

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Sofie Štrosová

Studium interakce residuí farmak s vyššími rostlinami
The study of interactions of drug residues with higher plants

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze dne 13. května 2019

Sofie Štrosová

Abstrakt

Psychotropní látky patří v současné době k běžně používaným léčivům. Jejich spotřeba dramaticky stoupá, silně se tak zvyšuje možnost kontaminace životního prostředí. I když jsou tyto látky z velké části metabolizovány, přesto se určitá část exkretuje močí do komunálních odpadních vod. Čistírny odpadních vod odstraňují tyto mikropolutanty jen částečně. Výtoky z čistíren ústí do povrchových toků a jejich prostřednictvím jsou polutanty rozšiřovány ve vodním ekosystému a následně kontaminují i suchozemské organismy. Interakce léčiv s rostlinami poskytuje informace o možnosti biotechnologické dekontaminační technologie – fytoremediace a zároveň poukazuje na možnost kontaminace potravních řetězců člověka i živočichů u kterých tyto polutanty mohou způsobit změny v chování a reprodukci.

Léčivé látky trazodon a hydroxyzin patří k často předepisovaným léčivům. Byla zkoumána možnost jejich fytoextrakce a záchyt kořenovým systémem rostlin kukuřice (*Zea mays*) v *in vitro* sterilním modelovém systému. Rostliny byly kultivovány na Murashige-Skoog kultivačním médiu. Po dosažení adekvátního vzrůstu byl ke kultivacím přidán roztok média se studovaným polutantem o koncentraci 5 mg/L a 10 mg/L. Pokles koncentrace léčiv v médiích byl sledován pomocí HPLC po dobu 8 dní. Byla prokázána schopnost rostlin extrahovat z média obě léčiva. V případě trazodonu při výchozí koncentraci 5 mg/L poklesla koncentrace za 168 hodin na 19 % původní hodnoty, u vstupní koncentrace 10 mg/L byla zbytková hodnota 30 %. V rostlinách byla naměřena maximální akumulace 0,75 mg trazodonu na gram čerstvé hmotnosti rostliny. Záchyt hydroxyzinu byl mnohem menší, při 5 mg/L zůstalo v médiu po 168 hodinách kultivace 75 % původní látky, při 10 mg/L 42 %. Akumulace byla maximálně 0,4 mg/g čerstvé hmotnosti. Výsledky ukazují na možnost využití fytoextrakce k čištění vod, na druhé straně poukazují na možnost kontaminace potravních řetězců, přičemž trazodon je rostlinou sorbován a ukládán ve výrazně větším množství než hydroxyzin.

Klíčová slova: ekochemie, fytoremediace, hydroxyzin, léčiva, trazodon,

Abstract

Psychotropic agents are currently commonly used drugs. Their consumption increases dramatically, thus increasing the possibility of environmental contamination. Although these substances are largely metabolized, some of them are excreted through urine into municipal wastewater. Wastewater treatment plants only partially remove these micropollutants. Water effluent from wastewater treatment plants enter surface flows and through them pollutants are spread in the aquatic ecosystem and can contaminate terrestrial organisms. The interaction of drugs with plants provides us with information about the possible use of biotechnological decontamination technology – phytoremediation. In addition, the same process shows us the possibility of contamination of food chains of humans and animals, where these pollutants can cause changes in behavior and reproduction.

The active substances trazodone and hydroxyzine are frequently prescribed drugs. The possibility of their phytoextraction and their uptake by the root system of corn plants (*Zea mays*) in an *in vitro* sterile model system was studied. Plants were cultivated on Murashige-Skoog medium. After adequate growth, medium with the studied pollutant with concentration 5 mg/L and 10 mg/L was added to the cultivations. The decrease in drug concentration in the medium was analyzed by HPLC for 8 days. The ability of plants to extract both drugs from the medium has been confirmed. In the case of trazodone at a starting concentration of 5 mg/L, the concentration at 168 hours decreased to 19% of the original value, at a concentration of 10 mg/L the residual value was 30%. In plants, a maximum accumulation of 0.75 mg trazodone per gram fresh plant weight was measured. The hydroxyzine uptake was lower, after 168 hours of cultivation 75 % of the parent compound remained in the medium for starting concentration 5 mg/L and 42 % for 10 mg/L. Accumulation was at most 0.4 mg / g fresh plant weight. The results show that the phytoextraction is a possible way for water purification, on the other hand they show the possibility of contamination of food chains, while trazodone is uptaken by the plant and deposited in a significantly higher amount than hydroxyzine.

Keywords: drugs, ecochemistry, phytoremediation, hydroxyzine, trazodone

Poděkování

Ráda bych vyjádřila svůj dík Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za jeho trpělivost při realizaci experimentů, poskytnuté odborné konzultace a připomínky k psané části práce.

Obsah

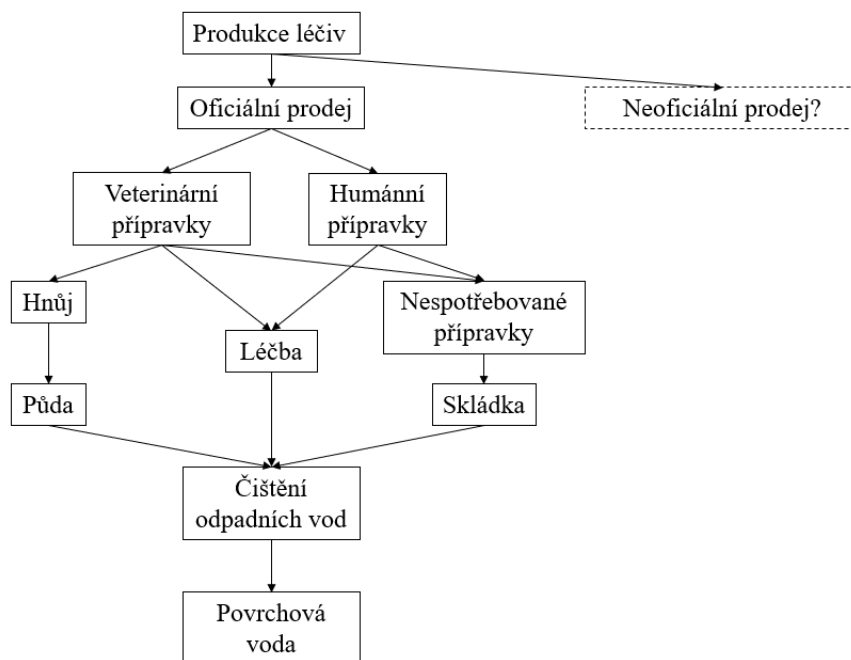
Abstrakt	- 3 -
Abstract.....	- 4 -
Seznam zkratek.....	- 7 -
1. Úvod.....	- 8 -
2. Cíl bakalářské práce	- 10 -
3. Teoretická část.....	- 11 -
3.1. Užívání antidepresiv	- 11 -
3.2. Výskyt léčiv v životním prostředí.....	- 12 -
3.3. Osud léčiv v životním prostředí.....	- 13 -
3.4. Psychofarmaka.....	- 13 -
3.4.1. Trazodon.....	- 13 -
3.4.2. Hydroxyzin	- 15 -
3.5. Metody bioremediace	- 17 -
3.5.1. Mikrobiální remediace.....	- 17 -
3.5.2. Fytoremediace	- 17 -
3.5.3. Výhody a nevýhody fytoremediace.....	- 19 -
4. Experimentální část.....	- 20 -
4.1. Přehled použitých chemikálií a přístrojů	- 20 -
4.2. Použité rostliny a médium	- 21 -
4.3. Postup práce.....	- 22 -
4.3.1. Kultivace rostlin <i>Zea mays</i>	- 22 -
4.3.2. Přidání léčiva a odebrání vzorků.....	- 23 -
4.3.3. Zpracování rostlin po ukončení kultivace	- 24 -
4.3.4. HPLC analýza.....	- 24 -
5. Výsledky a diskuze.....	- 25 -
5.1. Provedení kalibrace.....	- 25 -
5.2. Trazodon	- 25 -
5.3. Hydroxyzin	- 29 -
5.4. Srovnání schopnosti záchytu léčiv rostlinami kukuřice seté	- 32 -
5.5. Příklady chromatogramů.....	- 33 -
6. Závěr.....	- 35 -
7. Literatura	- 36 -

Seznam zkratek

API	aktivní farmaceutická ingredience
CNS	centrální nervová soustava
ČOV	čistírna odpadních vod
DDD	definovaná denní dávka
GAD	generalizovaná úzkostná porucha
GC – MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
GIT	gastrointestinální trakt
LC – MS	kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
mCPP	<i>meta</i> -chlorfenylpiperazin
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PPCP	farmaka a produkty osobní péče
SARI	serotoninový antagonist a inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
TCA	tricyklická antidepresiva
TPPA	3-(3-oxo-[1,2,4]triazolo[4,3- <i>a</i>]pyridin-2(3 <i>H</i>)-yl)propanal
UV	ultrafialové záření

1. Úvod

Pokroky, kterých se dosáhlo ve vývoji léčiv během minulého století a jejich pozitivní vliv na člověka jsou dobře známy. V dnešní době je na trhu EU 3000 autorizovaných léčivých přípravků, běžně označovaných jako Active Pharmaceuticals Ingredients (API) [1]. Léčivé účinky biologicky aktivních látek na lidské a veterinární zdraví jsou všeobecně uznávané. Účinky léčiv na necílové organismy, po vstupu API do životního prostředí, však nejsou zcela probádané. Studium efektů farmak v životním prostředí zaznamenalo nárůst v 90. letech minulého století. [2] Léčiva a jejich rezidua (hormony, antidepresiva, antibiotika) se dostávají do životního prostředí jejich užitím a následnou exkrecí uživateli nebo nesprávnou likvidací nepoužitých léčiv. Tyto látky jsou odstraňovány v čistírnách odpadních vod (ČOV) pouze částečně, a tak se léčiva a jejich metabolity dostávají do povrchových i podzemních vod, které jsou následně zdrojem pitné vody. [3] Dalšími cestami, prostřednictvím kterých vstupují aktivní látky do životního prostředí, jsou odpadní vody z ČOV a skládek odpadu. Používání zvířecích výkalů při hnojení polí v zemědělství vede rovněž k znečištění půdy. Schéma distribuce API v životním prostředí je zobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1: Distribuce léčiv v životním prostředí [10]

Mezi nejčastěji užívaná léčiva dnešní doby patří psychofarmaka. Tyto léky mají nastaveny fyzikálně-chemické vlastnosti tak, aby dobře přecházely přes hematoencefalickou membránu a mohly účinně působit v oblasti neuronových synapsí centrálního nervového systému. Jsou však zároveň ve vodním prostředí ekosystému snadno sorbovány fytoplanktonem, zooplanktonem a vodními živočichy. Výskyt těchto široko používaných látek v životním prostředí a studie, které dokládají velkou rezistenci a toxicitu vůči necílovým organismům potvrzují, že psychofarmaka jsou alarmující polutanty pro životní prostředí. Navzdory předpokládanému dopadu i na suchozemské organismy je značný nedostatek znalostí týkajících se psychofarmak a jejich osudu v životním prostředí. [4]

2. Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce je vyhodnocení možnosti použití fytoremediace k odstranění psychofarmak z životního prostředí. Jako modelové substance byla zvolena psychofarmaka trazodon a hydroxyzin. Jako rostlinný materiál pro fytoextrakční experimenty byla použita kukuřice setá (*Zea mays*).

