

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické a jaderné chemie
Klinická a toxikologická analýza

Fytoextrakce ibuprofenu ve vodných roztocích

Diplomová práce

Praha 2007

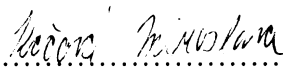
Bc. Miroslava Kočová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc.Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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 24.4.2007


.....
podpis

Předmětová slova: Organická chemie, fytoextrakce, HPLC, TLC

Klíčová slova: Fytoextrakce, Ibuprofen, Analgetika, Antiflogistika, PPCPs

Obsah:

Prohlášení	2
Předmětová a klíčová slova.....	3
Obsah	4
Seznam zkratk.....	6
1 Úvod	7
2 Farmaka a jejich výskyt v životním prostředí	8
2.1 Analgetika.....	8
2.2 Ibuprofen	10
2.3 Výskyt farmak v životním prostředí.....	12
2.4 Distribuce farmak.....	14
2.5 PPCPs – Pharmaceutical and personal care produkts	14
3 Remediacce – odstranění xenobiotik ze životního prostředí	16
3.1 Fytoremediace	16
3.1.1 Fytoextrakce.....	17
3.1.2 Fytovolatilizace.....	18
3.1.3 Rhizofiltrace	17
3.1.4 Fytodegradace	18
4 Metabolismus xenobiotik v ekosystému	20
4.1 I. fáze biotransformace.....	21
4.2 II. fáze biotransformace	21
4.3 III. fáze – kompartmentace.....	22
5 Cíl práce.....	23
6 Experimentální část.....	24
6.1 Použité chemikálie a přístroje	24
6.2 Kultivace rostlin.....	25
6.3 Fytoextrakční experimenty	27
6.3.1 HPLC analýza roztoků ibuprofenu v kultivačním mediu	27
6.3.2 Fytoextrakce ibuprofenu.....	27
6.3.3 Izolace produktů biotransformace ibuprofenu.....	28

6.3.3.1 Izolace z rostlin	28
6.3.3.2 Izolace z media	28
6.3.3.3 Analýza extraktů.....	28
7 Výsledky a diskuse.....	30
8 Závěr	40
9 Použitá literatura	41

Seznam zkratek:

ATP	adenosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
EC ₅₀	efektivní účinná koncentrace, kde reaguje 50% jedinců ze souboru
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IBU	ibuprofen
MFO	oxygenasa se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
MS	kultivační medium (Murashige-Skoog)
NSAID	nesteroidní protizánětlivé látky
PPCPs	Pharmaceutical and personal care products (léčiva a produkty osobní péče)
SPE	extrakce tuhou fází
TLC	tenkovrstevná chromatografie
UV	ultrafialový

1 Úvod

Lidé se od nepaměti snaží pomáhat nemocnému člověku i zvířeti podáváním různých léků. S postupným rozvojem vědy a techniky dochází k objevu a následné výrobě velkého množství farmak a k hledání dalších, nových a ještě účinnějších biologicky aktivních substancí. Tento trend však bezprostředně souvisí se vstupem farmak a jejich metabolitů do ekosystému. Pozitivní působení ve smyslu zvýšení zdraví populace či zvýšení komfortu pacientů s sebou přináší zároveň značné riziko pro životní prostředí, protože vstup farmak a jejich metabolitů vylučovaných převážně močí představuje výraznou kontaminaci především komunálních odpadních vod více či méně biologicky aktivními substancemi. Diskutované látky se nevyskytují v příliš vysokých koncentracích, nicméně představují trvalou a stále se zvyšující kontaminaci s možným a velmi pravděpodobným vstupem do potravních řetězců.

Léčiva se v současné době řadí do skupiny látek označovaných souborně jako PPCPs (pharmaceutical and personal care products). Jsou to látky, které primárně mohou, ale nemusí vykazovat biologickou aktivitu, nicméně při dlouhodobém působení ovlivňují fyziologické pochody vyšších organismů, v případě léčiv mnohdy i jinak než je jejich primární indikace. Uvedené látky působí jak v aquatickém, tak i následně v terestriálním ekosystému. Mnohé z nich působí jako endokrinní dysharmonizátory a jsou velmi obtížně odstraňovány z odpadních a povrchových vod.

V posledních letech je věnována pozornost k možnostem jejich odstraňování a dekontaminaci zasažených ploch. Jedním z možných způsobů je biologická dekontaminace. Tyto způsoby jsou levnější, přirozenější a v řadě případů lze pro uvedený účel využívat i fytotechnologické procesy.

2 Farmaka a jejich výskyt v životním prostředí

V souvislosti s rozvojem farmakoterapeutických možností dochází na celém světě k masivnímu využívání chemických látek pro léčbu, diagnostiku či prevenci nejrůznějších chorob. S tím zároveň stoupá xenobiotická zátěž ekosystému a zvláště ve vodném prostředí jsou u frekventovaných léčiv zjišťovány koncentrace, ať už primárních substancí či jejich metabolitů v průměru ng/l - µg/l (ppt – ppb). Hodnoty koncentrací těchto látek a jejich metabolitů jsou sice nízké, ale vykazují silnou fyziologickou aktivitu a tím znamenají závažný celosvětový problém [1].

Farmaceutika jsou chemické sloučeniny, které se užívají pro diagnózu, ošetření, změnu nebo prevenci onemocnění, zdravotního stavu nebo pro uspořádání funkcí lidského těla. Tato definice platí i pro léčiva ve veterinární medicíně a může být aplikovaná i na nelegální drogy [1].

Farmaka můžeme rozdělit do několika skupin podle jejich účinku např. antibiotika, hormonální látky, antidepresiva, diuretika, analgetika a další. K nejčastěji používaným patří látky ze skupiny neopioidních analgetik resp. nesteroidních antiflogistik [1]. Značná část těchto léčiv není vázána lékařskou preskripcí a volná dostupnost zvyšuje jejich používaná množství.

2.1 Analgetika

Analgetika jsou léčiva, která tlumí bolest. Dělíme je na analgetika-anodyna (analgetika morfiového typu) a antipyretická analgetika a do této skupiny léčiv řadíme i nesteroidní protizánětlivé látky (antiflogistika).

Pojem „bolest“ označuje spektrum pocitů, které mohou mít velmi rozdílný charakter a mohou dosáhnout různé intenzity od pocitů nepříjemných až po pocity nesnesitelné. Bolestivé dráždění působí na morfologicky nejméně diferenciované fyziologické receptory, totiž na volná nervová zakončení (senzorické receptory) [2].

Analgetika morfinového typu

Analgetika morfinového typu ovlivňují vnímání bolesti tím, že potlačují přenos bolestivých impulsů v míše a potlačují emocionální reakci na bolest. Zástupcem této skupiny je morfin, jeho deriváty a další syntetické látky od něj odvozené. Morfin je alkaloid opia a působí podstatně mnohem silněji analgeticky než antipyretická analgetika. Na tyto látky snadno vzniká léková závislost a při pokusu o ukončení pravidelného užívání opioidů mohou nastat abstinenční příznaky, a to fyzické (mj. oběhové selhání) a psychické (mj. neklid, úzkostné stavy, deprese). Předepisování většiny z nich proto podléhá ustanovením o předepisování omamných látek [2].

Antipyretická analgetika

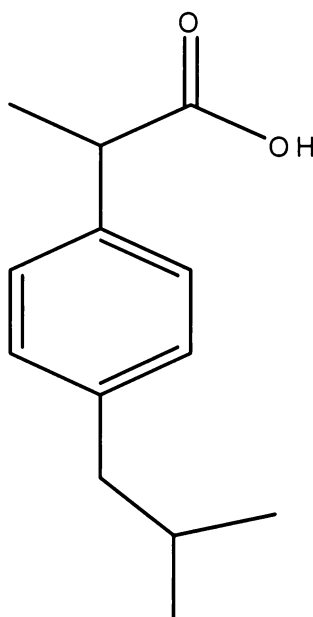
Antipyretická analgetika mají podstatně slabší účinky než analgetika-anodyna. Tyto látky netlumí viscerální bolest (silné vnitřní bolesti), ale jsou účinné proti somatické bolesti (svalová a kloubní bolest). Jsou to léčiva, která ovlivňují vnímání bolesti snížením citlivosti nocicepčních receptorů, což jsou volná nervová zakončení, která reagují na mechanická a tepelná podráždění. Od opioidních analgetik se liší tím, že mají antipyretický účinek. Mezi zástupce můžeme zařadit paracetamol, kyselinu acetylsalicylovou nebo ibuprofen [2].

Nesteroidní protizánětlivé látky – antiflogistika (NSAID)

Antiflogistika jsou léčiva, které mají protizánětlivý účinek. Potlačují projevy zánětu a z toho plynoucí poškození tkáně. Mohou mít také analgetický, antipyretický účinek a používají se na léčbu revmatických chorob. Jsou to tzv. „kyselinová antiflogistika“, neboť jsou odvozena od karboxylových kyselin (např. diclofenac, ibuprofen, naproxen a indometacin) nebo od enolových kyselin (např. azopropazon, piroxikam a fenylbutazon) [2].

