyšší, než jsou jejich naměřené koncentrace v přírodě. Účinnost fytoextrakce v reálném prostředí zahrnujícím navíc multikomponentní matrice se tak může od námi uvedených výsledků lišit.

V následujících experimentech by bylo záhodno sledovat metabolické přeměny benzodiazepinů v rostlině, a kromě parentního benzodiazepinu identifikovat v rostlinné tkáni i jeho metabolity. Prostup léčiva rostlinou lze taktéž zkoumat na látkách obsahujících radioaktivní značky.

## Použitá literatura

1. Vestel, J. *et al.*: Use of acute and chronic ecotoxicity data in environmental risk assessment of pharmaceuticals: Ecotoxicity data and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**, 1201–1212 (2016).
2. Kostopoulou, M.; Nikolaou, A.: Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**, 1023–1035 (2008).
3. Bártíková, H.; Podlipná, R.; Skálová, L.: Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* **144**, 2290–2301 (2016).
4. Hamscher, G.; Bachour, G.: Veterinary Drugs in the Environment: Current Knowledge and Challenges for the Future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 751–752 (2018).
5. Daughton, C. G.; Jones-Lepp, T. L.: *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues*. (American Chemical Society, 2001).
6. Heberer, T.: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters* **131**, 5–17 (2002).
7. Kümmerer, K.: The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* **90**, 2354–2366 (2009).

8. Halling-Sørensen, B. *et al.*: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* **36**, 357–393 (1998).
9. Vidali, M.: Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* **73**, 1163–1172 (2001).
10. Cunningham, S. D.; Shann, J. R.; Crowley, D. E.; Anderson, T. A.: *Phytoremediation of contaminated water and soil*. (ACS Publications, 1997).
11. Jeevanantham, S. *et al.*: Removal of toxic pollutants from water environment by phytoremediation: A survey on application and future prospects. *Environmental Technology & Innovation* **13**, 264–276 (2019).
12. Meagher, R. B.: Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current opinion in plant biology* **3**, 153–162 (2000).
13. Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Schwab, A. P.; Hsu, F. S.: Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants. *Advances in Agronomy* **56**, 55–114 (1996).
14. Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C.: Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18**, 647–658 (2002).
15. Favas, P. J. C.; Pratas, J.; Varun, M.; D'Souza, R.; Paul, M. S.: *Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora*. (InTech, 2014).
16. Vaněk, T.; Soudek, P.; Podlipná, R.; Petrová, Š.; Landa, P.: *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. (Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., 2017).

17. Soudek, P.; Petrová, Š.; Benešová; D., Kotyza, J.; Vaněk, T.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy* **102**, 346–352 (2008).
18. Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M. A.: Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* **91**, 869–881 (2013).
19. Dushenkov, V.; Kumar, P. N.; Motto, H.; Raskin, I.: Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental science & technology* **29**, 1239–1245 (1995).
20. Tangahu, B. V. *et al.*: A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering* **2011**, 1–31 (2011).
21. Limmer, M.; Burken, J.: Phytovolatilization of Organic Contaminants. *Environmental Science & Technology* **50**, 6632–6643 (2016).
22. Wuana, R. A.; Okieimen, F. E.: Phytoremediation potential of maize (*Zea mays* L.). A review. *African Journal of General Agriculture* **6**, 275–287 (2010).
23. Mojiri, A.: The potential of corn (*Zea mays*) for phytoremediation of soil contaminated with cadmium and lead. *Journal of Biological and Environmental Sciences* **5**, 17–22 (2011).
24. Košnář, Z.; Mercl, F.; Tlustoš, P.: Ability of natural attenuation and phytoremediation using maize (*Zea mays* L.) to decrease soil contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from biomass fly ash in comparison with PAHs–spiked soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **153**, 16–22 (2018).

25. Gheju, M.; Stelescu, I.: Chelant-assisted phytoextraction and accumulation of Zn by *Zea mays*. *Journal of Environmental Management* **128**, 631–636 (2013).
26. Cameselle, C.; Gouveia, S.: Phytoremediation of mixed contaminated soil enhanced with electric current. *Journal of Hazardous Materials* **361**, 95–102 (2019).
27. Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*. **3. vyd.** (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015).
28. Švihovec J. *et al.*: *Farmakologie*. (Grada Publishing, 2018).
29. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Pharmakologie und Toxikologie*. **14. vyd.** (Grada Publishing, 1999).
30. Katzung, B. G.: *Basic & Clinical Pharmacology*. **8. vyd.** (Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001).
31. Sigel, E.; Ernst, M.: The Benzodiazepine Binding Sites of GABA A Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **39**, 659–671 (2018).
32. Altamura, A. C. *et al.*: Understanding the pharmacokinetics of anxiolytic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **9**, 423–440 (2013).
33. Sobolesky, P. M.; Smith, B. E.; Pesce, A. J.; Fitzgerald, R. L.: Interpretation of Pain Management Testing Results Using Case Examples. *The Journal of Applied Laboratory Medicine: An AACC Publication* **2**, 610–621 (2018).
34. Lincová, D.; Farghali, H. *et al.*: *Základní a aplikovaná farmakologie*. **2. vyd.** (Galén, 2007).