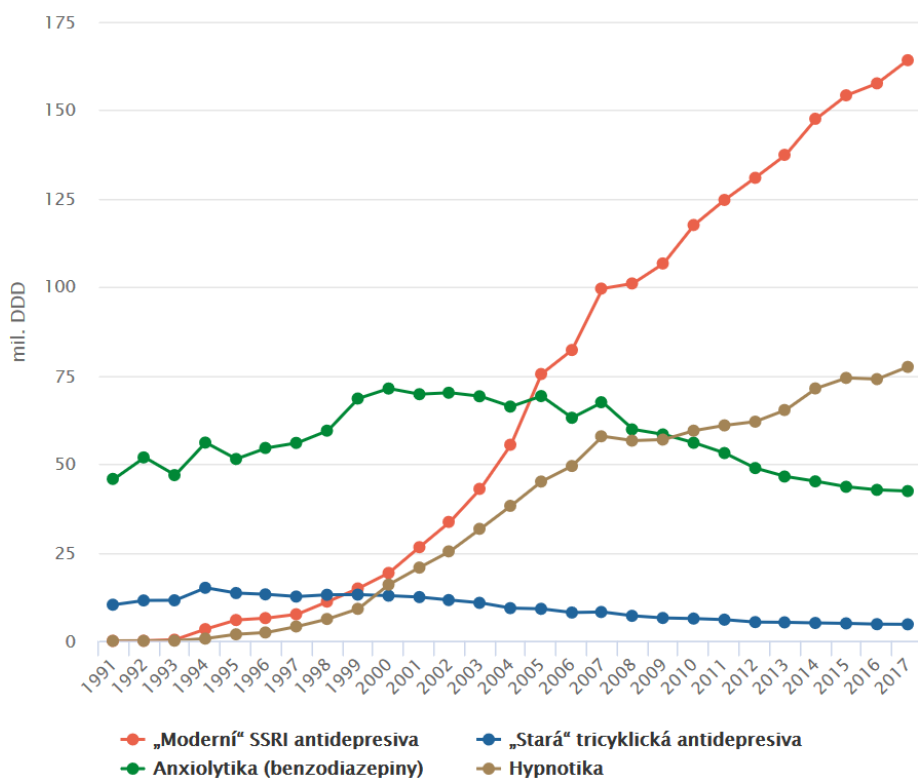
Postup práce:

- a) Příprava sterilních *in vitro* kultur *Zea mays*.
- b) Fytoextrakční experimenty s roztoky trazodonu s koncentrací 5 mg/L a 10 mg/L přidaných k *in vitro* kulturám.
- c) Fytoextrakční experimenty s roztoky hydroxyzinu s koncentrací 5 mg/L a 10 mg/L přidaných k *in vitro* kulturám.
- d) Odebírání vzorků média z jednotlivých kultur během 8 dní v 24hodinových intervalech.
- e) Experimentální nalezení podmínek pro analýzu kultivačních médií.
- f) Měření a vyhodnocení kalibračních standardů pro stanovení koncentrace studované látky v médiu.
- g) Stanovení koncentrací studovaných látek v odebraných vzorcích média.
- h) Vyhodnocení fytoextrakčních závislostí pro trazodon a hydroxyzin a jejich porovnání.
- i) Diskuze získaných výsledků.

3. Teoretická část

3.1. Užívání antidepresiv

Spotřeba antidepresiv ve vyspělých zemích za posledních deset let výrazně stoupla. Antidepresiva se využívají jako účinná pomoc při depresích a stavech úzkosti. Deprese je běžná duševní porucha, která se projevuje špatnou náladou, narušeným spánkem, nechutí k jídlu, špatnou koncentrací a také pocity úzkosti. Tyto problémy se mohou stát chronickými a narušit jedinci schopnost postarat se o své každodenní povinnosti. V nejhorším případě může deprese vést k sebevraždě. V České republice je nárůst užívání antidepresiv až trojnásobný. Tento negativní trend je zřejmý z počtu vydaných kusů balení antidepresiv, v roce 2002 to bylo 3 081 499 kusů a v roce 2012 bylo prodáno až 6 015 993 kusů balení. Dalším údajem je zvýšení počtu definovaných denní dávek (DDD), v roce 2002 bylo využito 52 983 199 DDD antidepresiv, v roce 2012 číslo vystoupalo na 177 977 408 DDD, jedná se tak o nárůst o 236 %. Tento údaj v principu znamená, že jsou více předepisovaná velká balení antidepresiv.[5] Obrázek 2 znázorňuje počty DDD v milionech u různých typů antidepresiv v období od roku 1991 do roku 2017.



Obrázek 2: Spotřeba psychofarmak [8]

3.2. Výskyt léčiv v životním prostředí

Organické látky detegované v životním prostředí patří do skupiny farmak a produktů osobní péče (PPCP). Na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, jako je např. hydrofobicita a disociační konstanta dochází k vychytávání, akumulaci, translokaci a transformaci v rostlinách. Další faktory, které ovlivňují příjem a akumulaci PPCP jsou fyziologické vlastnosti rostlin a jejich tkání, charakter půdy (jako je pH a obsah organických látek), kvalita vody, koncentrace polutantu a doba expozice. [9]

Analýza organických látek, konkrétně API, je nejčastěji prováděna pomocí LC-MS, někdy GC-MS. [2] API se vyskytují v životním prostředí v jednotkách od ng/L- μ g/L. I když tyto koncentrace nejsou akutně toxické pro člověka ani pro necílové organismy, je nutné si uvědomit, že se aktivní látky nevyskytují jako izolované skupiny ale jako směsi. Zároveň se jedná o dlouhodobé, kontinuální působení. V tomto kontextu tvoří psychoaktivní léčiva jednu z největších skupin, které mohou působit ekotoxicky vůči necílovým vodním a suchozemským organismům. [4]

3.3. Osud léčiv v životním prostředí

API jsou látky s různými fyzikálními a biologickými vlastnostmi. Většinou mají kyselé nebo bazický charakter, v životním prostředí se tudíž mohou vyskytovat jako neutrální molekuly, kationty, anionty nebo obojaké ionty. Působením enzymů nebo mikroorganismů dochází v lidském nebo zvířecím těle ke změně chemické struktury API a tvoří se metabolity. Některá léčiva jsou z velké části metabolizována, zatímco jiná jsou vyloučena z těla ven ve zcela nezměněné podobě. Metabolismem dochází ke změně biologické aktivity příslušné látky a k zvýšení rozpustnosti ve vodě. Po exkreci z těla ven do životního prostředí může docházet k dalším transformacím působením biotických a fotochemických procesů. Těmto produktům se říká transformační produkty. Obecně se sice předpokládá, že metabolismem se snižuje toxicita API, časté jsou však i případy, kdy se látka až působením metabolických procesů stává aktivní (tzv. pro-léčiva). [10]

3.4. Psychofarmaka

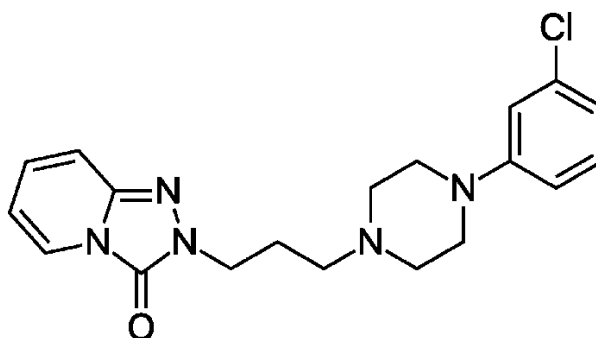
Psychofarmaka jsou látky ovlivňující centrální nervovou soustavu (CNS). Tato léčiva musí být za fyziologických podmínek dostatečně lipofilní, aby mohla přecházet ze systémového řečiště přes hematoencefalickou bariéru. Psychofarmaka působí na funkce CNS buď aktivačně nebo tlumivě. Podle primární indikace patří mezi nejčastěji užívaná psychofarmaka: antidepresiva, stabilizátory nálady, anxiolytika, hypnotika a antipsychotika. V této bakalářské práci jsem se zabývala léčivem trazodon, který je zástupcem antidepresiv a anxiolytikem hydroxyzin. [11]

3.4.1. Trazodon

Trazodon začal být využíván pro klinické účely v 90. letech minulého století v USA. Patřil mezi první objevená antidepresiva tzv. „druhé generace“. Jeho vedlejší účinky byly méně negativní než vedlejší účinky do té doby používaných tricyklických antidepresiv, mezi které patří například amitriptylin a imipramin. [12] Obecně jsou antidepresiva rozsáhlá skupina psychofarmak, které se používají k léčbě afektivních

poruch (např. deprese). Za hlavní příčinu depresí a dalších afektivních poruch se považuje především změna hladiny serotoninu na synapsích.

Trazodon je triazolopyridinový derivát, jeho chemický název je 2-[3-(4-*m*-chlorfenylpiperazin-1-yl)propyl]-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyridin-3(2*H*)-on. [13] Chemický vzorec trazodonu je zobrazen na obrázku 3.



