

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Markéta Konečná

FYTOEXTRAKCE BROMAZEPAMU

Phytoextraction of Bromazepam

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2016

## **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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2016.

.....

## **Poděkování**

V úvodu své práce bych velmi ráda poděkovala Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odborné vedení, poskytnuté konzultace a připomínky k bakalářské práci. Dále bych ráda poděkovala Ing. Šárce Pšondrové, která se také podílela na přípravách a vedení této práce. Poděkování patří také mé rodině, která mě při studiu podporovala.

## Abstrakt

Cílem této bakalářské práce bylo zjištění možnosti fytoextrakce benzodiazepinu bromazepamu, jako široce využívaného léčiva s anxiolytickými účinky. Benzodiazepiny jsou látky s vysokou biologickou aktivitou a jsou spolu se svými metabolity vylučovány močí. Dostávají se tak do komunálních odpadních vod, přičemž stupeň odstranění v čistírnách odpadních vod nebývá vysoký a látky se tak dostávají do povrchových vod. Následně potom kontaminují celý ekosystém včetně potravních řetězců. Při dlouhodobém působení stopových koncentrací dochází k výraznému vlivu na vodní i suchozemské organismy.

V práci byla studována fytoextrakce bromazepamu v *in vitro* kulturách kukuřice seté (*Zea mays*). Kultivační medium dle Murashiga a Skooga bylo obohaceno o bromazepam o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a byly prováděny odběry media ve 24 hodinových intervalech. Media byla potom analyzována pomocí HPLC/UV na reverzní fázi při 233 nm. Byl tak získán časový průběh koncentrací bromazepamu v mediu, který ukázal pokles koncentrace ca. 40 % během 168 hodin kultivace. Jednoznačně byla prokázána schopnost použitého kultivaru kukuřice zachycovat bromazepam z vodných roztoků. Množství extrahovaného bromazepamu odpovídá 0,03 miligramů na 1 gram čerstvé hmotnosti rostliny. I když testované koncentrace xenobiotika jsou podstatně vyšší než skutečné environmentální, experimenty dokazují reálnou možnost technologického využití. Kromě tohoto faktu, uvedený výsledek dokazuje i možnost kontaminace potravních řetězců a práce je tak zároveň příspěvkem k hodnocení bezpečnosti potravin.

Klíčová slova: fytoextrakce, odpadní voda, znečištění, benzodiazepiny, bromazepam, HPLC

## Abstract

The aim of this bachelor thesis was to determine the possibility of phytoextraction of benzodiazepine bromazepam as a widely used drug with anxiolytic effects. Benzodiazepines are compounds with high biological activity and together with their metabolites are excreted into urine. These substances then get into municipal wastewater treatment plant, whereas efficiency of removal in wastewater treatment plants is not high and compounds enter into surface water. Afterwards, the entire ecosystem including food chains is contaminated. A long-term exposure to trace concentrations can have a great effect on aquatic and terrestrial organisms.

Maize (*Zea mays*) was used to study the phytoextraction. The Murashige and Skoog medium was enriched by  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  bromazepam and samples of medium were taken at 24 hour intervals. After that, samples were analysed in reverse phase at 233 nm by HPLC/UV. Time dependence of bromazepam concentrations in medium was evaluated, which showed decrease of ca. 40 % during 168 hours of cultivation. Ability of corn cultivar to extract bromazepam from aqueous solutions was clearly demonstrated. The amount of extracted bromazepam corresponds to 0.03 milligrams per 1 gram of plant fresh weight. Although the tested concentrations of the xenobiotic used are substantially higher than the actual environmental concentrations, experiments demonstrate a real possibility of a technological use. Except this result, the investigation shows the possibility of contamination of the food chain and this thesis is thus a contribution to food safety assessment.

Key words: phytoextraction, wastewater, pollution, benzodiazepine, bromazepam, HPLC

# Obsah

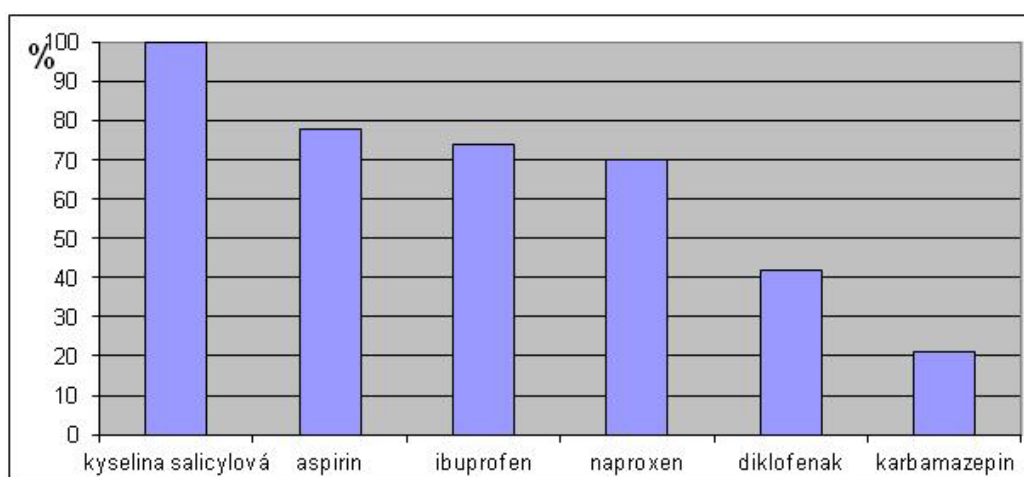
Poděkování.....	3
Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk.....	7
1 Úvod.....	8
2 Cíl práce .....	10
2.1 Teoretická část.....	11
2.1.1 Fytoremediace .....	11
2.2 Rozdělení fytoremediačních technik .....	12
2.2.1 Fytodegradace .....	12
2.2.2 Fytostabilizace .....	12
2.2.3 Rhizofiltrace .....	13
2.2.4 Fytovolatilizace .....	13
2.2.5 Fytoextrakce.....	13
2.2.6 Výhody a nevýhody fytoremediace.....	14
2.3 Anxiolytika.....	15
2.3.1 Benzodiazepiny .....	15
2.3.1.1 Alprazolam.....	17
2.3.1.2 Diazepam .....	17
2.3.1.3 Bromazepam .....	18
3 Experimentální část .....	19
3.1 Přístroje .....	19
3.2 Chemikálie .....	19
3.3 Rostlinný materiál .....	20
3.4 Postup.....	20
3.4.1 Kultivace sterilních rostlin.....	20
3.4.2 Odběr vzorků k analýze.....	21
3.4.3 HPLC analýza .....	21
4 Výsledky a diskuze .....	22
4.1 HPLC analýza bromazepamu v kultivačním mediu .....	22
4.2 Studium fytoextrakce bromazepamu.....	23
5 Závěr .....	27
6 Zdroje .....	28

## Seznam zkratek

ČOV	čistírna odpadních vod
KČOV	kořenová čistírna odpadních vod
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
MTBE	<i>terc</i> -butyl(methyl)ether
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
CNS	centrální nervová soustava
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
MS medium	medium podle Murashiga a Skooga
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti



Jak již bylo zmíněno, množství farmak, jež se vyskytuje v povrchových vodách je velké, což je zřejmé i z počtu používaných preparátů a jejich spotřeby. Ve vodě se obvykle stanovují látky ze skupiny nesteroidních protizánětlivých látek, analgetik-antipyretik (paracetamol, ibuprofen, diklofenak) a vyskytují se zde i některá antidepresiva. V odpadních vodách nemocnic se často také nachází radiodiagnostická kontrastní činidla (iomeprol, ioprogen). Koncentrace těchto čidel jsou však téměř zanedbatelné, většinou v řádu nanogramů ( $10^{-9}$  g) až mikrogramů ( $10^{-6}$  g) v litru. Bohužel však i přes tyto stopové koncentrace mohou při dlouhodobém působení vykazovat negativní vlivy na vyšší organismy. Obvyklé účinnosti odstranění nejčastěji sledovaných farmak ukazuje obrázek 2. [3]



Obr. 2: Účinnost odstranění farmak na ČOV z komunálních odpadních vod [3]

Mezi hlavní děje, díky kterým dochází k odstranění léčiv ze životního prostředí, řadíme například fotodegradaci, biodegradaci, sorpci, membránové procesy či využití aktivního uhlí. Jako další proces pro snížení průniku těchto látek do ekosystému se využívá kořenových čistíren odpadních vod (KČOV). Tyto čistírny fungují na principu rhizofiltrace, kdy dochází k precipitaci znečištěné látky na kořenech či k vstřebání přímo v kořenovém systému. V této době se KČOV řadí mezi technologie, které dosahují mimořádných výsledků u likvidace organického znečištění a nerozpuštěných látek. [1-3]

## 2 Cíl práce

Výskyt reziduí farmak v životním prostředí představuje atraktivní problematiku především z hlediska možného vlivu na vodní i suchozemské organismy. Současně jsou studovány i otázky bezpečnosti potravin, neboť záchyt těchto kontaminantů může způsobit alterace metabolismu a chování i u lidské populace.

V současné době jsme svědky dramatického nárůstu spotřeby psychoaktivních léčiv, která sice představují pro pacienty značnou úlevu, na druhé straně se však jedná o látky s obrovskou biologickou aktivitou, která při kontaminaci ekosystému a potravních řetězců může způsobit dalekosáhlé následky.

Z látek ovlivňujících psychiku jsou nejčastěji používána antidepresiva a anxiolytika. Anxiolytika představují mírnější a dostupnější léčiva, navíc oproti antidepresivům s okamžitým účinkem jejich spotřeba za poslední roky výrazně stoupá. Jedná se především o benzodiazepinové deriváty.

Vlastním cílem práce je studium záchytu bromazepamu kořenovým systémem *in vitro* kultivovaných rostlin.

Práce zahrnuje:

- 1) Literární rešerši vlastností a ekotoxikologických vlastností benzodiazepinů.
- 2) Sterilní kultivaci rostlin *Zea mays* pro následnou fytoextrakci.
- 3) Provedení fytoextrakčních experimentů ve sterilním prostředí s postupnými odběry kultivačního media pro stanovení aktuální koncentrace bromazepamu.
- 4) HPLC/UV analýzy odebraných medií
- 5) Vyhodnocení experimentů, fytoextrakční účinnosti, jejího průběhu, množství zachyceného kontaminantu. Posouzení možnosti užití ve fyto-remediačních technologiích a zhodnocení možnosti kontaminace potravních řetězců.

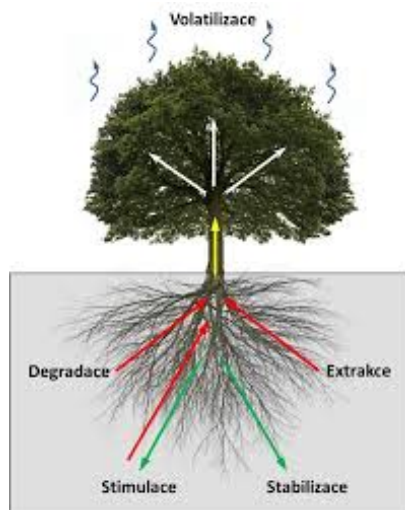
## 2.1 Teoretická část

### 2.1.1 Fytoremediace

Fytoremediace jsou metody, které se využívají u rostlin k fixaci, akumulaci, transformaci a rozkladu nebezpečných kontaminantů nebo k jejich eliminaci z životního prostředí. Při fytoremediacích se může uplatňovat několik různých procesů (viz Obr. 3): extrakce znečišťujících látek z vody a půdy (zejména těžké kovy a radionuklidy), degradace organických látek, volatilizace organických i některých anorganických sloučenin či stimulace mikrobiální látkové přeměny v rhizosféře. Metoda využívá rostliny pro *in situ* remediaci půdy, usazenin a vody. Zvolená vegetace se používá například k extrakci kovů (včetně radioaktivních izotopů) a také k odstranění určitých organických látek. Aby byly fytoremediační metody úspěšné je důležitá biologická dostupnost znečišťujících látek z vody a půdy do rostlin, která je dána hlavně rozpustností látky, druhem půdy a také délkou působení kontaminace.

Výhodami fytoremediací jsou jejich šetrnost k životnímu prostředí (nedochází k použití těžké techniky ani k odstranění půdy), poměrně nízká cena i jejich klíčový estetický dojem. Z tohoto důvodu jsou také obecně velice dobře přijímány. Nevýhodou je bohužel jejich nízká účinnost. Rostliny se kromě organických kontaminantů používají i pro akumulaci iontů těžkých kovů (např. Hg, Se a As), kde existují i vysoce aktivní rostliny s obrovskou akumulační kapacitou (hyperakumulátory). Bohužel tyto rostliny jsou drobného vzrůstu a tudíž i vytvářejí jen málo biomasy což je pro praktickou technologii nepoužitelné.

Metoda fytoremediace využívá běžně používaných agrotechnických postupů při zemědělském hospodaření. Náklady na průběh remediace jsou minimální, tudíž i z ekonomické stránky je tento proces výhodný. Na druhou stranu je taková dekontaminace velmi pomalá a z tohoto důvodu se vědci stále častěji snaží šlechtěním nebo díky genovým manipulacím vytvořit nové kultivary s vyšší účinností extrakce a ukládání a větší odolností vůči klimatickým podmínkám a typům půd. [5-7, 9]



Obr. 3: *Fytoremediace - typy procesů* [8]

## 2.2 Rozdělení fytoremediačních technik

### 2.2.1 Fytodegradace

Při fytodegradaci jsou látky transformovány a absorbovány uvnitř rostliny, což je její výhodou oproti ostatním metodám. Díky enzymatickému aparátu mohou rostliny metabolizovat rozsáhlé spektrum polutantů. Často to probíhá v několika krocích, přičemž se na konci těchto procesů metabolit ukládá do vakuol a buněčných stěn. Jedna z nejdůležitějších částí fytodegradace probíhá v rhizosféře za účasti asociované mikroflóry. Díky kooperaci rostliny s bakteriemi a houbami lze využít určité enzymové dráhy. To přispívá ke zřetelně účinnější degradaci znečišťujících látek. [5-7, 9]