Tyto látky se dobře resorbují z trávicího ústrojí a silně se vážou na plazmatické bílkoviny. Eliminují se rozdílně rychle např. pro srovnání diclofenac $t_{1/2} = 1 - 2$ h, ibuprofen $t_{1/2} = 2$ h a naproxen $t_{1/2} = 14$ h [2].

2.2 Ibuprofen



Obr.2.1 – Ibuprofen (2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina).

Sumární vzorec: $C_{13}H_{18}O_2$

Molární hmotnost: 206,28

Ibuprofen (2-(4-isobutylfenyl)propionová kyselina) je nesteroidní antiflogistikum (NSAID), analgetikum a antipyretikum [3]. Vzorec ibuprofenu je uveden na Obr.2.1.

Ibuprofen je indikován k léčbě zánětlivých a degenerativních chorob kloubních, mimokloubního revmatizmu a chorob páteře. Používá se při revmatoidní artritidě, včetně juvenilní revmatoidní artritidy, osteoartróze, ankylozující spondylitidě, psoriatické artritidě, dnavé artritidě, chondrokalcinóze (pseudodna), při distorzi kloubů a zhmoždění pohybového aparátu. Jako analgetikum-antipyretikum při horečnatých stavech a nemocech z nachlazení, dále při migréně vaskulární etiologie, bolestech po operaci, bolestech zubů a bolestivé menstruaci [4].

Terapeutická dávka se pohybuje kolem 600 – 1200 mg/den, ale může být i vyšší až 2,4 g/den. Dávkování léku závisí na závažnosti onemocnění a na reakci pacienta na léčbu. V nižších dávkách působí analgeticky, ve vyšších protizánětlivě. Protizánětlivý účinek je dán inhibicí cyklooxygenázy s následnou inhibicí biosyntézy prostaglandinů. Zánět je zmírňován snížením uvolňování mediátorů zánětu z granulocytů, bazofilů a žírných buněk. Ibuprofen snižuje citlivost cév vůči bradykininu a histaminu, ovlivňuje produkci lymfokinů v T lymfocytech a potlačuje vazodilataci. Tlumí též agregaci krevních destiček [4].

Doba nástupu analgetického účinku je za 0,5 hodiny, maximálního antipyretického účinku je dosaženo za 2 - 4 hodiny. Antipyretický účinek trvá 4 - 8 i více hodin, analgetický 4 - 6 hodin [4].

Farmakum má řadu nežádoucích účinků. Nejčastěji se vyskytují gastrointestinální obtíže: nauzea, zvracení, bolesti v epigastriu, pálení žáhy, průjem, zácpa, flatulence apod., vzácně žaludeční nebo duodenální vřed. Mohou se objevit závratě, bolesti hlavy a ojediněle poruchy krvetvorby [4].

Ibuprofen je chirální látka, jelikož má asymetricky substituovaný atom uhlíku. Tato jeho vlastnost je velice důležitá ve farmakologii, protože pro člověka a jiné savce je aktivní jen S-(+)-forma na rozdíl od R-(-)-formy, která je neaktivní. Ibuprofen je vylučován buď v nezměněné formě nebo ve formě metabolitů. Hlavní metabolity jsou hydroxy-ibuprofen, karboxy-ibuprofen a 2-(4-karboxyfenyl)propionová kyselina. Všechny tyto látky také vykazují chiralitu [3].

Celosvětová produkce ibuprofenu se pohybuje v několika kilotunách a tato látka je třetí nejčastěji používaný lék na světě [3]. Tento trend vede k nárůstu ibuprofenu v životním prostředí zejména v povrchových a odpadních vodách, a tím dochází k ohrožení vodního ekosystému.

Spotřebované množství nejběžnějších analgetik ve Finsku za rok 2002 uvádí Tab.2.1 [5]. Pro srovnání v roce 1997 v Rakousku byla spotřeba ibuprofenu 6 696 kg/rok a diclofenacu 6 143 kg/rok [6]. Ve Velké Británii v roce 2000 byla spotřeba ibuprofenu v kg/rok 162 209,06 [7].

Tab.2.1 Množství analgetik spotřebované za rok 2002 ve Finsku.

Sloučenina	Spotřeba kg/rok	Spotřeba mg/obyvatelstvo/rok
ibuprofen	70 200	13,5
naproxen	6 700	1,3
ketoprofen	1 400	0,27
diclofenac	965	0,19

2.3 Výskyt farmak v životním prostředí

V posledních letech vzrůstá zájem o léčiva a jejich metabolity v životním prostředí zejména v povrchových vodách. Mnoho z běžně užívaných skupin léků (např. analgetika, antibiotika) je v součtu používáno ve srovnatelném množství jako třeba agrochemikálie či jiné organické mikropolutanty. Na rozdíl od nich, nebyly po dlouhou dobu léčiva a jejich metabolity sledovány v životním prostředí a jejich detekce je otázkou posledních několika let [8]. V současné době se právě tyto látky řadí mezi prioritně zkoumané polutanty. Nesporná je i přítomnost léčiv a jejich metabolitů v prostředí jako důsledek jejich mnohaletého vstupu do ekosystému především z odpadních vod, ať už surových či prošlých přes čistírnu odpadních vod [9,10].

Pravděpodobně první zmínka o detekci léčiva na lékařský předpis v čistírně odpadních vod byla zaznamenána před 20-ti lety. Garrison [11] našel klofibrovou kyselinu a také klofibrát, etofibrát a theofibrát v koncentraci 0,8 – 2,0 µg/l v surové komunální vodě a aktivovaném kalu. Současně byly identifikovány i takové všudypřítomné látky jako je kofein a nikotin. Paralelně Lignite a Azarnoff [12] našli kyselinu salicylovou a klofibrovou v městské čistírně odpadních vod v Kansas City, Missouri. Klofibrová kyselina byla běžně detekována ve výtoku z čistírny odpadních vod v Missouri při průměrné rychlosti výtoku v množství 2,1 kg/den. Po dobu 10-ti měsíců koncentrace zůstala v těsném rozmezí 0,76 – 2,92 kg/den. Podobně u kyseliny salicylové bylo zjištěno, že její průměrná hmotnost byla 8,6 kg/den, ale rozmezí bylo širší - od 5,5 do 28,7 kg/den. Stan a Heberer [13] také zjistili, že množství klofibrové kyseliny v přítoku bylo pouze o 20% vyšší než na výtoku. Tato látka tedy zřejmě odolává technologickému procesu používanému při čištění komunálních odpadních vod. Naopak v případě kyseliny salicylové byla její koncentrace v přítoku řádově vyšší než ve výtoku a tedy účinnost čistícího procesu je pro tuto látku výrazně vyšší. Z uvedených faktů byl již před 20-ti lety vyvozen závěr, že neustálý vstup léčiv a jejich metabolitů do ekosystému, i v technologicky zpracovaných odpadních vodách, by mohl mít za následek zvýšení koncentrace biologicky aktivních xenobiotik, které by mohly negativně působit na vodní organismy [14].

Toxicita léčiv ve vodním prostředí se liší v dávce a druhu léčiva a jeho vlivu na organismy. Nejvíce ohroženými živočichy jsou mikroorganismy, řasy, žahavci, korýši a ryby. Analgetika jsou toxická pro korýše (EC_{50} 1 – 10 mg/l) a škodlivá pro korýše a ryby (EC_{50} 10 – 100 mg/l). Pro mikroorganismy jsou velmi toxická antibiotika ($EC_{50} < 0,1$ mg/l). Antidepresiva jsou velmi toxická pro korýše ($EC_{50} < 0,1$ – 1 mg/l) a antiepileptika bývají toxická pro žahavce (EC_{50} 1 – 10 mg/l) [15].

2.4 Distribuce farmak

Distribuce farmak přímo souvisí s jejich množstvím uvolňujícím se do životního prostředí. Množství spotřebovaných léčiv je možné odhadnout jen velmi obtížně, protože existují tisíce hromadně vyráběných léčivých přípravků. Řada z nich je i ve volném prodeji, který není zcela registrován (např. analgetika, některá antihistaminika, dezinfekční látky) [14].

Většina léčiv kontaminujících ekosystém pochází z užití v humánní medicíně, určitou část lze rovněž přičíst medicíně veterinární. Ternes [14] například uvádí, že sloučeniny nalezené ve vodách a patřící do skupiny hypolipidemik či nesteroidních protizánětlivých látek jsou důsledkem humánní aplikace, přičemž však nelze ani zanedbat určitý příspěvek veterinárního užití. Všeobecně literatura uvádí, že nejvíce farmak či jejich metabolitů je přítomno v povrchových vodách, kde dosahují koncentrací 1 ng/l – 1 µg/l. Zajímavým je i výpočet Richardsona a Bostona [16], kteří uvádějí, že 1 000 kg látky, vnesené a rovnoměrně distribuované ve všech řekách v Anglii a Walesu, by způsobilo její finální koncentraci přibližně 0,1 µg/l. Tento fakt je o to závažnější, že ve skutečnosti je např. v roční bilanci spotřebováno mnohonásobně větší množství xenobiotik jenom ve formě farmak.