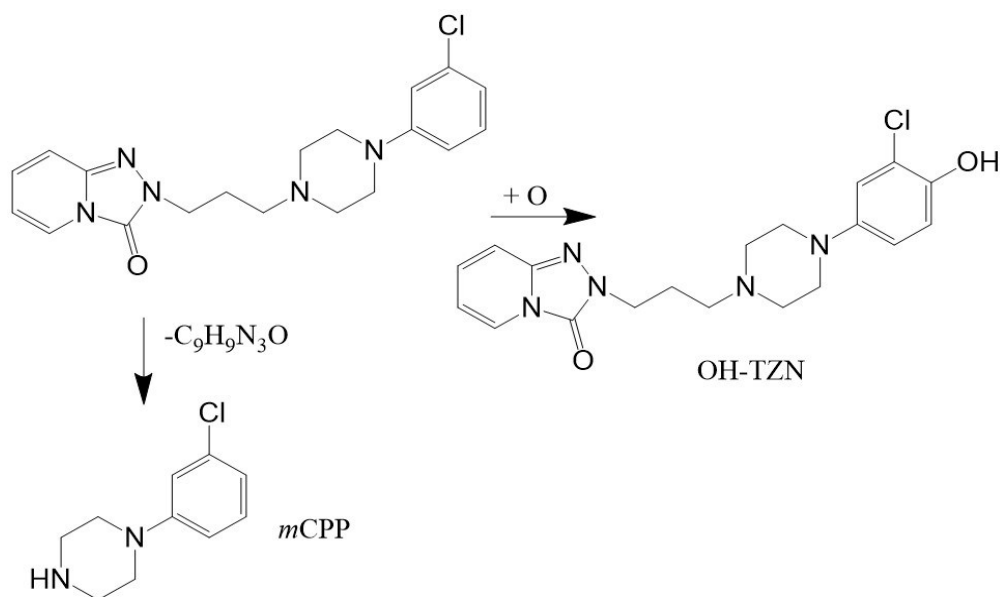
Obrázek 3: Chemický vzorec trazodonu

Účinkuje antagonisticky na serotoninové receptory 5-HT₂ a slabě inhibuje zpětné vychytávání serotoninu. Tato skupina antidepresiv se nazývá SARI (antagonisté serotoninu a zpětného vychytávání serotoninu). Trazodon má rovněž antihistaminové a adrenolytické účinky. Dále také působí sedativně, což se využívá u pacientů, u kterých v klinickém obraze dominuje nespavost. Na rozdíl od antidepresiv ze skupiny SSRI nevyvolává některé běžné nežádoucí účinky, které jsou spojené se zvýšeným obratem serotoninu např. sexuální dysfunkce. [11] [14] Trazodon má také anxiolytické účinky, a tudíž se úspěšně využívá při léčbě panických a úzkostných poruch. Při léčbě posttraumatických stresových poruch může být rovněž zvolen trazodon v případech, kdy nezabírají léky ze skupiny SSRI. [15]

Metabolismus trazodonu probíhá v játrech, dochází k jeho hydroxylaci, rozštěpení pyridinového kruhu, dealkylaci a N-oxidaci, čímž dochází k vzniku farmakologicky aktivního metabolitu *meta*-chlorfenylpiperazinu (mCPP) a neaktivní látky TPPA. K vylučování trazodonu v nezměněné podobě dochází močí, přičemž je vyloučeno méně než 1 %. [16]

V ČR se komerčně prodává od roku 1999 pod obchodním názvem TRITTICO AC (Medicom International s.r.o. ČR), účinnou látkou je trazodon hydrochlorid, což je sůl připravená z ekvimolárního množství trazodonu a chlorovodíku. [17]

Při studiu osudu trazodonu v rostlinách bylo zjištěno, že dochází z velké části k translokaci z kořenů do listové části rostliny, především vzhledem k polárnějšímu charakteru látky. Na obrázku 4 jsou znázorněny dva metabolity trazodonu, které byly nalezeny v řeřiše seté (*Lepidium sativum*) a to mCPP a hydroxylovaný trazodon. [18]

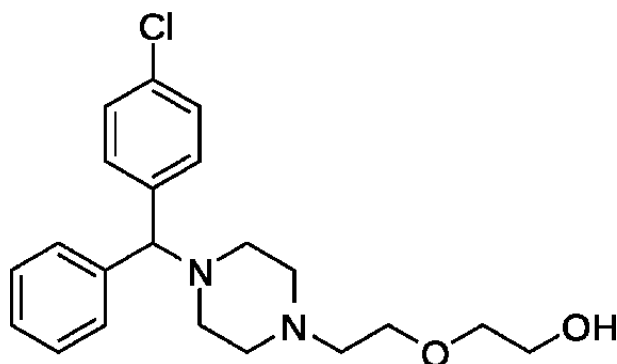


Obrázek 4: Metabolity trazodonu [18]

3.4.2. Hydroxyzin

Hydroxyzin patří mezi nebenzodiazepinová anxiolytika. Anxiolytika se primárně užívají při léčbě generalizované úzkostné poruchy (GAD). Pacienti trpící GAD pocítují bolestné napětí v hlavě, třes, neumí odpočívat a ani relaxovat a neustále se strachují. Pozitivní účinky hydroxyzinu při léčbě GAD byly potvrzeny klinickými testy z roku 1998. [19]

Chemický vzorec hydroxyzinu je zobrazen na obrázku 5, jeho chemický název je 2-[2-[4-[(4-chlorphenyl)-phenylmethyl]piperazin-1-yl]ethoxy]ethanol. [20]



Obrázek 5: Molekula hydroxyzinu

Hydroxyzin ovlivňuje histaminový receptorový systém, působí jako inverzní agonista histaminergního H_1 receptoru. Rovněž působí jako antagonist dopaminových D_2 receptorů, serotoninových $5-HT_{2A}$ a adrenergic α_1 receptorů, což má pravděpodobně za následek anxiolytické účinky. Hydroxyzin jakožto antihistaminikum účinně tlumí různé formy kopřivky a ekzému, dále má sedativní a bronchodilatační účinky a pozitivně ovlivňuje poruchy spánku. Starší antihistaminika mají velké riziko anticholinergních účinků, zato hydroxyzin má nízkou afinitu k muskarinovým receptorům, a tudíž toto riziko je nízké. [16]

Hydroxyzin se rychle vstřebává v GIT a v organismu se dobře distribuuje. Hydroxyzin je v těle silně metabolizován cestou CYP3A4. Hlavní metabolit cetirizin, který je účinný při léčbě alergií, vzniká působením alkoholdehydrogenázy a působí jako silný periferní antagonist H_1 receptorů. Pouze 0,8 % dávky hydroxyzinu je vyloučeno nezměněné močí. [11]

V ČR se komerčně prodává pod názvem ATARAX (UCB Pharma S.A.,Belgie), který obsahuje účinnou látku hydroxyzin dihydrochlorid.

Hydroxyzin byl testován na akutní toxicitu u ploštěnek druhu *Dugesia japonica*. Bylo zjištěno LC_{50} pro koncentraci nižší než 10 mg po 96 hodinách expozice. [21] Na ekotoxicitu byl testován cetirizin a jeho fototransformační produkty. Fototransformační produkt vznikl ozářením UV světlem pod rtuťovou lampou a byl méně toxický vůči bakterii *Vibrio fischeri* než původní sloučenina. Oproti tomu ale vykazoval vyšší toxicitu vůči bakteriím *Pseudomonas putida* než jeho původní neozářená sloučenina. Ozařování UV světlem je nová rutinní metoda pro čištění vod, která není zcela vhodná, jelikož může vést k neúplné degradaci sloučenin a vzniku nežádoucích mikropolutantů. [22]

3.5. Metody bioremediace

Bioremediace je metoda, která využívá vlastností a metabolismu živých organismů k odstranění kontaminantů z životního prostředí. Technologie se provádí buď *in situ* nebo *ex situ*. *In situ* bioremediace probíhá přímo na místě kontaminace, zatím co *ex situ* vyžaduje odebrání kontaminovaného materiálu a převezení materiálu na místo provedení metody. Metoda *ex situ* umožňuje větší kontrolu nad procesem, ale přesun kontaminované půdy je nákladný a zvyšuje nebezpečí dalšího rozšíření kontaminantů. [23] Bioremediace se dělí na dvě hlavní kategorie – mikrobiální remediaci a fytoremediaci.

3.5.1. Mikrobiální remediace

Mikrobiální remediace odstraňuje toxické a jiné kontaminanty z životního prostředí působením různých mikrobiálních systémů jako například bakterií, hub a kvasinek. Metoda se úspěšně využívá k odstranění polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH). [24] V roce 2003 byla řeka Grand Calumet v jihozápadní Indianě z velké části kontaminovaná právě PAH. K účinnému odstranění PAH ze sedimentů řeky byl použit kmen *Mycobacterium flavescens*, který byl izolován za použití pyrenu jako jediného zdroje uhlíku a energie, druhý kmen byl izolován na antracenu. [25]

3.5.2. Fytoremediace

Fytoremediace je proces, který využívá zelených rostlin k odstranění kontaminantů znečišťujících půdu, vodu a vzduch. Remediace není zcela nová myšlenka, výsadba vegetace podél silnic se často využívá k zachycení polutantů ze silničního provozu. [26] Metoda fytoremediace buď kontaminanty přímo rozkládá, nebo je fixuje a akumuluje v různých částech rostliny. Metoda je vhodná například v zemědělství na přípravu půdy ke kultivaci, dále v komerčních, industriálních zónách k remediaci povrchových vod. [27] Fytoremediační procesy se dělí podle použitého mechanismu na fytoextrakci, rhizofiltraci, fyto stabilizaci, rhizodegradaci, fytodegradaci a fytovolatilizaci.