Jestliže jsou příslušné produkty metabolismu neškodné, je zbytečné rostliny sklízet a stačí u nich jen udržovat porost. Rovněž je u této metody nutné zajistit, aby nedocházelo k přeměnám na látky toxičtější než samotný polutant. V první řadě se fytodegradace využívá k odstranění organických polutantů (PAH, PCB, výbušniny, apod.). [5-7, 9]

### 2.2.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace se obvykle používá v místech s vysokým obsahem těžkých kovů, jako je například zemina vyvezená z dolů, odkaliště apod. Rostliny, které pro to využíváme, jsou schopné stabilizovat znečišťující látky i několika způsoby. Ať už je to pomocí redoxních přeměn, převedení kontaminantu do nerozpustné podoby

(např. ionty olova ve vazbě s fosfátem) či zabudováním do rostlinných struktur. [5, 6, 9]

Cílem této metody je zabránění nebo výrazné snížení přenosu kontaminantů do okolí a proto se fytostabilizace někdy aplikuje jako konečný krok pro úpravu postižených pásem, jež byly upravovány jinými technologiemi. [5, 6, 9]

### **2.2.3 Rhizofiltrace**

Tato metoda se nejčastěji aplikuje k absorpci, koncentraci a srážení xenobiotik z proudící, znečištěné vody prostřednictvím rychle rostoucího kořenového systému živých rostlin. V první řadě je rhizofiltrace vhodná hlavně pro odstranění nízkých koncentrací těžkých kovů, kdy nemůžeme použít jiný dekontaminační postup například u odpadních vod. Pro nahromadění některé z těchto látek rhizofiltrací je často využívána kukuřice, slunečnice nebo rýže. Slunečnice *Helianthus annuus* L. je například schopna účinně extrahovat různé kovy (chrom, mangan, kobalt, nikl a měď) z vody. [5-7, 9]

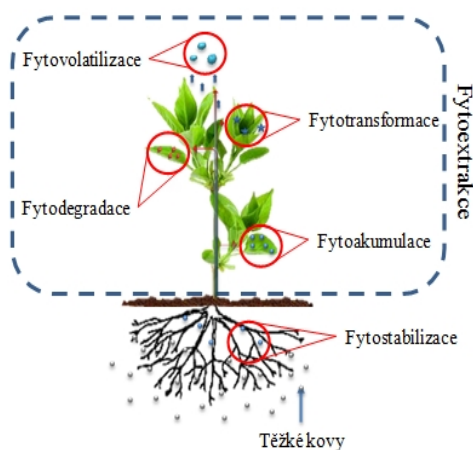
### **2.2.4 Fytovolatilizace**

Pomocí této metody dochází k příjmu znečišťující látky kořeny rostliny a následnému přenosu do nadzemní části (někdy dochází i k biotransformaci kontaminantu). Následně pak nastává vypaření těkavé absorbované látky. Fytovolatilizaci lze použít především na odstraňování organických znečišťujících látek, jako jsou např. složky benzínu (MTBE), ale i ionty kovů (Hg, Se, As). Využití fytovolatilizace je zároveň však velice diskutabilní, neboť dochází výhradně k přesunu kontaminantu z půdy do atmosféry a ne k jeho úplnému odstranění z prostředí. V několika státech (Švédsko, Japonsko) zkouší využít tuto metodu v praxi - městská zeleň by se měla podílet na čištění ovzduší. [5-7, 9]

### **2.2.5 Fytoextrakce**

Podstata fytoextrakce neboli fytoakumulace je vlastnost určitých rostlin vysetých na znečištěné ploše (půdě) přijímat a akumulovat anorganické i organické kontaminanty v rostlinných tkáních pomocí kořenového systému v průběhu jejich růstu (viz Obr. 4). Při využití této metody je potřeba rostliny s nahromaděnými odpadními látkami, které se ukládají především ve vakuolách a buněčných stěnách, odstranit; v opačném případě se po jejich odumření tyto látky vrátí zpět do

půdy. Nejvýhodnější a nejsnazší pro sklizeň je, když se polutanty ukládají v nadzemních částech rostlin. Těžké kovy, jako jsou například olovo a rtuť, však zůstávají především v kořenech a jejich likvidace je tudíž náročnější. Po nahromadění polutantů jsou rostliny sklizeny a dále zpracovány tepelně, mikrobiálně či chemicky. V případě organických kontaminantů je potřebné posoudit či experimentálně ověřit zda rostlina v důsledku enzymových pochodů neprodukuje podstatně toxičtější metabolity než jsou parentní látky. [5-7, 9]



Obr. 4: Schéma fytoextrakce [7]

## 2.2.6 Výhody a nevýhody fytořediace

Mezi největší výhody fytořediací je množství znečištěného materiálu, jenž je nutno likvidovat v porovnání s klasickým vytěžením kontaminované půdy. Dalšími výhodami těchto metod jsou [11]:

- použití *in situ*
- nepatrné poškození okolí
- další využití půdy (možnost ji použít k jinému účelu)
- využívání sluneční energie
- nízká cena oproti ostatním dekontaminačním technikám
- estetické využití

Avšak tyto metody mají i několik omezení a nevýhod, jimiž jsou například [11]:

- mnohdy nízká tolerance vůči znečišťujícím látkám
- většinou nedostatečný transport kontaminantů z kořenového systému do nadzemních částí
- nedostatečné prostory pro ukládání kontaminovaného rostlinného odpadu či jeho zničení
- nebezpečí znečištění potravy pro živočichy
- kontaminace nemusí být v dosahu kořenového systému
- dlouhodobý postup (až několik desítek let)

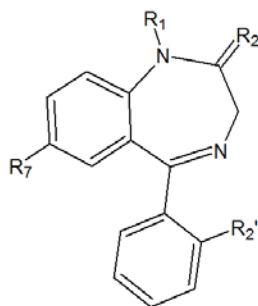
## 2.3 Anxiolytika

Anxiolytika jsou léčiva, která se používají nejen proti strachu, úzkostem či fobiím, ale i při napětí a stresu. Mezi hlavní představitele anxiolytik patří benzodiazepiny. Z toho vyplývá jejich nejzákladnější rozdělení na benzodiazepinová a nebenzodiazepinová. [12-14]

Nežádoucí efekty anxiolytik na člověka jsou poměrně zanedbatelné. Během jejich užívání se u pacienta může objevit ospalost, vyčerpanost a závratě, které pak v některých případech mohou přejít až ve zmatenost. Mezi další nežádoucí účinky lze zařadit zácpu, přibývání na váze, poruchy menstruačního cyklu a známky alergie. Jestliže se tyto látky po dlouhodobém užívání náhle vysadí, může dojít k epileptickým záchvatům. Existují i rostliny, které obsahují látky, jejichž extrakty mají podobné vlastnosti jako anxiolytika (snížení strachu a úzkosti) například: šafrán setý (*Crocus sativus*), levandule lékařská (*Lavandula officinalis*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*) či konopí (*Cannabis sativa*). [12-14]