2.5 PPCPs – Pharmaceutical and Personal Care Products (léčiva a produkty osobní péče)

Do skupiny PPCPs můžeme zahrnout širokou škálu chemických sloučenin, které člověk používá ke zvýšení kvality života. Mezi ně se řadí mnoho chemických sloučenin a jejich kompozit jako jsou léčiva, čisticí prostředky, přípravky osobní hygieny a v širším slova smyslu i fungicidy, insekticidy, veterinární léčiva apod. [17].

PPCPs a jejich metabolity kontaminují cestou komunálních odpadních vod vodní prostředí a tím působí na kvalitu povrchových vod, protože nejsou kompletně

rozložitelné ani v moderních čistírnách odpadních vod. Svoji přítomností ovlivňují aquatický a následně terestriální ekosystém, logicky tím vstupují do potravních řetězců vyšších organismů [18,19].

Některé z těchto látek mohou patřit do skupiny tzv. endokrinních dysharmonizátorů (endocrine disruptors). Ty způsobují poruchy hladin endokrinních hormonů a většinou vykazují estrogení aktivitu. Jejich mechanismus spočívá v narušení součinnosti jednotlivých kroků při řízení hormonální regulace. Změny v endokrinní regulaci mohou ovlivnit psychický vývoj, vývoj mozku, chování, regulaci teploty i reprodukci. Tyto látky způsobují vrozené vady, změny v sexuálním a funkčním vývoji, diabetes mellitus, časnou pubertu u mladých dívek, rakovinu prsu a tlustého střeva, redukci motorické dovednosti, dyslexii a jiné choroby [20].

3 Remediacie – odstranění xenobiotik z životního prostředí

S rozvojem vědy a průmyslu docházelo k výrobě látek, které nemají přirozený původ v přírodě tzv. xenobiotika. Později bylo zjištěno, že tyto průmyslově významné látky jsou perzistentní a toxické. Dochází k hromadění těchto látek v životním prostředí. Xenobiotika mohou pronikat do potravního řetězce, a tak ohrožovat i lidské zdraví. V dnešní době je tedy věnována pozornost možnosti odstraňování cizorodých látek a dekontaminaci zasažených ploch.

Existuje řada účinných fyzikálně-chemických metod, které lze použít, avšak většinou se jedná o ekonomicky velmi náročné postupy. Jedním z alternativních způsobů je levnější a přirozenější biologická dekontaminace, která využívá organismy schopné v kontaminovaném prostředí přežít a kontaminující látky degradovat.

3.1 Fytoremediace

Fytoremediace je metoda využívající nižší a vyšší rostliny k fixaci, akumulaci a rozkladu nebezpečných kontaminantů z životního prostředí [21]. Metoda zahrnuje využití vegetace pro *in situ* remediaci půdy, sedimentů a vody. Používá se k remediaci půdy, sedimentů, povrchových i podzemních vod kontaminovaných toxickými kovy, organickými látkami a radionuklidy. Fytoremediační technologie využívají biologické, fyzikální i chemické procesy, které souvisejí s růstem a výživou rostlin. Účinnost fytoremediace mohou zvýšit i degradační procesy probíhající v bakteriích a houbách, které žijí na, nebo v blízkosti kořenů rostlin [22].

Fytoremediace je dlouhodobý dekontaminační proces. Metoda má největší význam při dekontaminaci větších ploch s nízkými koncentracemi ekologických škodlivin, tedy primárních kontaminantů a v mnoha případech i jejich degradačních produktů. Pro úspěšnou fytodegradaci je nutná biologická dostupnost kontaminantů, která je dána lipofilitou látky, typem půdy a stářím kontaminace [21].

Fytodekontaminace zahrnuje několik metod fytoextrakce, fytovolatilizace, rhizofiltrace a fytodegradace.

3.1.1 Fytoextrakce

Fytoextrakce je metoda, která využívá rostlinné druhy k absorpci a koncentraci toxických látek z okolního prostředí. Vybrané rostlinné species jsou vysety či vysázeny na kontaminovanou plochu, kde akumulují kontaminanty do tkání, poté jsou sklizeny a zpracovány tepelně, mikrobiálně nebo chemicky [23]. Podmínkami pro účinnou fytoextrakci je přechod toxických látek z půdy do kořenů a její fixace v tkáních rostlin, výskyt toxické látky v oblasti kořenů, rychlost absorpce kořeny, rychlost transportu v rostlině a zadržování toxických látek [22]. Z kořenů může být xenobiotikum transportováno do ostatních částí rostlin, kde je buď ukládáno nebo transformováno. Metoda je využitelná pro odstraňování těžkých kovů [24]. Některé druhy rostlin jsou vysoce tolerantní k přítomnosti těžkých kovů a dokáží je akumulovat do svých pletiv ve vysokých koncentracích. Rostliny, které akumulují toxické látky ve vysokých koncentracích označujeme jako hyperakumulátory [25].

3.1.2 Fytovolatilizace

Chemická látka může být v průběhu procesu absorbována kořeny, převedena do nadzemních částí rostliny a zde transformována na těkavé produkty. Tyto těkavé produkty se poté dostávají do atmosféry při rostlinné transpiraci. V praxi byly zkoumány rostliny brokolice, špenátu a rýže díky své schopnosti přežít na místech silně zamořených sloučeninami selenu [26].

Některé mikroorganismy mohou redukovat rtuťnaté ionty na kovovou rtuť. Ta se vzhledem ke svým fyzikálním vlastnostem uvolňuje do okolí ve formě par. Gen kódující reduktasu rtuti byl nejprve vnesen do genomu rostliny *Arabidopsis thaliana*, posléze i do rostliny *Lyriodendron tulipifera*. Expresí tohoto genu se zvýšila odolnost rostliny vůči koncentraci rtuťnatých iontů a zároveň se podařilo převést větší část rtuti ve formě kovové rtuti do vzduchu. Tato vlastnost rostliny umožňuje dekontaminovat území zamořené rtuťnatými ionty. Do jaké míry je tato metoda nezávadná, z hlediska rozšíření toxických látek do ovzduší je otázkou dalšího výzkumu [27].

3.1.3 Rhizofiltrace

Rhizofiltrace je metoda, která využívá k absorpci, koncentraci a precipitaci xenobiotik z proudící, znečištěné vody kořeny živých rostlin. Metoda je vhodná především pro odstranění nízkých koncentrací kovů, kdy nelze efektivně využít jinou dekontaminační metodu [23]. Rhizofiltrace se ukázala jako zvláště vhodná při záchytu radionuklidů, které byly úspěšně akumulovány kořeny rostlin *Brassica juncea* nebo *Helianthus annuus*. Vhodné rostliny pro akumulaci některých těžkých kovů rhizofiltrací je např. kukuřice, slunečnice a rýže.

3.1.4 Fytodegradace

Fytodegradace nebo také fytotransformace je přeměna organických molekul v tkáních rostlin. Rostliny a s nimi asociovaná mikroflóra při použití této technologie degradují kontaminanty na netoxické látky. Uvažuje se především o dekontaminaci organických látek, které jsou rostliny schopné metabolizovat svými enzymatickými systémy [23]. Podmínkou použitelnosti této metody je, aby vznikající metabolity byly netoxické pro rostliny i ostatní organismy. Sloučeniny jsou v rostlině buď štěpeny na jednodušší molekuly nebo konjugovány do složitějších molekul.

Fytotransformace probíhá dvěma způsoby. Jednak výše uvedenými metabolickými procesy v tkáních a dále v důsledku produkce enzymů v tkáních jsou uvolňovány do rhizosféry.

Rostliny vylučují svými kořeny do okolí množství exsudátů, ve kterých jsou obsaženy aminokyseliny, cukry a organické sloučeniny. Tyto látky mohou sloužit jako zdroj energie pro mikroorganismy, které žijí v rhizosféře, a tak umožňují její růst. Naopak mikroorganismy mohou rostlinám poskytovat látky, které rostliny samy neumí získat. Rhizosféra je zvláštním mikrosvětlem s mnoha specifickými metabolickými drahami a právě zde může proběhnout mnoho klíčových reakcí důležitých při dekontaminaci. Jak shrnuje Anderson a kol. [28], je výrazný rozdíl v degradační aktivitě mikroorganismů v osázené půdě a v půdě bez rostlin [29].

Fytotransformace může být využita v případě zamoření ropnými produkty [28], výbušninami [30], chlorovanými rozpouštědly [28], herbicidy, polyaromatickými látkami, detergenty a pesticidy [28].