Při **fytoextrakci** jsou kontaminanty z půdy absorbovány kořeny příslušných rostlin a poté dojde k translokaci kontaminantů směrem k nadzemní části rostliny. Sklizení rostlin vede k odstranění kontaminantů. Metoda se využívá zpravidla pro odstranění těžkých kovů, polokovů a radionuklidů. [28]

Při **rhizofiltraci** dochází k adsorpci a precipitaci kontaminantů na kořeny rostlin z proudící vody. Metoda se využívá pro čištění povrchových a odpadních vod obsahujících kovy nebo radionuklidy. [21] S úspěchem se používá například v Černobyli, kde kořeny slunečnic odstraňují isotopy ^{137}Cs a ^{90}Sr z povrchových vod. [28]

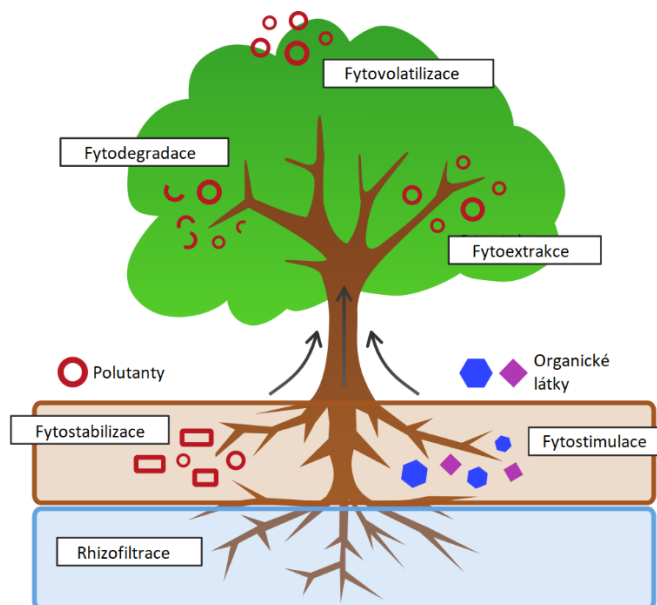
Fytostabilizace využívá rostliny k imobilizaci kontaminantů v půdě a ve vodě. Pomocí adsorpce a absorpce v rhizosféře se snižuje možnost vymývání kontaminantů z půdy a zabraňuje se rozšiřování kontaminantů a jejich vstupu do potravního řetězce. Rostliny svým vzrůstem zabraňují také migraci kontaminantů větrem nebo půdní erozí. Fytostabilizaci lze rovněž spojit s obnovou vegetační pokrývky. [28]

Při **rhizodegradaci** se využívá kořenového systému rostlin, který uvolňuje velké množství exsudátů a enzymů. Tím dochází k stimulaci aktivity půdních bakterií v rhizosféře. Velikost mikrobiální populace je potom mnohonásobně vyšší, a tudíž i dekontaminace je mnohem účinnější. Tímto způsobem se čistí hlavně půda obsahující ropné uhlovodíky a pesticidy. Velkou výhodou této metody je, že se rostliny nemusejí sklízet. [26] [28]

Při **fytovolatilizaci** dochází nejdříve k vstřebání kontaminantů rostlinami a poté k přeměně na těkavé produkty, které jsou následně uvolněny do ovzduší. Metoda se nejvíce osvědčila při odstraňování těkavých organických látek z podzemích vod a půdy. [26] [24]

Při **fytoodegradaci** dochází k degradaci kontaminantů v důsledku metabolických procesů uvnitř rostliny, nebo vně rostlin pomocí enzymů, které jsou rostlinami uvolňovány. Metoda se využívá při dekontaminaci povrchové vody znečištěné organickými látkami, jako jsou výbušniny a chlorovaná rozpouštědla. [21] [29]

Jednotlivé metody jsou zobrazeny na obrázku 6.



Obrázek 6: Fytoremediační techniky [30]

3.5.3. Výhody a nevýhody fytoremediace

Na základě literárních údajů lze shrnout výhody a nevýhody fytoremediační technologie tak, jak je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Výhody a nevýhody fytoremediace [26] [31]

Výhody	Omezení
Velká ekonomická úspora oproti tradičním metodám	Pomalý průběh, metoda závislá na růstu rostlin
Využití energie ze slunečního záření	Schopnost růst ve znečištěné oblasti
Aplikovatelná na širokou škálu kontaminantů	Kontaminanty musí být blízko kořenového systému rostlin
Vznik menšího množství sekundárního odpadu v porovnání s jinými remediačními metodami	Riziko přestupu kontaminantů do potravního řetězce
Stabilizuje půdu, omezuje erozi, redukuje průsaky vody	Rozšíření invazivních rostlinných druhů, ovlivnění ekosystému
Ohleduplná k životnímu prostředí, veřejností dobře přijímána	Limitováno klimatickými a geologickými podmínkami
Plně vyvinuté rostliny fungují jako hydrostatická bariéra, zabraňují šíření kontaminace	Mladá metoda, nutný rozsáhlý výzkum znečištěné lokality

4. Experimentální část

4.1. Přehled použitých chemikálií a přístrojů

Použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled použitých chemikálií (Zdroj: vlastní zpracování)

Použitá chemikálie	Dodavatel	Čistota
Trazodon hydrochlorid	Sigma Aldrich	<99 %
Hydroxyzin dihydrochlorid	Sigma Aldrich	<98 %
H ₃ PO ₄ (85%)	Sigma Aldrich	HPLC grade
SAVO	Unilever ČR	-
Acetonitril	Fisher Scientific	HPLC gradient grade
Methanol	Fisher Scientific	HPLC gradient grade
Na ₂ HPO ₄	Lachner	p.a.

Dále byla použita deionizovaná voda připravená na přístroji Demiwa 3 roi od firmy Watek. Voda sloužila k přípravě médií, roztoků a mobilní fáze. Použité přístroje a jejich způsob využití je popsán v tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled použitých přístrojů a jejich použití (Zdroj: vlastní zpracování)

Název přístroje	Způsob použití
Tlakový hrnec Morphy Richards Rapid Cook	Sterilizace médií a nástrojů
Kahan Fuego SCS pro WLD-TEC	Tepelná sterilizace nástrojů při sadbě rostlin a odebírání vzorků
Laminární box typu FBB 120 (Labox)	Sadba rostlin, odběr vzorků
Zářivky Cool White (40 W/m ²)	Osvětlení kultivací
Automatická pipeta Nichirio (Japonsko)	Příprava roztoků
Mrazicí box Liebherr	Uložení vzorků při -22 °C
Lednice Liebherr	Uložení roztoků při 3 °C
Ultrazvuková lázeň Fisherbrand FB 15050	Odplynění mobilní fáze
Analytické váhy Adam AFA-180LC	Vážení léčiv pro zásobní roztoky
Předvážky Adam AQT-600	Vážení rostlin po ukončení kultivace
Centrifuga Spectrafuge™ 16M	Zbavení vzorků pevných částic
Stříkačka 50 µl SYR N	Dávkování vzorku do HPLC
UV detektor Shimadzu SPD – M20A	UV detekce při HPLC analýze
Dávkovací kohout Rheodyne 7161 20 µl	Dávkování vzorku na kolonu
Kolona Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 5µm, rozměry 4,6×150 mm	HPLC analýza
Předkolona Watrex C18	HPLC analýza
Chromatografický software Clarity (DataApex)	Vyhodnocení výsledků

4.2. Použité rostliny a médium

Fytoextrakce trazodonu a hydroxyzinu byla provedena na rostlinách kukuřice seté (*Zea mays*). Konkrétně se jednalo o odrůdu DKC 4014, která byla poskytnuta firmou Monsanto ČR. Semena rostlin byla kultivována na médiu dle Murashiga a Skooga. [32] Složení média je uvedeno v tabulce 4. Chemikálie pro přípravu média byly použity v čistotě p.a..

Tabulka 4 : Složení média

Chemikálie	Koncentrace [mg/L]
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370
Na ₂ -EDTA	37,3
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 4 H ₂ O	8,6
KI	0,83
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25

4.3. Postup práce

Následující pododdíly popisují postup při experimentální části práce. Nejdřív je popsán postup při přípravě sterilních kultivací rostlin *Zea mays*, dále jsou uvedeny kroky při přidávání léčiv, odebrání vzorků a následná likvidace rostlin po ukončení kultivace. Nakonec je popsán postup práce se vzorky při analýze HPLC.

4.3.1. Kultivace rostlin *Zea mays*

Semena kukuřice byla nejdříve odmaštěna po dobu 1 minuty v 70% ethanolu. Poté byla semena sterilizována po dobu 10 minut v 20% roztoku SAVA a dalších 20 minut v 5% roztoku SAVA. Takto sterilizovaná semena byla následně ještě promyta 4×100 ml sterilní destilovanou vodou za sterilních podmínek. V laminárním boxu bylo do každé 500 ml Erlenmeyerovy baňky, které obsahovaly 15 ml sterilního média, vložena 4 sterilizovaná semena kukuřice. Baňky byly poté uzavřeny hliníkovou fólií. Po

dobu růstu byly rostliny ponechány v kultivační místnosti s teplotou 26 °C při světelném režimu 16 hodin světlo a 8 hodin tma ve vzdálenosti 40 cm od zářivek (White cool, Phillips, 40 W/m²). Po osmi dnech bylo za sterilních podmínek přidáno 10 ml čerstvého média, jelikož rostliny původní médium spotřebovaly. Příklad kultivace rostliny je uveden na obrázku 7.



Obrázek 7: Kultivace sterilní kukuřice seté (Zdroj: vlastní fotografie)

4.3.2. Přidání léčiva a odebírání vzorků

Po jedenácti dnech byla k rostlinám přidána léčivem kontaminovaná média. Nejdříve byly připraveny zásobní vodné roztoky léčiv o koncentraci 1 g/L. V laminárním boxu bylo z baněk odlito původní médium, a bylo nahrazeno 100 ml nového sterilního média. Následně bylo automatickou pipetou přidáno takové množství zásobního roztoku, aby byla výsledná koncentrace léčiva v kultivačním médiu 10 mg/L. Zásobní roztok byl přidáván tak, aby nedošlo ke kontaminaci nadzemní části rostlin. Poté bylo injekční stříkačkou odebráno cca 0,7 ml vzorku pro stanovení výchozí koncentrace léčiva v kultivacích. Baňky byly opět uzavřeny hliníkovou fólií. Současně byla provedena kontrolní kultivace, která byla identická s předchozími ale bez přítomnosti rostliny. Stejným způsobem bylo postupováno pro koncentraci 5 mg/L.