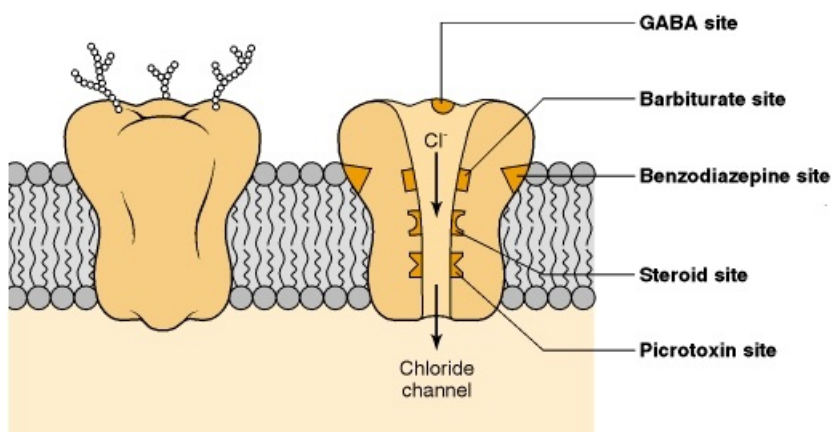
### 2.3.1 Benzodiazepiny

První syntetizovaným benzodiazepinem byl v roce 1961 chlordiazepoxid. Od té doby bylo vyvinuto více než 3000 látek s benzodiazepinovou strukturou, z nichž se téměř 50 dostalo do klinické praxe. Základ obecné chemické struktury těchto látek tvoří sedmičlenný diazepinový kruh, který je spojen s benzenovým jádrem. Modifikací farmakologických vlastností lze dosáhnout substitucí základního skeletu, jak je uvedeno na obrázku 5. [18]



Obr. 5: Obecná struktura benzodiazepinů

Benzodiazepiny mají své vazebné místo, které se nachází na receptorovém komplexu pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA), jedná se o tzv. hlavní tlumivý mediátor v mozku. Proud záporně nabitých chloridových iontů do buňky posílí účinek GABA na receptor a vyvolá tak jeho stimulaci (Obr. 6). Výsledkem této vazby je potlačení funkce CNS, protože nervová buňka dostatečně nereaguje na stimuly nervových vzruchů. Receptorová místa pro tyto látky se nacházejí například v limbickém systému, který mimo jiné dohlíží na prožívání emocí. [15-17]



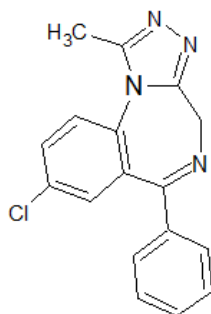
Obr. 6: Schéma GABA-receptoru [19]

Mezi výhody se řadí: rychlý účinek, zklidnění, podpora spánku, minimální nebezpečí při předávkování a zmírnění úzkosti či napětí. I přes jejich výhody však mají benzodiazepiny i mnoho nevýhod, například: únavu a ospalost, útlum CNS, kombinace například s alkoholem způsobuje utlumení dýchání, dále se nedoporučuje užití léků s těmito látkami během těhotenství kvůli možnosti vzniku vrozených vad (např. rozštěp). Přesto jsou benzodiazepiny stále jedny z nejčastěji předepisovaných anxiolytik. [15-17]

Rozdíl mezi jednotlivými benzodiazepinovými anxiolytiky je doba jejich působení. Lze je dělit na: krátko- (midazolam), středně- (bromazepam, alprazolam či oxazepam) a dlouho- (diazepam) době působící. Závislost, která většinou na tyto látky vzniká je fyzická i psychická. Odborníci tedy doporučují užívat benzodiazepiny nanejvýš několik týdnů. [15-17]

### 2.3.1.1 Alprazolam

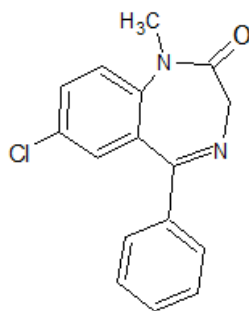
Alprazolam (viz Obr. 7) působí na CNS a posiluje vliv neurotransmiteru GABA (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná). Tato látka se využívá především k uklidnění při úzkostech, panických poruchách, depresích a také pro zklidnění nemocných s fobiemi (bacilofobie, agorafobie apod.). Užívat alprazolamu je možné i krátkodobě proti nespavosti, je-li však porucha způsobena psychikou. Předávkování může vést k poruše vědomí s oslabením dechového centra a ohrožení života pacienta. [20]



Obr. 7: Struktura alprazolamu

### 2.3.1.2 Diazepam

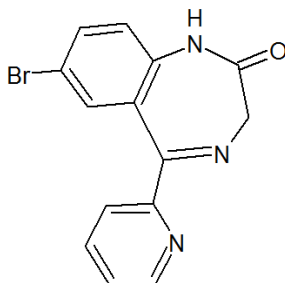
Diazepam (Obr. 8) patří k nejvíce používaným benzodiazepinům. Tato látka působí sedativně, uspává, uklidňuje a je účinná také proti úzkosti. Tudíž se v některých případech využívá jako lék na spaní či proti úzkosti nebo rozčilení. Poměrně ojedinělá indikace pro podání léčiva s touto účinnou látkou je delirium tremens a podobné známky abstinence, kterými trpí především dlouhodobí alkoholici po vysazení alkoholu. Podávat se dá i nitrožilně či ve formě čípku ke zklidnění při epileptického záchvatu a je také účinný u dalších svalových křečí (např. při hyperventilaci). Největší výhodou diazepamu je jeho rychlé působení, vymizení strachu, uvolnění svalstva či nástup spánku. [21]



Obr. 8: *Struktura diazepamu*

### 2.3.1.3 Bromazepam

Bromazepam (Obr. 9) ovlivňuje strach, úzkost, ale především má uklidňující účinek. Podle velikosti dávky léčiva s touto látkou se pacient může kvůli jeho sedativní účinkům cítit více uvolněný a ospalý. Poločas vylučování bromazepamu je přibližně 12 hodin u starších či nemocných však může být i delší. Jeho metabolismus probíhá v játrech a mezi produkty převládají: 3-hydroxy-bromazepam a 2-(2-amino-6-brom-3-hydroxybenzoyl)pyridin. Tato látka se vylučuje v konjugované formě převážně močí. Po ukončení léčby dochází vyloučení z organismu s minimálními syndromy z vysazení léčby. Při krátkodobém podávání je závislost na bromazepamu nízká, avšak při dlouhodobějším užívání se zvyšuje. To platí hlavně u nemocných závislých na alkoholu, pacientech, kteří zneužívají léky či nemocných s vážnými poruchami osobnosti. Možné předávkování touto látkou se projevuje zmatením, hlubokým spánkem, svalovou slabostí až zástavou dechu či v nejhorších situacích i kómatem, což může nastat především při nevhodné kombinaci s dalšími látkami ovlivňujícími centrální nervový systém. [22, 15]