4 Metabolismus xenobiotik v ekosystému

Rostliny a živočichové jsou vystaveni působením cizorodých látek tzv. xenobiotik. Tyto látky v organismu podléhají transformacím a jen zřídka se vylučují v nezměněné formě. Rostliny i živočichové používají k odstranění xenobiotik různé metabolické dráhy, které snižují jejich toxicitu a usnadňují vylučování cizorodých látek.

Biotransformace xenobiotik probíhá hlavně v játrech, avšak rovněž je důležitá v ostatních orgánech (plíce, ledviny, kůže a gastrointestinální mukóza). Jako xenobiotika lze chápat nejen klasické látky považované za kontaminanty životního prostředí, potravinová aditiva nebo reziduí průmyslových chemikálií, ale rovněž i řadu člověku prospěšných produktů civilizace jako např. léčiva či prostředky osobní hygieny apod.. Hepatocyty v játrech mají schopnost enzymaticky konvertovat lipofilní látky na hydrofilní metabolity. Metabolismus xenobiotik můžeme rozdělit do tří stupňů [31].

V první fázi (derivatizace) se uplatňují především oxidativní reakce méně redukční a hydrolytické. Zavádí se reaktivnější funkční skupina do skeletu lipofilního xenobiotika.

V druhé fázi (konjugace) se uplatňují konjugační nebo syntetické reakce s endogenní molekulou. Konjugát má zvýšenou rozpustnost ve vodě a schopnost ionizace při fyziologickém pH. Ve třetí fázi dochází k vylučování konjugátů z organismu.

U rostlin lze metabolismus xenobiotik také rozdělit do tří stupňů. Derivatizace a konjugace jsou obdobné jako u živočichů. Výrazně odlišná je třetí fáze, při které dochází k ukládání produktů biotransformace do rostlinného pletiva, neboť rostliny nemají vylučovací orgány [32].

Enzymy podílející se na biotransformaci jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu buněk (v cytosolu a mikrosomech). Mikrosomální enzymy katalyzují reakce I. fáze a cytosolové enzymy katalyzují reakce II. fáze.

4.1 I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace xenobiotik dochází k zabudování funkčních reaktivních skupin do skeletu lipofilního xenobiotika, či demaskování funkčních skupin již v molekule xenobiotika přítomných. Proto je někdy tato fáze nazývána jako fáze derivatizační nebo funkcionalizační. Tím se zvyšuje polarita sloučeniny a možnost pro následnou konjugaci.

Biotransformačních reakcí v první fázi metabolismu xenobiotika rostlinami se účastní několik enzymových systémů. Mezi nejdůležitější patří monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO – mixed function oxidases) s cytochromy P-450 jako terminální oxidasou a dále pak peroxidasy. Z minoritně působících enzymů je třeba zmínit fenoloxidas (lakasy) oxidující fenoly, polyfenoly a tyrosinasy.

Většina reakcí první fáze probíhá oxidačně (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, desulfurace a další). Nicméně některé reakce probíhají i redukčním mechanismem (nitro, azoredukce) nebo hydrolyticky [31].

4.2 II. fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace bývá označována jako konjugační, neboť při ní dochází k navázání (konjugaci) endogenních molekul (glukuronátu, sulfátu z aktivního sulfátu, glutathionu, cysteinu, glycinu apod.) na reaktivní funkční skupiny metabolitů zavedených do molekuly xenobiotika v první fázi biotransformace. I když se tyto reakce nazývají reakcemi fáze II, mohou některé cizorodé látky s vhodnou funkční skupinou reagovat přímo bez účasti fáze I.

V případě rostlin se tato konjugační fáze přesněji označuje jako primární konjugace. Polárnější metabolity jsou spojovány kovalentní vazbou s molekulami endogenních hydrofilních sloučenin jako jsou např. některé sacharidy, aminokyseliny nebo glutathion. V případě toxických sloučenin jejich toxicita reakcemi této fáze výrazně klesá. Konjugáty jsou pak v rostlinách ukládány v některých částech buňky [33].

Pro konjugační reakce xenobiotik v rostlinách svědčí nález některých konjugátů. Byly např. izolovány O- β -glukosylové a (O-malonyl)-O- β -D-glukosylové konjugáty pentachlorofenolu či N-malonylové a N-glukosylové konjugáty 4-chloranilinu a 3,4-dichloranilinu. V rostlinných tělech byly rovněž prokázány enzymy odpovědné za tvorbu těchto konjugátů [33].

4.3 III. fáze – kompartmentace

Třetí fáze v rostlinném metabolismu je představována ukládáním metabolitů. Na rozdíl od savců nemají rostliny vylučovací orgány. Úložným místem pro rozpustné konjugáty jsou vakuoly. Některé produkty konjugační fáze procházejí ještě fází další označovanou za sekundární konjugaci, reakcemi s některými složkami buněčné stěny s ligniny, pektiny, hemicelulosami. Uložení produktů vzniklých v druhé fázi ve vakuole předchází transport konjugátů přes membránu vakuoly. Bylo zjištěno, že podobně jako u živočichů se i v rostlinných buňkách vyskytuje ATP-dependentní membránový přenašeč, který se v rostlinách využívá právě pro transport do vakuol [34].

5 Cíl práce

Cílem práce je ověření fytoextrakce ibuprofenu jako hojně používaného a volně prodejného analgetika z vodného prostředí jako modelu vstupu této látky do životního prostředí v důsledku kontaminace komunálních odpadních vod.

1. Vypracování metodiky HPLC stanovení koncentrace ibuprofenu z roztoků kultivačního media a metodu kvantifikace ibuprofenu v měřených vzorcích.
2. Příprava sterilních *in vitro* kultur kukuřice seté a pelušky jarní na základě známých podmínek sterilizace semen a kultivačních parametrů a vypracování obdobné metody pro světlici barvířskou.
3. Příprava kultur řas se suspenzí dodaných BÚ AV ČR.
4. Fytoextrakční experimenty s uvedenými třemi rostlinnými druhy, vyhodnocení časové závislosti a příprava extraktů z media a rostlin kultivovaných v přítomnosti ibuprofenu.
5. Sledování interakce řas s ibuprofenem za podmínek standardní kultivace (stacionární).

6 Experimentální část

6.1 Použité chemikálie a přístroje

Anorganické chemikálie pro přípravu média byly čistoty p a. (Lachema, ČR) a sacharosa byla dodána firmou Kulich, Hradec Králové. *Myo*-inositol byl použit v kvalitě pro tkáňové kultury od firmy Sigma. Voda pro přípravu mobilní fáze pro HPLC a média byla získána přístrojem DEMIVA (Watek, ČR). Methanol a acetonitril byly kvality pro HPLC od firmy (Lab-Scan, UK). Ethyl-acetát (Lachema, ČR) byl před použitím čištěn rektifikací na koloně. Výrobcem Sava pro sterilizaci kultur je Bochemie s.r.o. Bohumín. Od firmy Sigma byl dodán DMSO v kvalitě pro tkáňové kultury, který se používá pro rozpuštění ibuprofenu. Testovaná látka ibuprofen byla získána od firmy Zentiva a.s..

Jako biologický materiál byla použita semena kukuřice seté (*Zea mays* L. cv. Atalante (Semo s.r.o., Smržice)), pelušky jarní (*Pisum sativum* cv. Arnika (Oseva Uni, Choceň)) a světlice barvířské Sabina (*Carthamus tinctorius* L.(Seva – Flora s.r.o., Valtice)).

Inokula pro kultury řas byly získány z BÚ AV ČR – Algologické centrum Třeboň a v práci byl použit následující kmen: *Chlamydomonas Macropyrenoidosa* SKUJA [cf] HUBEL 1964/182.

HPLC analýzy byly provedeny na chromatografickém zařízení INCOS, který se skládá z vysokotlakého čerpadla INCOS LCP 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS 5000. Použitá kolona se sorbentem Reprosil 100C-18 (5 µm) měla rozměry 4,4 x 250 mm.

Analýzy byly provedeny za použití mobilní fáze methanol/voda (8,2, v/v) + 0,1% kyseliny octové, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, detekce UV 210nm. UV spektra byla měřena na přístroji Helios Beta (Thermo Scientific).

Data byla vyhodnocována chromatografickým programem Clarity (DataApex) včetně přepočtu dle kalibrační závislosti.

Další laboratorní materiál potřebný k experimentům byly hliníkové folie Silikagel 60 F254(Merck, SRN) pro tenkovrstvou chromatografii. Detekce probíhala pod UV světlem o vlnové délce 254 nm.

6.2 Kultivace rostlin

Příprava *in vitro* kultur

Semena kukuřice seté (*Zea mays L.* cv. Atalante) a semena světlíce barvířské (*Carthamus tinctorius L.*) byla ponořena do 70% ethanolu po dobu 60 sekund a následně sterilizována 10% roztokem Sava (chlornan sodný) po dobu 20 minut. Poté byla semena třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Semena pelušky jarní (*Pisum sativum* cv) byla ponořena do 70% ethanolu po dobu 60 sekund a následně sterilizována 20% roztokem chlornanu sodného po dobu 10 minut a poté dalších 5 minut. Poté byla semena sterilizována 100% roztokem chlornanu sodného po dobu 5 minut. Následně byl opět použit 20% roztok Sava po dobu dvakrát 10 minut a semena byla třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Takto povrchově sterilizovaná semena byla vzápětí přemístěna do předem vysterilizovaných 250 ml Erlenmayerových baněk s 10 ml sterilního kultivačního media , jehož složení je uvedeno v Tab.6.1.