Rostliny i kontrolní kultivace byly umístěny zpět do kultivační místnosti. Následujících 8 dnů byly v laminárním boxu pomocí injekční stříkačky ve 24hodinových intervalech odebírány vzorky média. Vzorky byly zamrazeny a uchovány v mrazícím boxu.

4.3.3. Zpracování rostlin po ukončení kultivace

Osmý den, kdy byl proveden poslední odběr vzorku média, byla kultivace rostlin ukončena. Rostliny byly vyňaty z baněk a omyty destilovanou vodou. Separátně byla zvážena kořenová a listová část rostliny. Rostliny byly poté ponechány v mrazícím boxu pro další experimenty.

4.3.4. HPLC analýza

Vzorky byly před analýzou zbaveny pevných částic centrifugací po dobu 10 minut (14000 rpm, 50 mm rotor). Poté byl vzorek pomocí stříkačky aplikován do dávkovacího ventilu s objemem dávkovací smyčky 20 μ l. HPLC analýza byla provedena na HPLC systému sestaveného z přístrojů uvedených v tabulce 3. Podmínky pro stanovení koncentrace trazodonu a hydroxyzinu byly experimentálně určeny tak, aby signál stanovované látky byl oddělen od píků složek média a vyloučených metabolitů rostlin.

Vhodná mobilní fáze pro určení koncentrace trazodonu byla připravena v poměru acetonitril: deionizovaná voda: kyselina trihydrogenfosforečná (85%) 35:65:0,01 (v/v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml.min⁻¹, UV detekce probíhala při 247 nm.

Mobilní fáze pro stanovení koncentrace hydroxyzinu byla připravena v poměru acetonitril: hydrogenfosforečnan disodný (0,01 M) 4:6 (v/v) při pH=7,5. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,8 ml.min⁻¹, UV detekce probíhala při 220 nm.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Provedení kalibrace

Kalibrace trazodonu a hydroxyzinu byla provedena s roztoky o koncentracích 1; 2,5; 5; 10 a 15 mg/L léčiva rozpuštěného v destilované vodě. V programu Clarity DataApex byla poté, přiřazením kalibrace k příslušnému píku, stanovena koncentrace daného léčiva v médiu.

Dále byly vypočteny hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro obě léčiva. Pro trazodon LOD činila 0,04 mg/L a LOQ 0,12 mg/L. Pro hydroxyzin byly stanoveny LOD na 0,22 mg/L a LOQ na 0,74 mg/L.

5.2. Trazodon

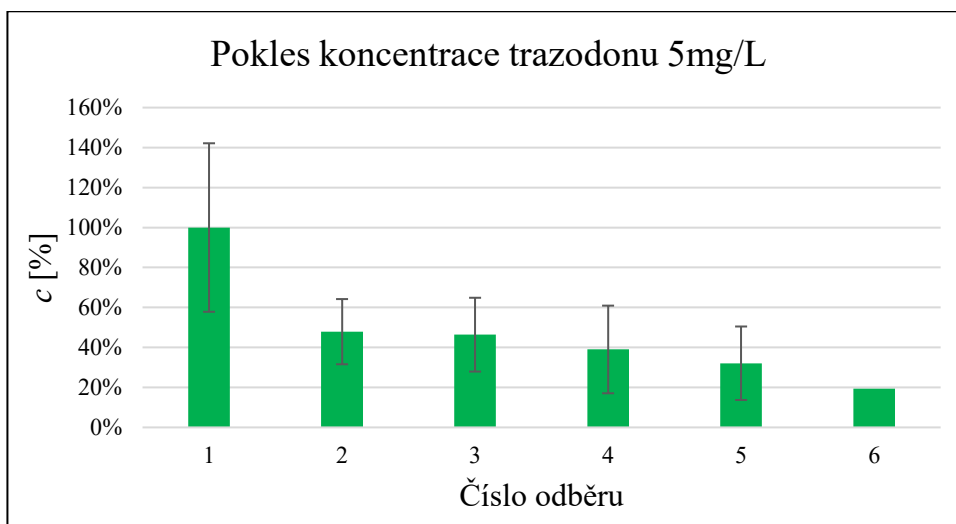
Na začátek je důležité poznamenat, že při práci s rostlinami, tedy s biologickým materiálem, může docházet v rámci biodiverzity k velkým rozdílům množství sorbovaného léčiva u jednotlivých kultivací. Nelze také zajistit stejnou hmotnost rostlinné biomasy v jednotlivých kultivacích, což rovněž produkuje rozdíly výsledků v jednotlivých kultivačních nádobách. Získaná data se proto obvykle uvádějí jako průměrné hodnoty.

Fytoextrakce trazodonu byla provedena celkem s 9 vzorky kultivací kukuřic s tím, že 4 vzorky kultivace měly koncentraci trazodonu 10 mg/L a 5 vzorků koncentraci 5 mg/L. Během odebrání vzorků se objevila v některých kultivacích zjevná kontaminace plísní, tyto kultivace byly zlikvidovány a dále nebyly vyhodnocovány. V tomto smyslu byla třetí den odběru zlikvidována jedna kultivace s koncentrací 5 mg/L, šestý den odběru byly zlikvidovány 2 kultivace s koncentrací 5 mg/L a 2 kultivace s koncentrací 10 mg/L.

Při experimentu s 5 vzorky rostlin s počáteční koncentrací 5 mg/L byl vyhodnocen průměr koncentrací trazodonu pouze u tří vzorků. U dalších dvou vzorků byl pokles koncentrace minimální a nebyl zahrnut do grafu.

Graf 1 ukazuje časovou závislost poklesu koncentrace v procentech počáteční koncentrace léčiva u třech kultivací pro roztok o koncentrací 5mg/L v kultivačním

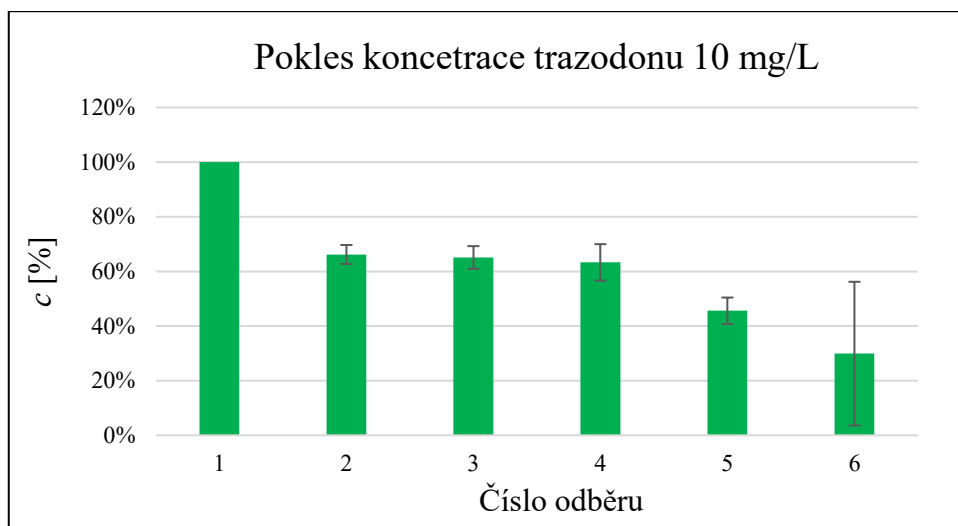
médiu. Reálná počáteční koncentrace byla stanovena jako průměr prvního odběru u třech kultivací a měla hodnotu 6,4 mg/L. Vyšší počáteční koncentrace oproti teoretické může být způsobená částečným odpařením médií při sterilizaci, jelikož baňky byly uzavřeny pouze hliníkovou fólií.



Graf 1: Průměrný pokles hodnot koncentrace vyjádřené v % výchozí koncentrace třech kultivací trazodonu pro počáteční koncentraci 5 mg/L. Číslo odběru odpovídá úseku času od přidání roztoku léčiva do odebrání vzorku: 1 = 0 hod, 2 = 24 hod, 3 = 48 hod, 4 = 72 hod, 5 = 96 hod, 6 = 168 hod. Poslední odběr proveden pouze u jednoho vzorku.

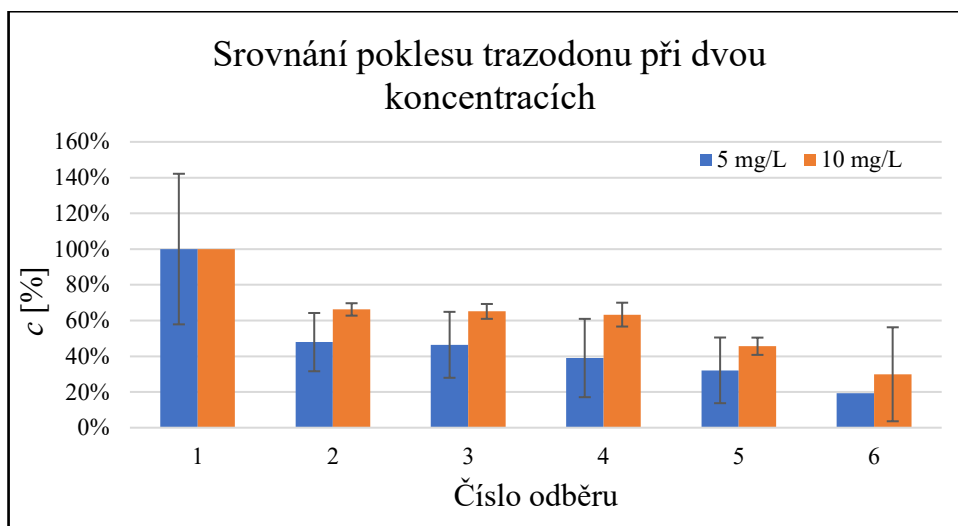
V druhém odběru, tedy po 24 hodinách, došlo k úbytku koncentrace na 48 % oproti počáteční. Po 48 hodinách došlo k úbytku na 46 % oproti počáteční koncentraci ale pokles koncentrace oproti druhému odběru byl pouze o 1,5 %. Při čtvrtém odběru, tedy po 72 hodinách, došlo k poklesu koncentrace oproti počáteční na 39 %. Pátý odběr po 96 hodinách zaznamenal pokles koncentrace na 32 % z původní hodnoty. Šestý odběr, který byl proveden osmý den, tedy po 168 hodinách od prvního odběru, měl koncentraci 19 % oproti původní hodnotě počáteční koncentrace.