Obr. 9: *Struktura bromazepamu*

## 3 Experimentální část

### 3.1 Přístroje

- Tlakový hrnec pro sterilizaci medií a laboratorního nádobí (Morphy Richards Rapid Cook)
- Centrifuga Spectrafuge TM 16M (Lahner)
- Kahan Fuego pro, WLD – Tec
- Systém HPLC značky INCOS, který se skládá z vysokotlakého čerpadla INCOS LCP 5020, autosampleru INCOS LC5 5040 a UV detektoru INCOS LCP 5000. Kolona XDB C18 (5  $\mu\text{m}$ ) měla rozměry 250x4,6 mm (AGILENT), předkolona C18 (WATREX)
- Ultrazvuková lázeň Fisherbrand® FB 15050
- Laminární box s vertikálním prouděním, typ FBB 120 (Labox)
- Mrazicí box (– 20 °C) (Liebherr)
- Kultivační boxy – kultivační místnost, v které byla teplota udržována na 26 °C, světelný režim 16 h světlo/ 8 h tma, osvětlení žárovkami COOL WHITE 36 W/m<sup>2</sup> ve vzdálenosti 40 cm

### 3.2 Chemikálie

- Bromazepam izolovaný z Lexaurinu 3 30x3 mg tablety, výrobce Krka, d. d.
- (Novo mesto, Slovinsko), extrakt v methanolu
- Savo Original (UNILEVER ČR spol. s.r.o.)
- Methanol HPLC Gradient Grade (Fisher Science UK)
- Acetonitril HPLC Gradient Grade (Fisher Science UK)
- Kyselina fosforečná, čistota  $\geq 99,99\%$  (Sigma Aldrich)
- Deionizovaná voda pro přípravu medií a mobilních fází z přístroje DEMIWA 3roi (Watek, ČR)
- Chemikálie potřebné k přípravě media podle Murashiga a Skooga (Lach-Ner s.r.o.) viz Tabulka č. 1

Tab. č. 1: *Murashige a Skoog medium*

<i>Makro prvky</i>	<i>c</i> [mg · L <sup>-1</sup> ]	<i>Mikro prvky</i>	<i>c</i> [mg · L <sup>-1</sup> ]
KNO <sub>3</sub>	1900	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22,3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	8,3
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	KI	0,83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25
		CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
		CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
		Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
		FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8

### 3.3 Rostlinný materiál

Pro studium fytoextrakce bromazepamu byla využita semena kukuřice seté (*Zea mays*) polní kultivar DKC 4014 (Monsanto ČR, s.r.o.). Kultivace byly prováděny na MS mediu.

### 3.4 Postup

#### 3.4.1 Kultivace sterilních rostlin

Semena kukuřice byla nejprve ponořena na půl minuty do 70% ethanolu. Následně byla na 10 minut sterilizována 20% roztokem Sava, poté na 20 minut 10% roztokem Sava a na závěr třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Poté byla do 500ml Erlenmeyerových baňek sterilně přenesena sterilizovaná semena kukuřice, 4 semena na jednu baňku. Všechny baňky obsahovaly 15 ml sterilního media. Semena byla kultivována v místnosti při pokojové teplotě (cca 26 °C) a při specifickém světelném režimu (16 h světlo/ 8 h tma). Osvětlení bylo realizováno fluorescenčními trubicemi CoolWhite, 36 W/m<sup>2</sup>, ze vzdálenosti 40 cm. Kultivace, u kterých se vyskytla mikrobiální, kvasinková či plísňová kontaminace byly průběžně odstraňovány. Jakmile rostliny dosáhly požadovaného optimálního vzrůstu (10 – 14 dnů) bylo do každé baňky s kukuřicí přidáno 50 ml dalšího sterilního media a zásobní roztok bromazepamu v methanolu o koncentraci 0,6 mg · mL<sup>-1</sup> v takovém objemu, aby koncentrace bromazepamu v přidávaném MS mediu byla 10 mg · L<sup>-1</sup>. Kultury byly dále kultivovány za výše uvedených podmínek.

### 3.4.2 Odběr vzorků k analýze

Okamžitě po přidání bromazepamu do všech Erlenmeyerových baněk s kukuřicí byl z každé sterilně, pomocí sterilní jehly a injekční stříkačky, odebrán první vzorek k určení výchozí koncentrace. Odebrané vzorky byly uschovány v mrazícím boxu pro další analýzy. Rostliny byly i dále kultivovány za již zmíněných podmínek (26 °C, 16 h světlo/ 8 h tma). Další 4 vzorky byly z baněk odebrány stejným způsobem po 24, 48, 72 a 168 hodinách od startu experimentu. U kultivací, které byly dle vizuálního posouzení kontaminovány nebyly již další odběry prováděny.

### 3.4.3 HPLC analýza

Pro zjištění účinnosti fytoextrakce bromazepamu pomocí kukuřice (*Zea mays*) byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Mobilní fází byla směs acetonitril: voda: kyselina fosforečná v poměru 28: 72: 0,1 (v/v/v), průtok mobilní fáze 1,00 mL · min<sup>-1</sup>, detekce při 233 nm. Separace probíhala na koloně XDB C18 (5 μm) o rozměrech 250 x 4,6 mm (AGILENT) s předkolonou C18 (WATREX)

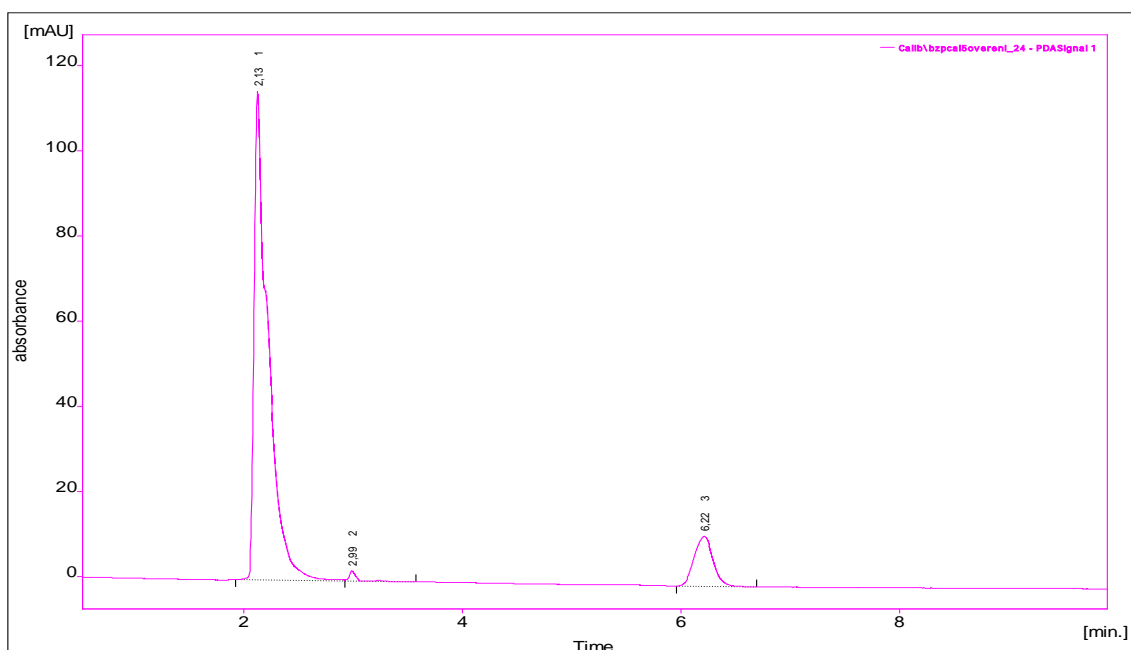
Nejprve byla analyzována kalibrační řada bromazepamu, s jednotlivými koncentracemi 15; 10; 5; 2,5 a 1 mg · L<sup>-1</sup> bromazepamu v MS mediu. Ze získaných dat byla na základě plochy píků vypočtena kalibrační přímka. Poté byly analyzovány jednotlivé odebrané vzorky čímž byly získány aktuální koncentrace bromazepamu v mediu v jednotlivých odběrech.