Rostliny byly kultivovány při 25°C s dvanáctihodinovým světelným režimem (12/12, světlo/tma). Pokud došlo k nedostatku media v průběhu růstu rostliny bylo za sterilních podmínek doplněno.

Po třech až pěti týdnech dosáhly rostliny optimální velikosti a byly využity k dalším experimentům. Kultivační medium dle Murashiga a Skooga [35] mělo složení uvedené v Tab.6.1 a před autoklávováním bylo upraveno pH na hodnotu 5,8 – 6,0.

Tab.6.1 Složení media MS dle Murashiga a Skooga, navážky jsou do 1 litru destilované vody.

Chemikálie	Koncentrace [mg/l]
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ . 4H ₂ O	8,6
Komplexon I	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,250
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,3
<i>myo</i> -inositol	100

Kultury řas

Kultury řas byly odvozeny z existující suspenze řas přenesením 5 ml původní suspenze do 1 l čerstvého media dle Knoppa (složení – Tab.6.2). Pasážování bylo prováděno v cca. měsíčním intervalu a připravená 1-měsíční suspenze byla použita k experimentům.

Tab.6.2 Medium dle Knoppa, navážky látek do 1 litru destilované vody.

Chemikálie	Množství
KNO ₃	1g
KH ₂ PO ₄	0,1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1g
FeCl ₃ 0,01% roztok	100μl

6.3 Fytoextrakční experimenty

6.3.1 HPLC analýza roztoků ibuprofenu v kultivačním mediu

Chromatografické podmínky pro analýzu vodných roztoků ibuprofenu byly testovány na koloně Reprosil 100 C-18, 5 μm. Vhodné složení mobilní fáze bylo vybráno ze souboru výsledků při použití směsí acetonitril/voda a methanol/voda (0 - 40 % vody v organickém rozpouštědle) a bez nebo s přidavkem kyseliny octové. Testovány byly průtoky mobilní fáze 0,5 - 1 ml/min. Detekce UV byla nastavena dle autentického UV spektra substance v mobilní fázi. Podstatným byly získání optimálních výsledků pro přímou analýzu kultivačního media a jako optimální podmínky se ukázaly: mobilní fáze methanol/voda (8/2, v/v)+ 0,1% kyseliny octové, průtok 0,7 ml/min, detekce UV 210 nm, detekční limit 0,25 mg/l.

6.3.2 Fytoextrakce ibuprofenu

Sterilní tří- až pětitédenní intaktní rostliny byly pasážovány na medium MS s přidavkem ibuprofenu o koncentraci 7 – 15 mg/l pro kukuřice seté, 12 – 15 mg/l pro rostliny pelušky jarní a 10 – 17 mg/l pro světlici barvířskou. Xenobiotikum bylo přidáváno k mediu jako roztok definované koncentrace v dimethylsulfoxidu. Medium

s rostlinou bylo opatrně promícháno a poté byl ihned odebráno 0,5 ml vzorku media ke stanovení aktuální výchozí koncentrace ibuprofenu v mediu pomocí HPLC.

Rostliny byly dále kultivovány obvyklým výše uvedeným způsobem. Odběry 0,5 ml vzorků byly následně prováděny za sterilních podmínek ve zvolených časových intervalech. Během prvního týdne po 24 hodinách, ve druhém týdnu po dvou až třech dnech. Koncentrace ibuprofenu byla stanovena pomocí HPLC. Po ukončení experimentu byly rostliny promyty destilovanou vodou, zváženy a zamrazeny při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Objem media byl změřen a medium bylo dále uchováváno při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ za účelem další analýzy.

6.3.3 Izolace produktů biotransformace ibuprofenu

Rostliny z fytoextrakčních experimentů byly následně použity k orientačním analýzám možných metabolitů.

6.3.3.1 Izolace z rostlin

Zmražené a zvážené rostliny byly homogenizovány za přídavku mořského písku v třecí misce. Homogenát rostlin byl převrstven destilovaným ethyl-acetátem a umístěn do ultrazvukové vany na dobu 20 minut. Poté byla vrstva ethyl-acetátu oddělena a celý postup byl opakován. Celkem byl postup opakován třikrát. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem hořečnatým, poté bylo sušidlo odfiltrováno a rozpouštědlo odpařeno ve vakuové rotační odparce. Odparek byl uchován pro další analýzy.

6.3.3.2 Izolace z media

Medium bylo extrahováno ethyl-acetátem (25 ml ethyl-acetátu na 100 ml media) při 90°C po dobu 5 minut. Po ochlazení byla v děličce oddělena organická fáze a medium bylo opět extrahováno novým ethyl-acetátem. Spojené extrakty byly vysušeny bezvodým síranem hořečnatým. Sušidlo bylo odděleno filtrací a rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Odparek byl uchován pro další analýzy.

6.3.3.3 Analýzy extraktů

Analýzy extraktů byly prováděny pomocí TLC v různých soustavách. V mediu byly vyhodnocovány nově objevené signály ve srovnání s mediem obohaceným ibuprofenem, na kterém nebyla kultivována žádná rostlina. Rostlinné extrakty byly vyhodnoceny vzhledem k nově vzniklým sloučeninám a změnám ve složení extraktu ve vztahu k rostlině nestresované xenobiotikem. Součástí bylo i vyhodnocení přítomnosti extrahovatelného ibuprofenu z rostlinné tkáně.

Tenkvrstevná chromatografie byla prováděna na hliníkových foliích Silikagel 60 F254. Detekce probíhala pod UV světlem o vlnové délce 254 nm. Jako mobilní fáze byl použit ethyl–acetát.

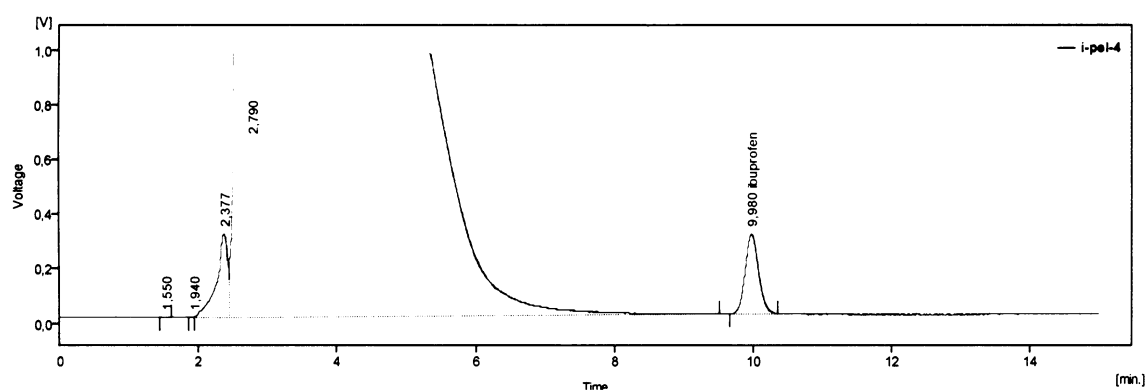
7 Výsledky a diskuse

Základním bodem pro všechny navazující úkoly bylo nalezení optimálních analytických podmínek pro stanovení koncentrace ibuprofenu v kultivačním mediu, tak aby nemuselo docházet k časově a materiálově náročné předpravě vzorků před chromatografickou analýzou.

Z hlediska analytické matrice, tedy komponent media, byla zvolena chromatografie na reverzní fázi a z testovaných eluentů se ukázala jako nejvhodnější směs methanolu s vodou v poměru 8:2 okyselená kyselinou octovou (0,1%) pro potlačení disociace stanovované látky.

Uvedené podmínky umožňují provádění přímého nástřiku odebraných vzorků media z kultivačních experimentů. Kalibrační závislost byla naměřena pro rozsah koncentrací ibuprofenu 2 – 15 mg/l, korelační koeficient 0,99994. Detekce při 210 nm není sice zcela optimální z hlediska absorpce velké řady sloučenin při této vlnové délce, nicméně specifitější maximum kolem 260 nm vykazuje dramaticky nižší hodnotu absorpance a je pro sledování koncentrace ibuprofenu v potřebných koncentračních hladinách nepoužitelné.

Ukázka separace reálného vzorku z media na Obr.7.1. Široký pík je důsledkem přítomnosti komponent media, vlastní signál ibuprofenu s retenčním časem těsně pod 10 minut je dostatečně separován a i délka analýzy je pro měření velkých sérií vzorků přijatelná.