Graf 2 znázorňuje časovou závislost poklesu koncentrace v procentech počáteční koncentrace léčiva pro vstupní koncentraci trazodonu 10 mg/L.



Graf 2: Průměrný pokles hodnot koncentrace vyjádřené v % výchozí koncentrace čtyř kultivací trazodonu pro počáteční koncentraci 10 mg/L. Číslo odběru odpovídá úseku času od přidání roztoku léčiva do odebrání vzorku: 1 = 0 hod, 2 = 24 hod, 3 = 48 hod, 4 = 72 hod, 5 = 96 hod, 6 = 168 hod. Počáteční koncentrace definovaná jako 10 mg/L.

Po prvních 24 hodinách, došlo k poklesu koncentrace trazodonu v médiu na 66 % z počáteční hodnoty. Po 48 hodinách klesla koncentrace na 65 % počáteční koncentrace. Pokles koncentrace oproti druhému odběru byl pouze o 1 %. Po 72 hodinách došlo k poklesu koncentrace oproti počáteční na 63 %, oproti předešlému odběru je pokles pouze o 2 %. Odběr po 96 hodinách zaznamenal pokles koncentrace na 46 % z původní hodnoty, pokles koncentrace oproti čtvrtému dnu byl o 19 %. Šestý odběr, který byl proveden osmý den, tedy po 168 hodinách od prvního odběru, měl koncentraci 30 % oproti původní hodnotě počáteční koncentrace.



Graf 3: Srovnání průměrných hodnot poklesů koncentrace trazodonu vyjádřené v % výchozí koncentrace pro počáteční koncentrace 5 mg/L a 10 mg/L. Číslo odběru odpovídá úseku času od přidání roztoku léčiva do odebrání vzorku: 1 = 0 hod, 2 = 24 hod, 3 = 48 hod, 4 = 72 hod, 5 = 96 hod, 6 = 168 hod. Absence chybových úseček viz graf 1,2.

V grafu 3 je znázorněno srovnání poklesů koncentrace trazodonu při dvou koncentracích. Koncentrace trazodonu při obou počátečních koncentracích klesala každým dnem. Po prvních 24 hodinách byl zaznamenán největší úbytek léčiva z média, pro koncentraci 5 mg/L to byl pokles o 52 % a u koncentrace 10 mg/L o 34 %, zatímco další dny byl už pokles mnohem menší. Tento jev jde vysvětlit tak, že při prvním dnu došlo k záchytu velkého množství xenobiotika, které pro rostlinu působí stresově a po určitou dobu mohla být snížena schopnost dekontaminace. Významnou roli může hrát i primární adsorpce xenobiotika na povrch kořenů a postupné ustanovování rovnováhy mezi sorbovanou a rozpuštěnou látkou.

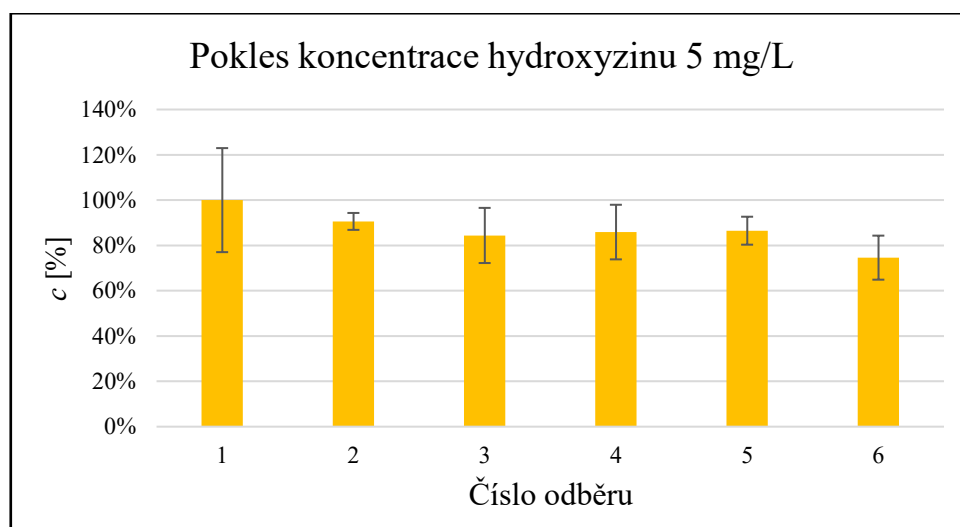
Hodnoty poklesu koncentrace při posledním odběru jsou u obou experimentů podobné, blíží se poklesu o 70-80 % z počáteční hodnoty koncentrace. V bakalářské práci mé předchůdkyně byla také sledována účinnost extrakce trazodonu. V jejím případě došlo k poklesu o 50 % z původní koncentrace léčiva. [33] Rozdíl ve fytoextrakční účinnosti je nejspíše dán použitím jiného kultivaru kukuřice a účinnost extrakce je zjevně závislá na množství produkované biomasy a velikosti kořenového systému.

5.3. Hydroxyzin

V případě hydroxyzinu byl experiment proveden celkem na 13 rostlinách, k 7 rostlinám bylo přidáno léčivo o koncentraci 10 mg/L a k 6 kultivacím bylo přidáno léčivo o koncentraci 5mg/L. Při procesu odebrání vzorků došlo u některých kultivací k napadení plísní. Tyto kultivace nebyly dále vyhodnocovány. Konkrétně se jednalo o jednu kultivaci s koncentrací 10 mg/L při pátém odběru. Šestý odběr, který byl proveden osmý den, tedy po 168 hodinách, byl odebrán už pouze u jedné kultivace. Pro koncentraci 5 mg/L byla pozastavena jedna kultivace při čtvrtém odběru a dvě kultivace při šestém odběru.

Počáteční koncentrace byly stanoveny z prvního odběru a měly hodnoty 5,2 mg/L a 10,5 mg/L. Zvýšená počáteční koncentrace oproti teoretické mohla být opět způsobena částečným odpařením médií při sterilizaci.

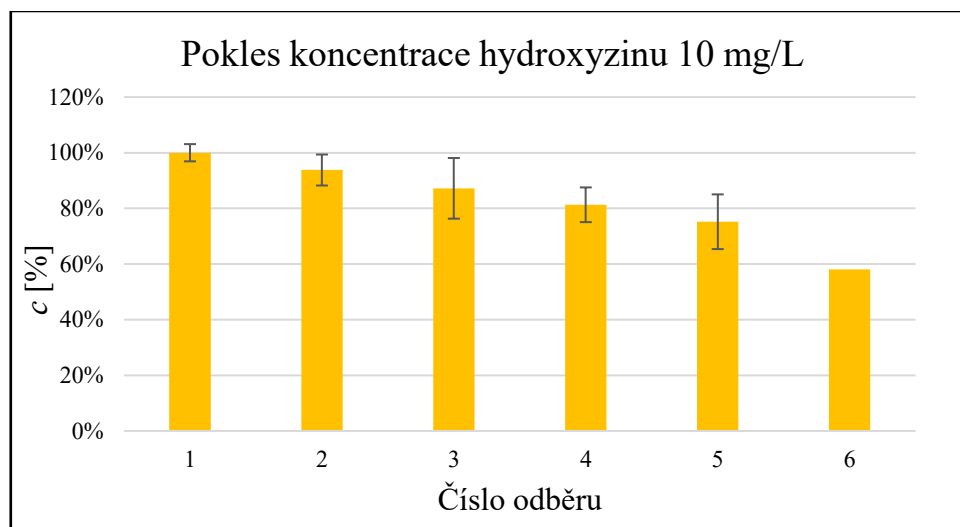
V grafu 4 je znázorněn pokles koncentrace v procentech počáteční koncentrace léčiva pro roztok hydroxyzinu o koncentraci 5 mg/L.



Graf 4: Průměrný pokles hodnot koncentrace vyjádřené v % výchozí koncentrace šesti kultivací hydroxyzinu pro počáteční koncentraci 5 mg/L. Číslo odběru odpovídá úseku času od přidání roztoku léčiva do odebrání vzorku: 1 = 0 hod, 2 = 24 hod, 3 = 48 hod, 4 = 72 hod, 5 = 96 hod, 6 = 168 hod.

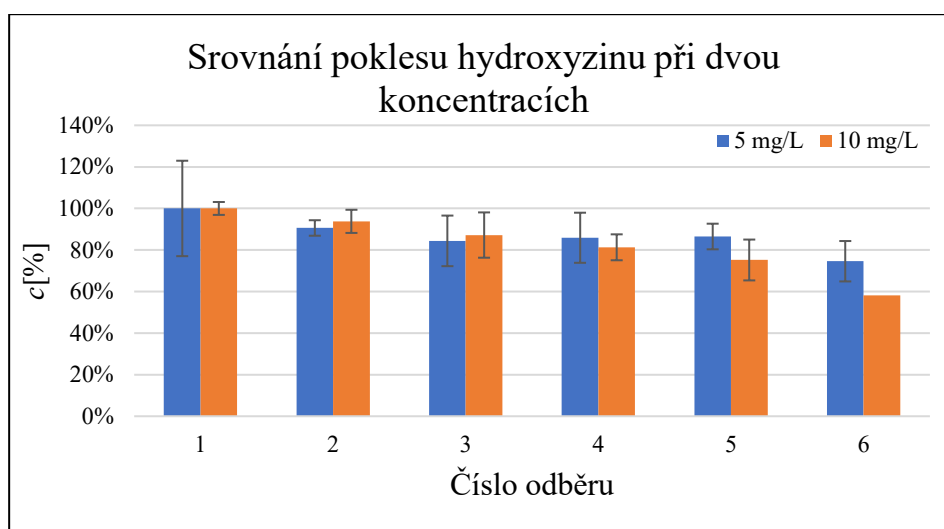
Koncentrace hydroxyzinu pro počáteční koncentraci 5 mg/L po prvních 24 hodinách poklesla na 91 % z původní hodnoty. Při dalším odběru, tedy po 48 hodinách byl zaznamenán pokles na hodnotu 84 %. Při čtvrtém a pátém odběru došlo k mírnému nárůstu koncentrace přibližně o hodnotu 1–2 % oproti předešlému dnu. Šestý odběr, který byl proveden po 168 hodinách, měl hodnotu koncentrace 75 %.