35. López-Muñoz; F., Álamo, C.; García-García, P.: The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: Half a century of anxiolytic drugs. *Journal of Anxiety Disorders* **25**, 554–562 (2011).
36. Miller, R. L.: *The Encyclopedia of Addictive Drugs*. (Greenwood, 2002).
37. Chlordiazepoxide Side Effects in Detail. *Drugs.com* Dostupné z URL: <<https://www.drugs.com/sfx/chlordiazepoxide-side-effects.html>> [cit. 28.2.2019].
38. Greenblatt, D. J.; Shader, R. I.; Divoll, M.; Harmatz, J. S.: Benzodiazepines: a summary of pharmacokinetic properties. *British journal of clinical pharmacology* **11**, 11–16 (1981).
39. Calcaterra, N. E.; Barrow, J. C.: Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium). *ACS Chemical Neuroscience* **5**, 253–260 (2014).
40. Fadul, J. A.: *Encyclopedia of Theory & Practice in Psychotherapy & Counseling*. (Lulu.com, 2014).
41. Pagliaro, L. A.; Pagliaro, A. M.: *Psychologists' Psychotropic Drug Reference*. (Psychology Press, 1999).
42. Schüttler, J.; Schwilden, H.: *Modern Anesthetics*. (Springer Science & Business Media, 2008).
43. Grohol, J. M. Top 25 Psychiatric Medication Prescriptions for 2013. *Psych Central*. Dostupné z URL: <<https://psychcentral.com/lib/top-25-psychiatric-medication-prescriptions-for-2013/>> [cit. 2.3.2019].

44. Lindsley, C. W.: The Top Prescription Drugs of 2011 in the United States: Antipsychotics and Antidepressants Once Again Lead CNS Therapeutics. *ACS Chemical Neuroscience* **3**, 630–631 (2012).
45. Ait-Daoud, N.; Hamby, A. S.; Sharma, S.; Blevins, D.: A Review of Alprazolam Use, Misuse, and Withdrawal. *Journal of addiction medicine* **12**, 4–10 (2018).
46. Verster, J. C.; Volkerts, E. R.: Clinical pharmacology, clinical efficacy, and behavioral toxicity of alprazolam: a review of the literature. *CNS Drug Reviews* **10**, 45–76 (2004).
47. Xanax (Alprazolam): Side Effects, Interactions, Warning, Dosage & Uses. *RxList*. Dostupné z URL: <<https://www.rxlist.com/xanax-drug.htm>> [cit. 2.3.2019].
48. Lexaurin, Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0132676&tab=texts>> [cit. 11.3.2019].
49. Ochs, H. R. *et al.*: Bromazepam pharmacokinetics: Influence of age, gender, oral contraceptives, cimetidine, and propranolol. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **41**, 562–570 (1987).
50. Ternes, T.; Bonerz, M.; Schmidt, T.: Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **938**, 175–185 (2001).
51. van der Ven, K. *et al.*: Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **57**, 967–973 (2004).

52. Fick, J. *et al.*: Screening of benzodiazepines in thirty European rivers. *Chemosphere* **176**, 324–332 (2017).
53. Kosjek, T. *et al.*: Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Research* **46**, 355–368 (2012).
54. Xiang, J. *et al.*: The fate and risk assessment of psychiatric pharmaceuticals from psychiatric hospital effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **150**, 289–296 (2018).
55. Mendoza, A. *et al.*: Occurrence of drugs of abuse and benzodiazepines in river waters from the Madrid Region (Central Spain). *Chemosphere* **95**, 247–255 (2014).
56. Moreno-González, R.; Rodríguez-Mozaz, S.; Gros, M.; Barceló, D.; León, V. M.: Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environmental Research* **138**, 326–344 (2015).
57. Calisto, V.; Domingues, M. R. M.; Esteves, V. I.: Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Research* **45**, 6097–6106 (2011).
58. Álvarez-Muñoz, D. *et al.*: Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environmental Research* **143**, 56–64 (2015).
59. Brodin, T.; Fick, J.; Jonsson, M.; Klaminder, J.: Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* **339**, 814–815 (2013).

60. Abreu, M. S. *et al.*: Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. *PLOS ONE* **9**, 1–5 (2014).
61. Nunes, B.; Carvalho, F.; Guilhermino, L.: Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**, 413–419 (2005).
62. Carter, L. J.; Williams, M.; Martin, S.; Kamaludeen, S. P. B.; Kookana, R. S.: Sorption, plant uptake and metabolism of benzodiazepines. *Science of The Total Environment* **628–629**, 18–25 (2018).
63. Dudley, S.; Sun, C.; McGinnis, M.; Trumble, J.; Gan, J.: Formation of biologically active benzodiazepine metabolites in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and vegetable plants under hydroponic conditions. *Science of The Total Environment* **662**, 622–630 (2019).
64. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/>> [cit. 25.3.2019].
65. Spotřeba psychofarmak za 25 let vzrostla šestinásobně. ‚V pořádku, jen pozor na starší léky,‘ říká psychiatr. *iROZHLAS*. Dostupné z URL: <[https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/psychiatr-uzkost-deprese-antidepresiva-spotreba-leciv-martin-anders\\_1811080630\\_jab](https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/psychiatr-uzkost-deprese-antidepresiva-spotreba-leciv-martin-anders_1811080630_jab)> [cit. 25.3.2019].
66. Suchopár, J.; Prokeš, M.; Suchopár, O.: Spotřeba antidepresiv v České republice ve srovnání s ostatními vyspělými zeměmi. *Remedia* **26**, 560–566 (2016).
67. Přehled benzodiazepinů. Dostupné z URL: <<http://www.benzo.cz/clanky/prehled-benzodiazepinu.html>> [cit. 11.3.2019].

68. Murashige, T.; Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497 (1962).
69. Carter, L. J. *et al.*: Fate and uptake of pharmaceuticals in soil–plant systems. *Journal of agricultural and food chemistry* **62**, 816–825 (2014).
70. Miller, E. L.; Nason, S. L.; Karthikeyan, K. G.; Pedersen, J. A.: Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. *Environmental Science & Technology* **50**, 525–541 (2016).