## 4 Výsledky a diskuze

V této práci byla zkoumána fytoextrakce bromazepamu prostřednictvím *in vitro* kultivovaných rostlin kukuřice seté (*Zea mays*). Během tohoto experimentu byl ke všem kultivacím přidán roztok bromazepamu jehož výsledná koncentrace v 50 mL přidaného MS media byla  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Odběry vzorků z jednotlivých kultivací byly postupně prováděny každých 24 hodin, aby bylo možné získat časovou závislost poklesu koncentrace bromazepamu v mediu. Odebrané vzorky byly analyzovány pomocí HPLC u UV detekcí při 233 nm.

### 4.1 HPLC analýza bromazepamu v kultivačním mediu

Pro kalibraci bromazepamu byly použity roztoky s koncentracemi: 15; 10; 5; 2,5 a  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  bromazepamu, který byl rozpuštěný v MS mediu. Z absolutní hodnoty šumu byly stanoveny LOD:  $0,051 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a LOQ:  $0,17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  za použitých podmínek.

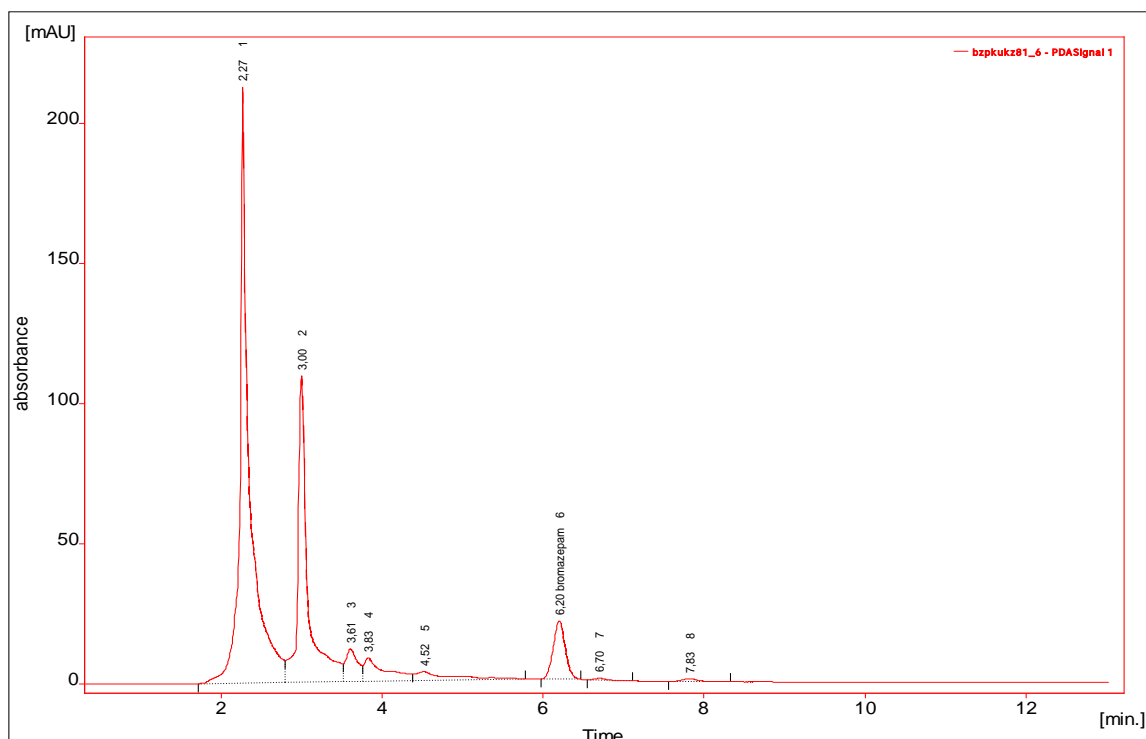


Obr. 10: Chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Po rozmražení a centrifugaci odebraných vzorků kultivací byly následně všechny vzorky analyzovány pomocí metody HPLC za výše uvedených podmínek. Pro zjištění jednotlivých píků v MS mediu s přídavkem bromazepamu byl použit standard o koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (viz Obr. 10).

Píky eluované v druhé až čtvrté minutě patří mezi složky MS media. Pík bromazepamu v jednotlivých vzorcích byl určen pomocí standardního roztoku o koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , jehož retenční čas byl 6,22 minut.

Obrázek 11 zobrazuje chromatogram vzorku kultivace č. 1, který byl odebrán osmý, tedy poslední den námi sledované fytoextrakce bromazepamu. Píky, které se objevují po bromazepamu mohou být buďto metabolity bromazepamu, či látky produkované rostlinou a vylučované do media ať již přirozeného či stresového charakteru.



Obr. 11: Chromatogram kultivace č. 1 (8. den)