Následující graf 5 znázorňuje pokles koncentrace v procentech počáteční koncentrace léčiva pro roztok hydroxyzinu o koncentraci 10 mg/L.



Graf 5: Průměrný pokles hodnot koncentrace vyjádřené v % výchozí koncentrace pro 7 kultivací hydroxyzinu pro počáteční koncentraci 10 mg/L. Číslo odběru odpovídá úseku času od přidání roztoku léčiva do odebrání vzorku: 1 = 0 hod, 2 = 24 hod, 3 = 48 hod, 4 = 72 hod, 5 = 96 hod, 6 = 168 hod. Poslední odběr proveden pouze u jednoho vzorku.

Koncentrace léčiva kontinuálně klesala každých 24 hodin o přibližnou hodnotu 6 %. Mezi pátým a šestým odběrem byl časový úsek 72 hodin, přičemž koncentrace klesla o 17 %. Po 168 hodinách byl zaznamenán celkový pokles o 42 % z původní hodnoty. Tento pokles byl zaznamenán pouze u jedné kultivace, zbylé kultivace byly napadeny plísní a nebyly vyhodnocovány.

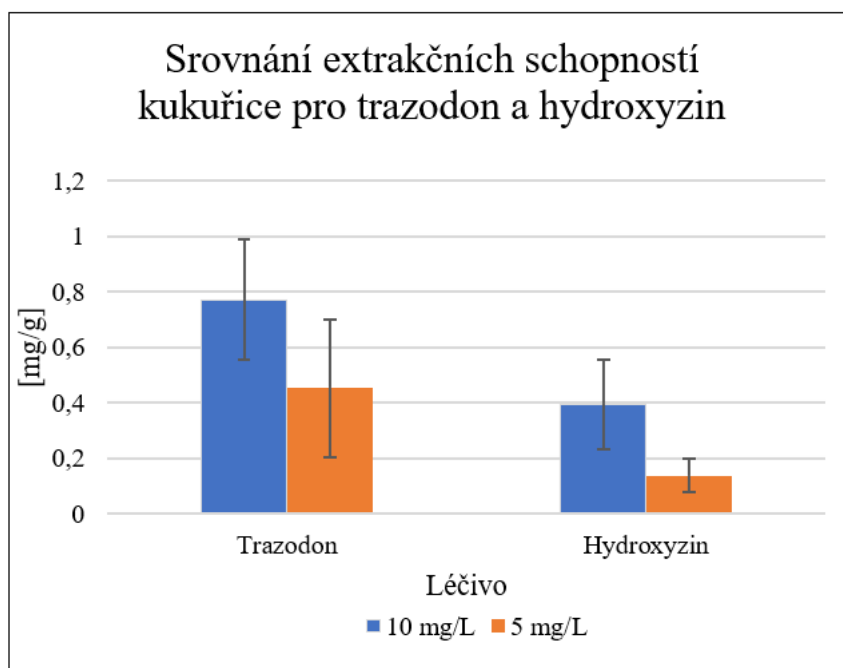


Graf 6: Srovnání průměrných hodnot poklesů koncentrace hydroxyzinu vyjádřené v % výchozí koncentrace pro počáteční koncentrace 5 mg/L a 10 mg/L. Číslo odběru odpovídá úseku času od přidání roztoku léčiva do odebrání vzorku: 1 = 0 hod, 2 = 24 hod, 3 = 48 hod, 4 = 72 hod, 5 = 96 hod, 6 = 168 hod. Absence chybové úsečky viz graf 5.

Graf 6 znázorňuje schopnost fytoextrakce hydroxyzinu rostlinami kukuřice seté při dvou různých počátečních koncentracích. Při počáteční koncentraci 10 mg/L koncentrace léčiva v médiu kontinuálně klesala, zatímco u počáteční koncentrace 5 mg/L došlo při čtvrtém a pátém odběru k mírnému nárůstu. Tento nárůst je statisticky nevýznamný a může být způsoben přechodnou změnou metabolické aktivity v důsledku abiotického stresu, nebo došlo k odumření části kořenové hmoty s následným uvolněním adsorbovaného i absorbovaného hydroxyzinu. Po 168 hodinách nedošlo ani k 50% poklesu původní koncentrace. Hydroxyzin obsahuje polární hydroxyskupinu, která na jedné straně může napomáhat adsorpčním jevům, na straně druhé však zvyšuje rozpustnost sloučeniny v kultivačním médiu, a tak snižuje její afinitu k povrchu kořenové tkáně.

5.4. Srovnání schopnosti záchytu léčiv rostlinami kukuřice seté

Následující graf znázorňuje schopnost záchytu studovaných psychofarmak. V grafu 7 jsou vyneseny hmotnosti extrahovaného léčiva při dvou různých počátečních koncentracích za 168 hodin experimentu vztažené na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny.



Graf 7: Průměrné množství léčiva v mg, které byla rostlina schopna zachytit z média po 168 hodinách vztažené na 1 g čerstvé hmotnosti rostlinné biomasy.

Na grafu 7 můžeme vidět, že trazodon byl rostlinou ukládán ochotněji než hydroxyzin při obou počátečních koncentracích. Trazodon je vysoce lipofilní látka [34] a tudíž dochází k jeho sorpci z vodného prostředí na rostlinu mnohem intenzivněji. Mezi další vlastnosti, které ovlivňují sorpční procesy rostlin a těkavost sloučenin z vodného prostředí je rozpustnost léčiva ve vodě. [35] Zatímco trazodon hydrochlorid má rozpustnost 50 mg/ml, hydroxyzin dihydrochlorid má rozpustnost 700 mg/ml, a tudíž je z vodného prostředí rostlinou extrahován značně neochotně.

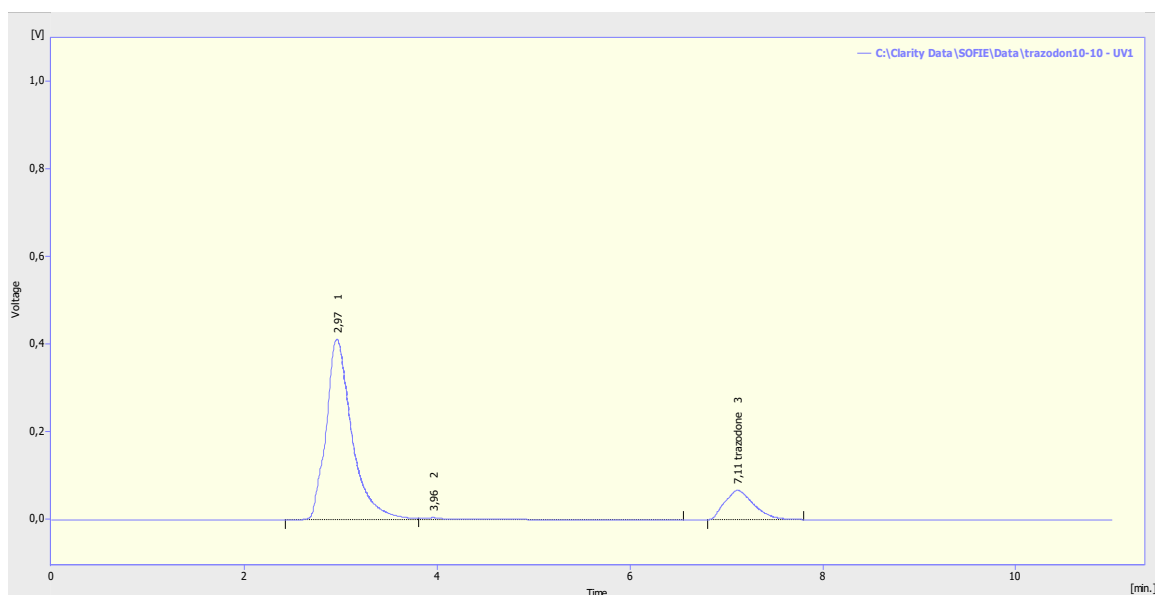
Další fyzikálně chemická vlastnost, která může mít vliv na schopnost extrakce je $\log K_{ow}$. Hodnota $\log K_{ow}$ pro trazodon je 3,21 a pro hydroxyzin 2,36. To opět naznačuje, že je trazodon více hydrofobní než hydroxyzin a proto je rostlinou sorbován

ve větším množství. Další variantou je srovnání fytoextrakčních procesů s hodnotami pK_a . Použití tabelovaných hodnot však neukazuje na jednoznačnou souvislost.

Při experimentech s trazodonem a hydroxyzinem nedošlo k úplné extrakci léčiva z kultivačních médií, nicméně při fytoimediační technologii se předpokládá dosažení limitní nenulové konečné koncentrace, která je závislá mimo jiné i na délce kultivace. V modelovém systému, který byl použit však úhyn rostliny fytoextrakční proces zastaví.

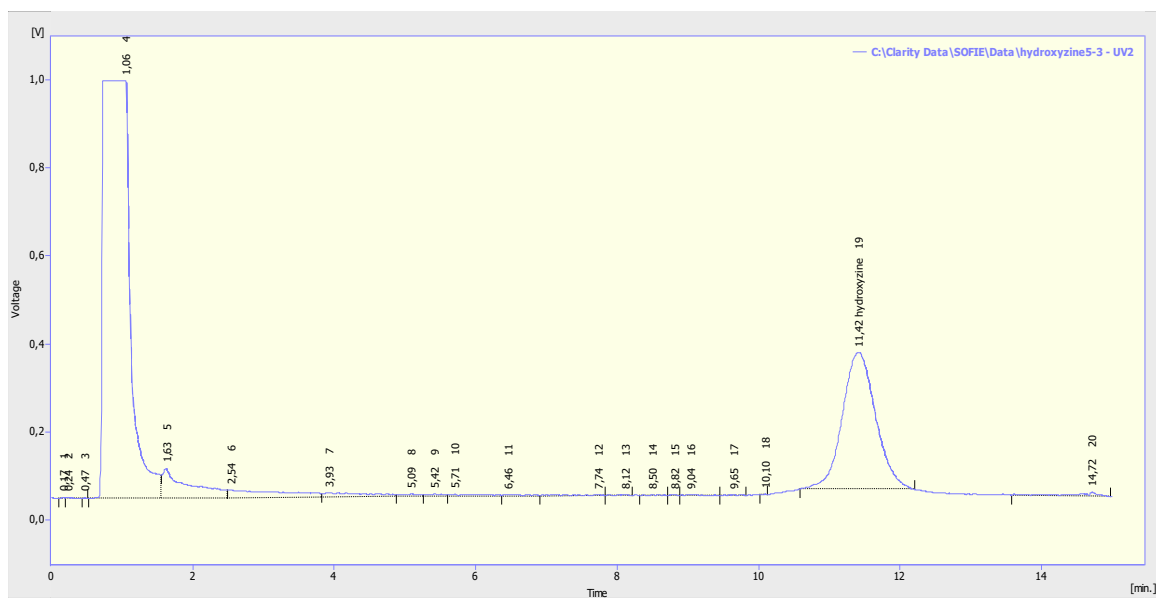
5.5. Příklady chromatogramů

Na obrázku 8 je znázorněn příklad chromatogramu pro stanovení trazodonu. První pík odpovídá složkám média, druhý pík s retenčním časem 7.11 min odpovídá koncentraci trazodonu 9,77 mg/L.