Obr.7.1 Příklad chromatogramu ibuprofenu v kultivačním mediu (kolona 4,4×250 mm, Reprosil 100 C-18, mobilní fáze methanol/voda (8/2, v/v)+ 0,1% kyseliny octové, průtok 0,7 ml/min, detekce UV 210 nm).

Uvedené podmínky byly vypracovány vzhledem k plánovaným kultivačním experimentům, které v této fázi představují pouze hrubou simulaci reálného systému z hlediska koncentrací studovaného xenobiotika, které je v reálných vodách výrazně nižší. Plánované kultivační experimenty jsou navrženy pro poměrně vysoké koncentrace ibuprofenu, které sice neodpovídají reálným hodnotám, ale umožňují studovat interakci rostliny s xenobiotikem z hlediska metabolismu. Stanovení reálných koncentrací je náplní jiného projektu a je řešeno zakoncentrováním vzorku s následnou GC-MS analýzou po předchozí derivatizaci. HPLC analýza není pro reálné vzorky použitelná ani při SPE předúpravě vzorku, protože detekční limit HPLC stanovení je cca. 0,25 mg/l a pro získání vzorku vhodného pro HPLC stanovení by bylo nutné zpracovat nepřijatelné množství roztoku.

Příprava biologického materiálu spočívala v sterilní *in vitro* kultivaci rostlin. Tento způsob zaručuje, že z hlediska metabolismu je studována pouze interakce zkoumané látky se zvolenou rostlinou a jsou vyloučeny vlivy mikrobiální kontaminace či kontaminace jinými patogeny. Dále je nespornou výhodou, že tato kultivace je zcela nezávislá na ročním období a lze tedy výzkum provádět průběžně během celého roku nezávisle na vegetačním období.

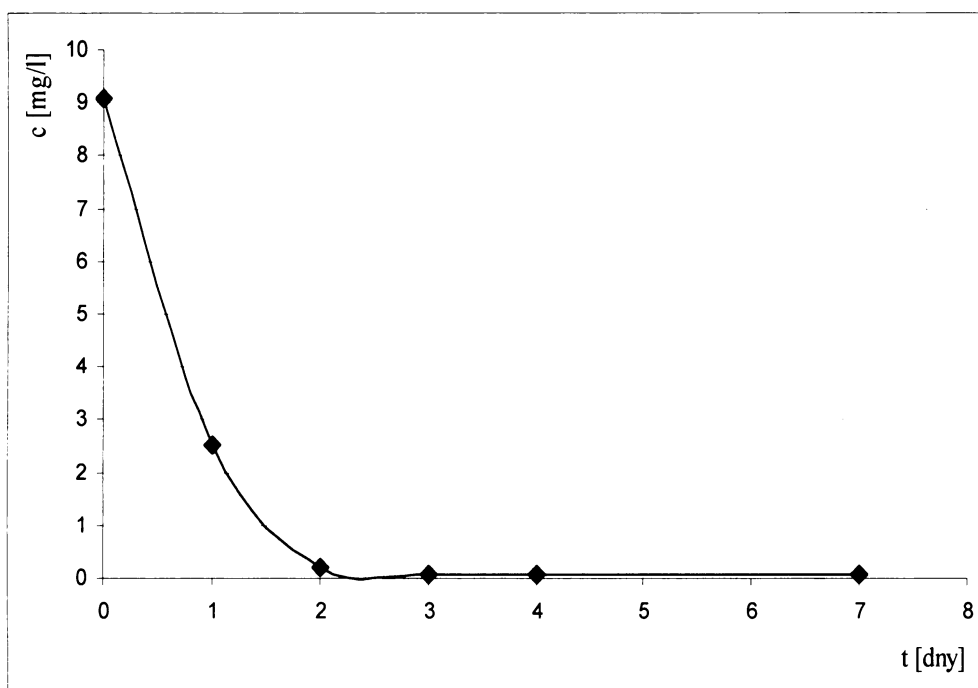
Metodika pro získání rostlin kukuřice a pelušky byla provedena dle zavedených postupů v laboratoři, pro úspěšnou kultivaci světlice bylo třeba nalézt především vhodné podmínky sterilizace semen za účelem vyloučení kontaminace kultury, ale při zachování klíčivosti semen. Sterilizace 10 % roztokem Sava se ukázala jako vhodný kompromis, i když poměrně velké procento nasazených kultur podlehl infekci. Vyšší koncentrace chlornanu sodného však výrazně redukuje klíčivost, případně vedou ke vzniku deformovaných rostlin. Infikované kultury byly průběžně vyřazovány a byl získán dostatek rostlinného materiálu pro vlastní experimenty, který po dobu fytoextrakční kultivace nevykazoval známky infekce. Z hlediska infekce je získaná kultura problematická a nelze vyloučit vnitřní kontaminaci rostlinného materiálu, která se však nedá běžnou povrchovou sterilizací odstranit.

Kultura řasy *Chlamydomonas macropyrenoidosa* SKUJA [cf] HUBEL 1964/182 byla připravena pasážováním kultivované suspenze ve stacionárním stavu růstové křivky do čerstvého roztoku Knoppova media. Po několika dnech došlo k množení řas, což se projevilo zvýšením intenzity zeleného zbarvení.

Vlastní fytoextrakční experimenty byly provedeny se třemi rostlinnými druhy, kukuřicí setou, peluškou jarní a světlicí barvířskou.

V případě kukuřice byly použity koncentrace ibuprofenu 7 - 15 mg/l kultivačního media, které se ukázaly být vizuálně netoxické vůči rostlinám a zároveň nejsou těsně pod hranicí rozpustnosti ibuprofenu ve vodě (20 mg/l) [36].

Ibuprofen byl vnesen do kultivačních experimentů jako roztok v dimethylsulfoxidu a okamžitě po přidání xenobiotika byl odebrán vzorek pro stanovení reálné výchozí koncentrace zkoumané substance. Po 24, 48 a 168 h byly odebrány další vzorky, které ukázaly zřejmý pokles koncentrace ibuprofenu v kultivačním mediu. Průměrný úbytek vztažený na čerstvou hmotnost rostliny za 24 hodin byl mezi 30 - 40 % v závislosti na vstupní koncentraci. Po 48 hodinách již ve třech případech ze 6 experimentů nebylo možné detegovat přítomnost ibuprofenu v kultivačním mediu a i ve zbylých případech již byly koncentrace velmi nízké a na hranici limitu kvantifikace. Průběh kultivace je na Obr.7.2.

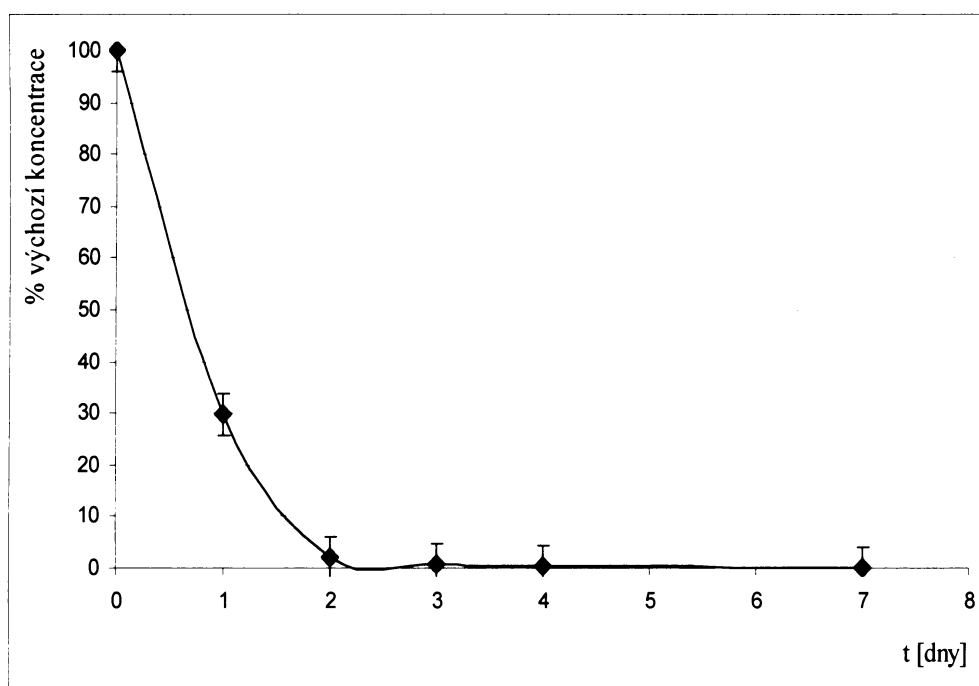


Obr.7.2 Pokles koncentrace ibuprofenu v kultivačním mediu během sedmidenní kultivace *Zea mays*. (výchozí koncentrace 9,1 mg/l, koncentrace stanoveny HPLC).