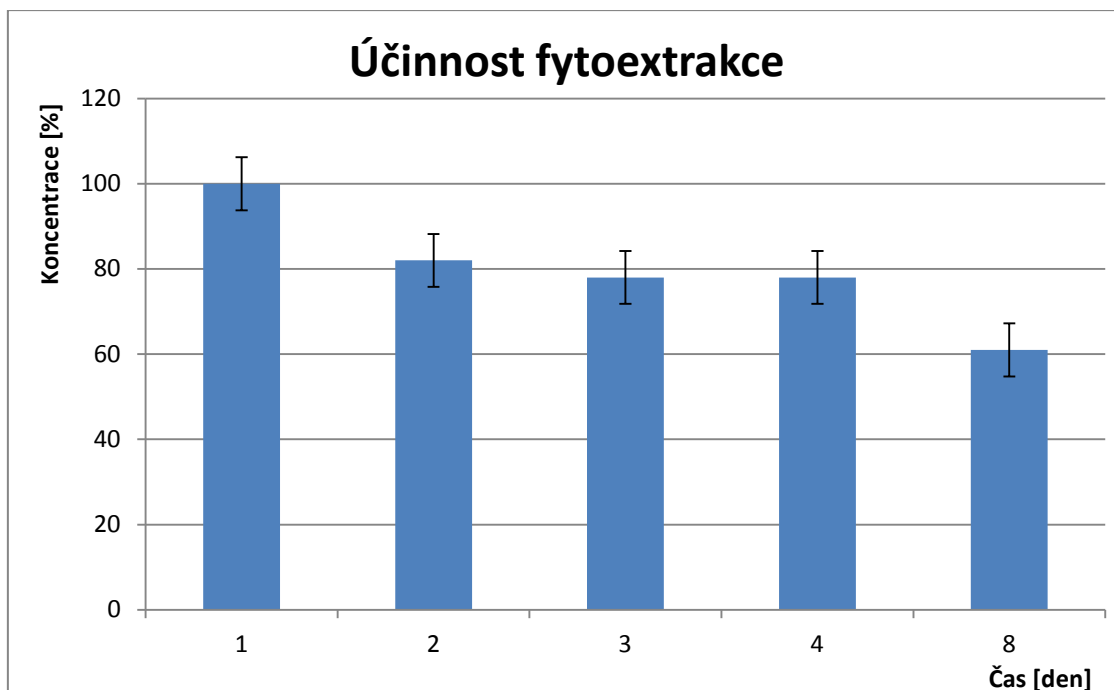
## 4.2 Studium fytoextrakce bromazepamu

Pro experiment s bromazepamem bylo použito 6 rostlin kukuřice seté (*Zea mays*) kultivovaných na mediu obohaceném o bromazepam ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). První odběr proběhl ihned po přidání MS media s bromazepamem k rostlině, další tři odběry následovaly v intervalech po 24 hodinách, poslední potom 168 hodin od začátku experimentu.

Graf č. 1 zobrazuje průměrnou účinnost fytoextrakce během 8 dnů u všech kultivací. Průměrná počáteční koncentrace byla  $10,54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Rozdíl mezi teoretickou a naměřenou hodnotou koncentrace mohl být buď zapříčiněn

nedokonalým odstraněním původního media před přidáním media, které obsahovalo bromazepam případně nepřesným objemem přidávaného media, které bylo po odměření objemu ještě tepelně sterilizováno. Hodnoty poklesu koncentrace studované látky jsou vyjádřeny jako procenta výchozí koncentrace.

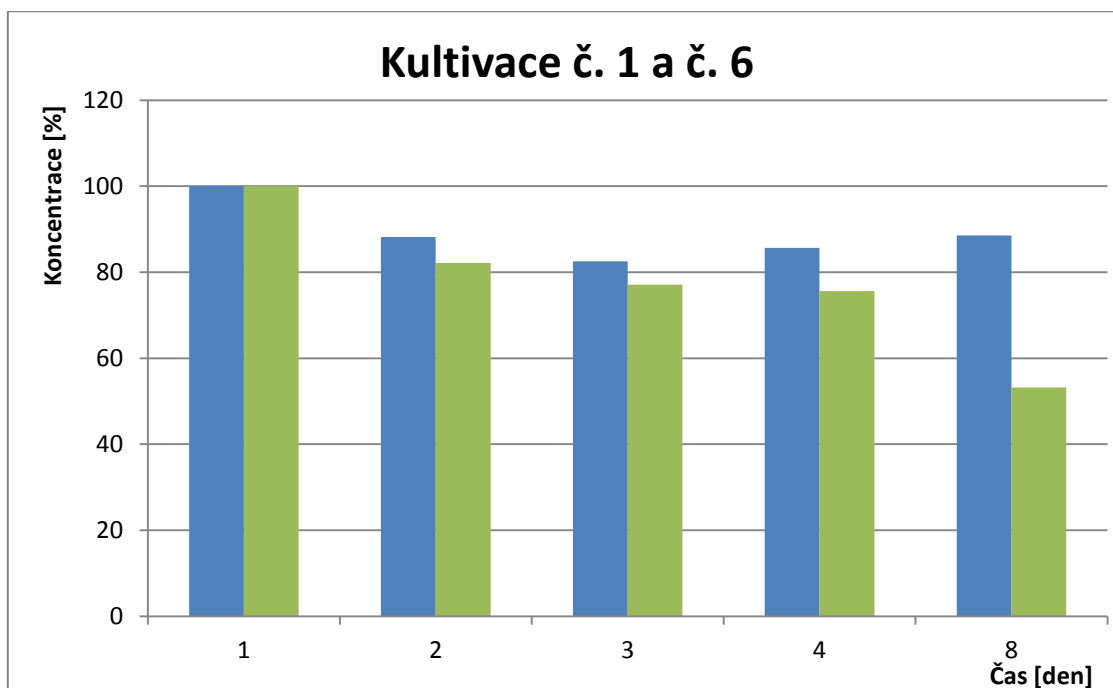
Jak se předpokládalo hodnoty koncentrací bromazepamu během kultivace postupně klesaly. Například pokles mezi prvním dnem (původní koncentrace  $10,54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a dnem třetím (koncentrace  $8,28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) byl mezi 15 – 20 %. Nízký pokles účinnosti fytoextrakce mezi třetím a čtvrtým dnem mohl být zapříčiněn opětovným vyloučením adsorbovaného či absorbovaného bromazepamu kořenovým systémem rostliny zpátky do media. To mohlo být pravděpodobně způsobeno buďto uvolněním primárně adsorbovaného kontaminantu do media či odumřením části kořenů, kdy v důsledku jejich rozkladu dochází obvykle k uvolnění zachycené látky.



Graf č. 1: Účinnost fytoextrakce kulturou *Zea mays* závislosti na čase odběru vzorku. (koncentrace studované látky je vyjádřena v procentech výchozí koncentrace, interval odběru 24 h)

Graf č. 2 porovnává změny naměřených koncentrací (v hodnotách  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) bromazepamu v kultivacích č. 1 a č. 6 v závislosti na době odběru. První den představuje odběr ihned po aplikaci media s bromazepamem ke kultivaci (0 hodin),

druhý den – 24 hodin, třetí den – 48 hodin, čtvrtý den – 72 hodin a poslední osmý den odběru – 168 hodin.



Graf č. 2: Porovnání fytoextrakce kultivace č. 1 (modrý sloupec) a kultivace č. 6 (zelený sloupec)

Důvodem anomálních hodnot koncentrace bromazepamu v kultivaci č. 1 může být například odumírání nebo kontaminace kultury během její kultivace. Z důvodu odumírání rostlinných tkání (především kořenů) mohlo dojít k uvolnění zachyceného bromazepamu zpět do kultivačního media.

Rostliny byly po ukončení kultivace zváženy a získaná hmotnost byla použita k výpočtu hmotnostní bilance záchytu v rostlinách.