Obrázek 8: Příklad chromatogramu pro stanovení koncentrace trazodonu v odebraných vzorcích.

Na obrázku 9 je zobrazen chromatogram pro stanovení koncentrace hydroxyzinu. Pík s retenčním časem 1,06 minut odpovídá složkám média a pík s retenčním časem 11,42 minut odpovídá hydroxyzinu o koncentraci 5,2 mg/L.



Obrázek 9: Příklad chromatogramu pro stanovení koncentrace hydroxyzinu v odebraných vzorcích.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo určit, zda použití fytoimediační metody, konkrétně fytoextrakce, je účinná cesta pro eliminaci léčiv trazodonu a hydroxyzinu z životního prostředí. Druhým nezanedbatelným cílem bylo posouzení možnosti kontaminace potravních řetězců v důsledku absorbovaného a translokovaného kontaminantu.

I když obě léčiva jsou v organismu vysoce metabolizována, pouze 0,8 % hydroxyzinu a 1 % trazodonu je z těla vyloučeno v původní podobě, jejich vysoká biologická aktivita by při kontaminaci potravních řetězců mohla ohrožovat či ovlivňovat vodní i suchozemské organismy především v oblasti chování a reprodukce.

Účinnost fytoextrakce pro trazodon pro obě počáteční koncentrace 10 mg/L a 5 mg/L po 168 hodinách dosáhla hodnoty mezi 70-80 %. Po prvních 24 hodinách byl zaznamenán největší pokles koncentrace, další dny byl pokles už jen minimální.

Pro léčivo hydroxyzin byla účinnost fytoextrakce nižší a pro počáteční koncentrace 10 mg/L a 5 mg/L po 168 hodinách měla hodnotu mezi 25-40 %.

Při určení hmotnosti extrahovaného léčiva z média na 1 g rostlinné biomasy bylo stanoveno, že trazodon byl sorbován v dvakrát větším množství v porovnání s hydroxyzinem.

Rostliny jsou zjevně schopny extrahovat látky chemické struktury typu trazodonu i hydroxyzinu a mohou být využity v rámci fytoimediačních technologií, na druhé straně je však na místě obezřetnost při pěstování užitkových rostlin v oblastech s možnou kontaminací uvedenými látkami, ať již v půdě či ve formě závlahové vody nebo hnojení odpadními kaly z ČOV, neboť výsledky práce ukazují na zjevnou možnost přítomnosti těchto polutantů v jejich tkáních.

7. Literatura

- [1] Touraud, E.; Roig, B.; Sumpter J. P.; Coetsier C.: Drug residues and endocrine disruptors in drinking water: Risk for humans?. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **214**, 437-41 (2011).
- [2] Fatta, D.; Nikolaou, A.; Achilleos, A.; Meric, S.: Analytical methods for tracing pharmaceuticals residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry* **26**, 515-533 (2007).
- [3] Szu.cz: *Výskyt a zdravotní rizika zbytků humánních léčiv v pitných vodách*
Dostupné z URL:
<http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr_leciva/GACR_leciv_a_zakladni_informace.pdf>
[cit. 24.02.2019].
- [4] Calisto, V.; Esteves, V. I.: Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* **77**, 1257-1274 (2009).
- [5] Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Hodnocení vývoje distribuce vybrané skupiny léčivých přípravků*.
Dostupné z URL:
<<http://www.sukl.cz/hodnoceni-vyvoje-distribuce-vybrane-skupiny-lecivych-12>>
[cit. 24.02.2019].
- [8] Trachtová, Z.; Boček, J.: *Spotřeba psychofarmak se za 25 let zvedla šestinásobně. 'V pořádku, jen pozor na starší generaci léků,' říká psychiatr.*
Dostupné z URL:
<https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/psychiatr-uzkost-deprese-antidepressiva-spotreba-leciv-martin-anders_1811080630_jab>
[cit. 24.02.2019].

- [9] Bartrons, M.; Penuelas, J.: Pharmaceuticals and personal-care products in plants. *Trends in Plant science* **22**, 194-203 (2017).
- [10] Kummerer, K.: *Pharmaceuticals in the environment Source, Fate, Effects and Risks*. 3rd edition. Hiedelberg, Springer 2008.
- [11] Švihovec, J. a kol.: *Farmakologie*. Praha, Grada Publishing 2018.
- [12] Schatzberg, A. F.; Nemeroff, C. B.: *The American Psychiatric publishing textbook of psychopharmacology*. 4th edition, Arlington, American Psychiatric Association Publishing 2017.
- [13] Pallazo, G.: Chemistry of trazodone. *Current Therapeutic Research* **15**, 745–748 (1973).
- [14] Slíva, J.; Votava, M.: *Farmakologie*. Praha, Triton 2011.
- [15] Khouzam, H. R.; A review of trazodone use in psychiatric and medical conditions. *Postgraduate Medicine* **129**, 140-148 (2016).
- [16] Mohr, P.: *Klinická Psychofarmakologie*. Praha, Maxdorf 2017.
- [17] Ebi.ac.uk: *Trazodone hydrochloride*
- Dostupné z URL:
- <<https://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebiId=CHEBI:9655&treeView=true#vizualisation>>
- [cit. 24.02.2019].
- [18] Reichl, B.; Himmelsbach, M.; Emhofer, L.; Klampfl, Ch. W.; Buchberger, W.: Uptake and metabolism of the antidepressants sertraline, clomipramine, and trazodone in garden cress (*Lepidium sativum*) model. *Electrophoresis* **39**, 9-10 (2018).
- [19] Ferreri, M; Hantouche E.G.: Recent clinical trial of hydroxyzine in generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **393**, 102-108 (1998).

- [20] Drugbank.ca: *Hydroxyzine*
Dostupné z URL:
< <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00557>>
[cit. 24.02.2019].
- [21] Li, M. H.: Acute toxicity of 30 pharmaceutically active compounds to freshwater planarians, *Dugesia japonica*. *Toxicological and Environmental chemistry* **95**, 1157-1170 (2013).
- [22] Bergheim, M.; Gminski, R.; Spangenberg, B.; Dębiak, M.; Bürkle, A.; Mersch-Sundermann, V.; Kümmerer, K.; Gieré, R.: Recalcitrant Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Comparative Screening Study of Their Occurrence, Formation of Phototransformation Products and Their in Vitro Toxicity. *Environmental Chemistry* **11**, 431-444 (2014).
- [23] Brown, L.D.; Cologgi, D.L.; Gee, K.F.; Ulrich A.C.: Bioremediation of oil spills on land. In: *Oil spill science and technology*. M. Fingas (Ed.). 2nd edition. Boston, Gulf Professional Publishing, 2017, p. 699-729.
- [24] Ingle, A. P.; Seabra, A.B.; Duran, N.; Rai, M.: Nanoremediation: A new and emerging technology for the removal of toxic contaminant from environment. In: *Microbial biodegradation and bioremediation*. S. Das (Ed.). Elsevier Inc., 2014, p. 233-250.
- [25] Dean-Ross, D.: Use of PAH-degrading bacteria in bioremediation of PAH-contaminated sediments. In: *Proceedings of Second International Symposium on Contaminated Sediments*. Quebec City, 2003, p. 252-257.
- [26] Vaněk, T.; Soudek, P.; Podlipná, R.; Petrová, Š., Landa, P.: *Fytoremediace a možnosti její aplikace*. Praha, Středisko společných činností AV ČR, 2017.
- [27] Rungwa, S.; Arpa, G.; Sakulas, H.; Harakuwe, A.; Timi, D.: Phytoremediation – An Eco-Friendly a Sustainable Method of Heavy Metal Removal from Closed Mine environments in Papua New Guinea. *Procedia Earth and Planetary Science* **6**, 269-277 (2013).

- [28] Soudek, P.; Petrová, Š.; Benešová, D.; Kotyza J.; Vaněk T.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinku. *Chemické listy* **102**, 346-352 (2008).
- [29] U.S. Environmental Protection Agency: *Introduction to Phytoremediation*
Dostupné z URL:
<<http://www.clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>>
[cit. 24.02.2019].
- [30] Phytoremediation
Dostupné z URL:
<https://en.wikipedia.org/wiki/Phytoremediation#/media/File:Phytoremediation_Process_-_svg.svg>
[cit. 24.02.2019].
- [31] Chandra, R.; Saxena G.; Kumar V.: Phytoremediation of Environmental Pollutants: An Eco-Sustainable Green Technology to Environmental Management. In: *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*. R. Chandra (Ed.). Boca Raton, CRC Press, 2015, p. 1-29.
- [32] Murashige T.; Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473-497(1962).
- [33] Hatasová, N.: *Fytoextrakce vybraných farmak*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, ČR (2016).
- [34] O'Neil, M.J. (Ed.): *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013, p.1775.
- [35] Chmiel, T.; Mieszkowska, A.; Kempieńska-Kupczyk, D.; Kot-Wasik, A.; Namieśnik, J.; Mazerska, Z.: The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components. *Microchemical Journal* **146**, 393-406 (2019).