Z Obr.7.2 je zřejmé, že fytoextrakce ibuprofenu probíhá poměrně rychle a během 48 hodin kultivace klesá koncentrace xenobiotika zhruba na 1 % koncentrace výchozí. Navíc lze proti řadě jiných látek konstatovat, že během experimentu

s ibuprofenem nedochází k běžně sledovanému jevu, kdy po přidání xenobiotika koncentrace rychle klesá, následně stoupá a teprve poté dochází k pomalému poklesu koncentrace zkoumané látky v mediu. Tento jev je způsobený rychlou sorpcí na kořenovou tkáň s následným uvolněním xenobiotika ve větší či menší míře zpět do media. K uvedenému jevu u ibuprofenu v interakci s kořenovým systémem kukuřice nedochází a lze usoudit, že pouhá sorpce je v provedených experimentech minimální. Tomuto faktu napovídá i zjištění, že rozdíl mezi předpokládanou výchozí koncentrací a zjištěnou koncentrací okamžitě po přidání ibuprofenu je minimální - 9,1 mg/l proti předpokládaným 10 mg/l, což odpovídá sorpci maximálně do 10 %.

Celkový trend poklesu koncentrace ibuprofenu je v daném rozsahu vstupní koncentrace prakticky stejný a průměrné hodnoty jsou pro soubor kultivačních experimentů znázorněny na Obr.7.3.



Obr.7.3 Pokles koncentrace ibuprofenu v kultivačním mediu při kultivaci rostlin kukuřice – průměr ze 6 experimentů v rozsahu koncentrací 7 – 15 mg/l (stanovení koncentrace HPLC/UV při 210 nm). Hodnoty koncentrace ibuprofenu jako % vstupní koncentrace.

Z grafu je opět zřejmé, že naprostá většina xenobiotika je z media odstraněna během prvních dvou dnů kultivace a během sedmi dnů klesá z průměrné vstupní

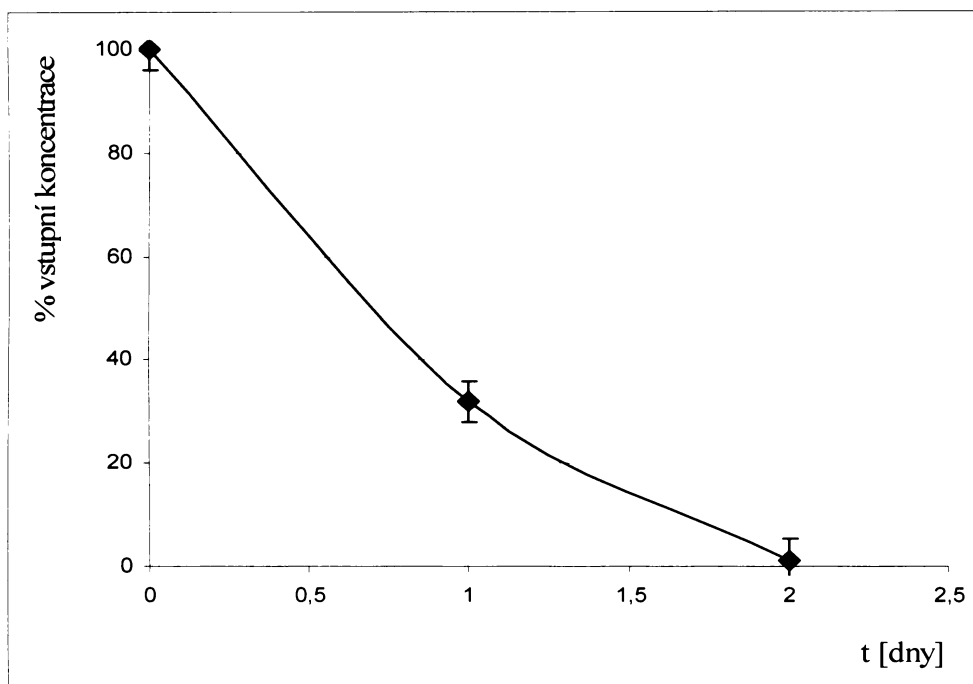
hodnoty 9,65 mg/l na hodnotu 0,06 mg/l což odpovídá 99,994 %. Konkrétní naměřené hodnoty pro rostliny kukuřice při různých začátečních koncentracích jsou uvedeny v Tab.7.1.

Tab.7.1 Průběh jednotlivých fytoextrakčních experimentů s rostlinami kukuřice (koncentrace stanoveny HPLC/UV-210 nm).

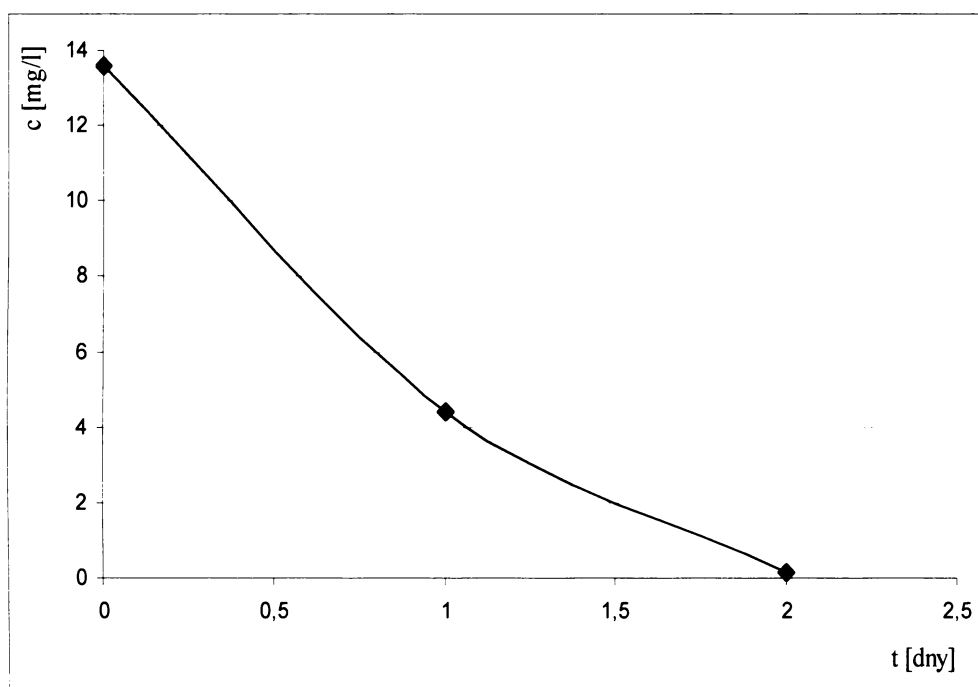
rostlina (kukuřice)	den - 0	den - 1	den - 2	den - 7	medium (kultivace) (ml)	nadzemní část rostliny (g)	kořeny (g)	celá rostlina (g)
K1	14,32	5,58	0	0	74	13,2	10	23,2
K2	7,19	0,5	0	0	78	18,8	9,5	28,3
K3	9,07	2,52	0,11	0,06	72	11,4	9,6	21
K4	9,66	3,8	0,58	0	76	10	10,1	20,1
K5	7,57	1,63	0	0	76	14	8,4	22,4
K6	10,07	3,13	0,23	0	76	8,1	6,8	14,9

V případě kultivace pelušky jarní byly provedeny fytoextrakční experimenty v rozsahu koncentrací 12,4 – 14,6 mg/l, přičemž k poklesu koncentrace docházelo velmi rychle a v průměrných hodnotách z 15 experimentů byla po 24 hodinách kultivace nalezena koncentrace dosahující 31,4 % výchozí koncentrace ibuprofenu a po dalších 24 hodinách klesla u 7 z 15 kultivací na průměrných 1,6 % výchozí koncentrace, u zbylých 8 experimentů již nebyl ibuprofen použitou analytickou metodou identifikovatelný. Další odběr po 24 hodinách rostlin, které ještě po 48 hodinách vykazovaly přítomnost xenobiotika v mediu opět již použitou analytickou metodou analyzovatelný. Průběh fytoextrakce je znázorněn na Obr.7.4.

Průběh fytoextrakce pro jednu vstupní koncentraci ukazuje Obr.7.5.



Obr.7.4 Pokles koncentrace ibuprofenu při kultivaci pelušky jarní. Průměr z 15 experimentů v rozsahu vstupních koncentrací 12,4 – 14,6 mg/l, (koncentrace stanoveny HPLC/UV – 210 nm). Hodnoty koncentrace ibuprofenu jako % výchozí koncentrace.