Po zvážení jednotlivých rostlin z kultivací (mimo kultivace č. 3 a č. 4) bylo následně zjištěno, že účinnost záchytu léčiva byla v průměru 0,03 miligramu vztaženo na gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Experimentální výsledky jednoznačně prokazují záchyt studované látky v kořenovém systému kukuřice seté. Experimenty byly prováděny *in vitro*, v reálném systému polní kultivace či kořenových čistíren odpadních vod by samozřejmě mohly nastat jiné průběhy, nicméně základní tendence postupného vychytávání by měla zůstat zachována. Problémem v reálném systému je složitost matrice, ze které jsou látky extrahovány, na druhé straně se ale v reálném systému

tvoří mnohem více biomasy a remediační schopnost velmi často dobře koreluje právě s tímto nárůstem. Rozdíl vůči reálným podmínkám je rovněž v koncentracích studované látky, kdy environmentální koncentrace, ať již reálné, nebo předpokládané jsou řádově nižší, což může výrazně ovlivnit hodnotu účinnosti jak kladným tak záporným směrem. Obsah extrahovaného bromazepamu v rostlinách rovněž poskytuje důkaz o možnosti kontaminace potravních řetězců a ovlivňuje tak bezpečnost potravin i pro lidskou populaci. Exaktní zhodnocení by však vyžadovalo další studium charakteru záchyty a translokace do nadzemních částí.

## 5 Závěr

Fytoextrakce je jedna z fytoimediačních technik, které se zabývají eliminací polutantů ze životního prostředí. Tato metoda se využívá k zachytu anorganických i organických látek z půdy nebo vody pomocí kořenového systému.

Bromazepam patří mezi benzodiazepiny, které se široce používají jako anxiolytika a jejich spotřeba stále stoupá. S tím souvisí i možnost průniku do životního prostředí a následná kontaminace potravních řetězců se všemi důsledky působení na živočišný organismus. Studium zachytu bromazepamu má proto zásadní charakter.

V experimentech práci byl zjištěn záchyt bromazepamu z vodných roztoků pomocí kořenového systému v *in vitro* polním kultivaru kukuřice seté (*Zea mays*). Účinnost extrakce byla za použitých experimentálních podmínek okolo 40 %. Nižší účinnost u některých kultivací mohla být způsobena poruchami růstu či kontaminací z okolního prostředí, nelze opomenout taktéž přirozenou biodiverzitu.

Celkově je však možné konstatovat, že byla prokázána schopnost zachytu bromazepamu kořenovým systémem kukuřice. Z hlediska remediačních technologií to prokazuje reálnou možnost využití studovaného kultivaru při odstraňování benzodiazepinových polutantů. Na druhé straně je zřejmé, že dochází ke kontaminaci rostliny, což může mít za důsledek průnik bromazepamu do potravních řetězců. Přímý příspěvek z hlediska bezpečnosti potravin by však vyžadoval ještě další studium translokace, ukládání resp. metabolických přeměn bromazepamu v rostlinných tkáních, což bude náplní dalších projektů.

## 6 Zdroje

- [1] Šídlová, P.; Podlipná, R.; Vaněk, T.: Cystická léčiva v životním prostředí. *Chemické listy* **105**, 8 – 14 (2011)
- [2] Kotyza, J.; Soudek, P.; Kafka, Z.; Vaněk, T.: Léčiva – nový environmentální polutant. *Chemické listy* **103**, 540 – 547 (2009)
- [3] Smrček, S.: *Cesty k odmoření vod*. Dostupné z: <<http://vesmir.cz/2014/07/16/cesty-odmoreni-vod/>> [cit. 16. 5. 2016]
- [4] Rozsypal, L.: *Analýza léčiv v povrchových vodách*. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <<http://theses.cz/id/ssai07/>> [cit. 15. 5. 2016]
- [5] Soudek, P.; Petrová, Š.; Benešová, D.; Kotyza, J.; Vaněk, T.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy* **102**, 346–352 (2008)
- [6] Vaněk, T.; Soudek, P.; Tykva, R.; Kališová, I.: *Možnosti využití fytoremediace pro odstranění kontaminace způsobené toxickými kovy a radionuklidy*. Dostupné z: <[http://slon.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/zahlazovani/Z07/P\\_07.htm](http://slon.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/zahlazovani/Z07/P_07.htm)> [cit. 17. 5. 2016]
- [7] Příbylová, L.: *Fytoremediace – využití rostlin a mikroflóry k dekontaminaci půdy*. Dostupné z: <[http://www.aldebaran.cz/bulletin/2014\\_14\\_bio.php](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2014_14_bio.php)> [cit. 20. 4. 2016]
- [8] Soudek, P.: *Fytoremediace léčiv a jejich reziduí*. Dostupné z: <<http://web.vscht.cz/~brezinam/crpweb/Soudek-Fytorem-CRP.pdf>> [cit. 19. 4. 2016]

- [9] Bláha, J.: *Fytostabilizace – když rostliny hasí naše průšvihy*. Dostupné z: <<http://www.gate2biotech.cz/fytostabilizace-kdyz-rostliny-hasi-nase-prusvihy/>> [cit. 17. 5. 2016]
- [10] *Odpadové hospodářství – praktika a výživy*. Dostupné z: <[http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=4655&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=4655&typ=html)> [cit. 11. 4. 2016]
- [11] Susarla, S.; Medina, F. V.; McCutcheon C. S.: Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18**: 5, 647– 658 (2002)
- [12] Polách, L.: *Benzodiazepinová anxiolytika*. Dostupné z: <<http://www.upsychiatra.cz/benzodiazepinova-anxiolytika/>> [cit. 21. 4. 2016]
- [13] *Anxiolytika, proti strachu, úzkosti*. Dostupné z: <<http://leciva-leky.nasclovek.cz/anxiolytika>> [cit. 22. 4. 2016]
- [14] *Nezaměňujte anxiolytika s antidepresivy*. Dostupné z: <<http://www.ulekar.cz/clanek/nezamenujte-anxiolytika-s-antidepresivy-11713>> [cit. 23. 4. 2016]
- [15] *Souhrn údajů o přípravku*. Dostupné z: <<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC93736.doc>> [cit. 24. 4. 2016]
- [16] *Benzodiazepiny, tlumící nervovou soustavu*. Dostupné z: <<http://leciva-leky.nasclovek.cz/benzodiazepiny>> [cit. 24. 4. 2016]
- [17] Minařík, J.: *Benzodiazepiny*. Dostupné z: <<http://www.drogovaporadna.cz/psychofarmaka/benzodiazepiny.html>> [cit. 24. 4. 2016]
- [18] Lincová, D.; Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2007.

- [19] Olsen, R.; DeLorey, T.: *Getting down to the molecular level*. Dostupné z: <<https://tlarremore.wordpress.com/2014/11/05/getting-down-to-the-molecular-level/>> [cit. 26. 4. 2016]
- [20] Štěpánek, J.: *Alprazolam*. Dostupné z: <<http://www.stefajir.cz/?q=alprazolam>> [cit. 17. 5. 2016]
- [21] Štěpánek, J.: *Diazepam*. Dostupné z: <<http://www.stefajir.cz/?q=diazepam>> [cit. 17. 5. 2016]
- [22] *Bromazepam*. Dostupné z: <<https://drugs-forum.com/forum/showwiki.php?title=Bromazepam>> [cit. 17. 5. 2016]