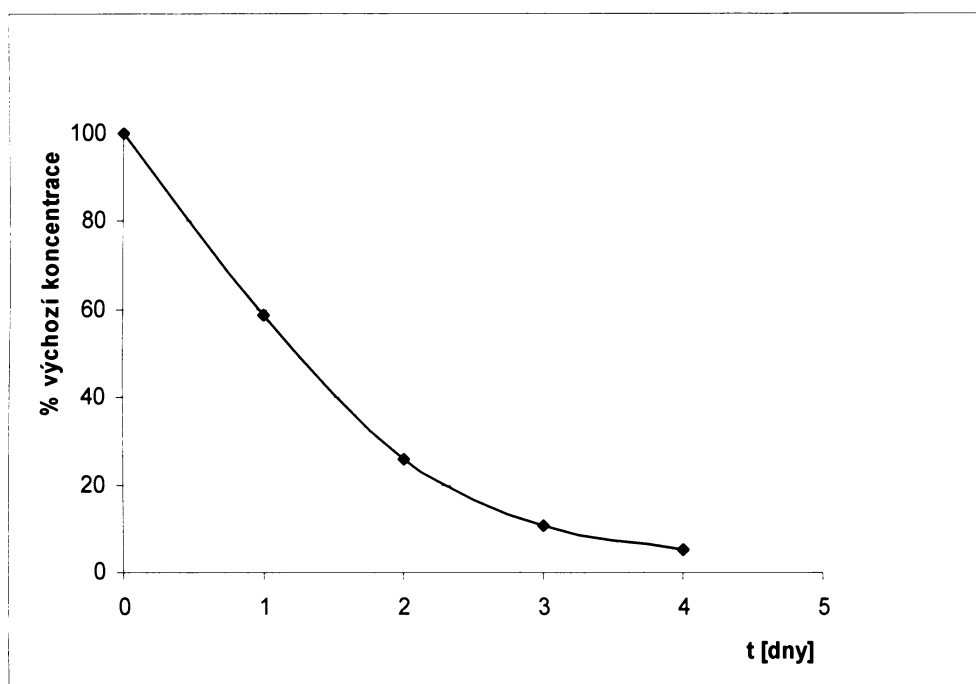
Obr.7.5 Pokles koncentrace ibuprofenu při kultivaci pelušky jarní. Vstupní koncentrace. Průměr z 15 experimentů v rozsahu vstupních koncentrací 12,4 – 14,6 mg/l, (koncentrace stanoveny HPLC/UV – 210 nm).

Konkrétní naměřené hodnoty pro rostliny pelušky při různých začátečních koncentracích jsou uvedeny v Tab.7.2.

Tab.7.2 Průběh jednotlivých fytoextrakčních experimentů s rostlinami pelušky (koncentrace stanoveny HPLC/UV-210 nm).

rostlina (peluška)	den -0	den - 1	den - 2	medium (kultivace) (ml)	nadzemní část rostliny (g)	kořeny (g)	celá rostlina (g)
P1	13,74	3,01	0	38	5,8	0,8	6,6
P2	14,63	6,03	1,08	37	5	1	6
P3	13,83	4,66	0,25	39	5,7	0,9	6,6
P4	14,25	4,27	0	38	5,2	1,1	6,3
P5	14,13	3,96	0	40	5	1,2	6,2
P6	13,09	3,3	0	39	4,2	2,2	6,4
P7	13,57	4,4	0,14	39	6,5	0,8	7,3
P8	13,45	4,02	0	40,5	5,2	1,4	6,6
P9	12,98	2,79	0,44	41	4,8	1,6	6,4
P10	13,2	5,33	0,48	40	6	0,8	6,8
P11	13,01	6,02	0,65	41	5,1	1,3	6,4
P12	12,42	4,43	0	40	5,3	1,3	6,6
P13	13,48	2,49	0	38	7,3	1,4	8,7
P14	12,91	3,94	0	40	5,8	1	6,8
P15	13,39	4,81	0,16	39	4,2	1	5,2

V případě světlice barvířské - Obr.7.6 je situace obdobná. K úbytku ibuprofenu z media, kdy byly použity vstupní koncentrace 10,5 – 16,92 mg/l, dochází sice pomaleji než v případě peluška jarní i kukuřice, k poklesu však dochází postupně během čtyř dnů. Během prvních 24 hodin kultivace bylo extrahováno 60,8 % výchozího ibuprofenu, po dalším dnu klesla jeho koncentrace na 26,4 % a za dalších 24 hodin už bylo nalezeno pouze 11,7 % výchozí koncentrace ibuprofenu v mediu. Zdá se, že metabolismus rostliny není výrazně ovlivněn přítomností zkoumaného xenobiotika a trend extrakce by zřejmě pokračoval ještě dále. Experimenty však byly po pěti dnech ukončeny vzhledem k mikrobiální kontaminaci kultur.



Obr.7.6 Pokles koncentrace ibuprofenu při kultivaci světlice barviřské v % vstupní koncentrace. Průměr z 11 experimentů v rozsahu vstupních koncentrací 10,5 – 16,92 mg/l l, (koncentrace stanoveny HPLC/UV – 210 nm).

Konkrétní naměřené hodnoty pro rostliny světlice při různých začátečních koncentracích jsou uvedeny v Tab.7.3.

Tab.7.3 Průběh jednotlivých fytoextrakčních experimentů s rostlinami světlice (koncentrace stanoveny HPLC/UV-210 nm).

rostlina (světlice)	den -0	den -1	den -2	den -3	den -4	medium (kultivace) (ml)	celá rostlina (g)
1	16,77	17,01	3,22	2,86	1,65	47	1,9
2	16,92	12,66	4,1	0,73	0,44	43	2,7
3	12,16	8,34	2,72	0,71	0,49	44	2
4	15,92	4,9	2,13	0,81	-	-	-
5	12,44	4,08	0,43	0,25	0	44	2,1
6	12,73	4,6	1,54	0,42	0,23	44	3,4
7	11,65	5,5	4,32	1,93	1,42	46	2,1
8	14,21	8,66	6,85	2,79	-	-	-
9	12,75	11,77	7,73	4,21	5,59	45	1,3
10	14,08	6,45	2,74	1	0,45	43	2,7
11	10,48	7,28	3,63	1,75	1,34	43	2,7

Srovnání jednotlivých rostlinných species vzhledem k fytoextrakčním experimentům vzhledem k základním parametrům fytoextrakce je v Tab.7.4 (pro výpočet byly použity průměrné hodnoty ze všech nekontaminovaných experimentů daného rostlinného druhu).

Tab.7.4 Základní zjištěné parametry fytoextrakce ibuprofenu rostlinami kukuřice, pelušky a světlice v *in vitro* uspořádání na mediu obohaceném ibuprofenem (ND - nebylo stanoveno).

Rostlina	kukuřice	peluška	světlice
Vstupní koncentrace [mg/l]	7–15	12,4 -14,6	10,5-16,92
Počet experimentů[mg/l]	6	15	11
Průměrná hmotnost rostlin [g]	21,65	6,59	2,32
% výchozí koncentrace po 24 h	31,1	31,4	60,8
% výchozí koncentrace po 48 h	2,3	1,6	26,4
% výchozí koncentrace po 72 h	0,01	ND	11,7
Koncová koncentrace (doba extrakce) [mg/l (dny)]	0,06 (3)	0,21 (2)	1,6 (3)
Účinnost fytoextrakce (doba) [% (dny)]	99,99(3)	98,4(2)	88,3(3)
Extrahovaný ibuprofen/čerstvá hmotnost rostliny (celková doba) [mg IBU/g čerstvé rostliny (dny)]	0,46 (3)	1,86 (2)	5,19 (3)

Z tabulky je zřejmé, že na první pohled ideální stav kukuřice není zdaleka až tak příznivý z hlediska množství ibuprofenu extrahovaného do rostliny kdy bylo dosaženo pouze 0,46 mg ibuprofenu extrahovaného 1 g rostlinné čerstvé hmotnosti. Peluška a zvláště světlice barvířská dosahuje více než desetkrát větší množství ibuprofenu na gram rostlinné tkáně. Vysvětlení může spočívat v poněkud rozdílném metabolismu kukuřice vůči ostatním použitým druhům, nelze však zanedbat ani rozdílnou metabolickou aktivitu, která zvláště v případě světlice se zdá nebyla přítomnosti xenobiotika nikterak narušena. Uvedený parametr by bylo možné sledovat stanovením aktivit vhodných enzymů a třeba i měřením obsahu chlorofylu. Fyziologické vyhodnocení je však pouze jedním faktorem, možná aplikace ve formě kořenové

čistírny vyžaduje splnění technologicky možných parametrů a pro tento případ se zdají být výhodnější právě rostliny kukuřice nebo pelušky.

Z hlediska analýzy obsahu ibuprofenu v extraktech z rostlin se podařilo prokázat, že v rostlinách lze dokázat extrahovatelný podíl ibuprofenu ve volné formě (TLC). Vzhledem k tomu, že analýzy byly prováděny pouze tenkovrstevnou chromatografií, nebylo možné výsledky kvantifikovat, přítomnost volného ibuprofenu v rostlině je však jednoznačná a že tento jev se projevil u všech testovaných rostlinných druhů. Z uvedeného vyplývá závažný fakt, že pokud ibuprofen kontaminuje ekosystém, lze předpokládat jeho vstup do potravinových řetězců vyšších organismů a to ve volné, tedy biologicky účinné formě. Pokud se potom tato látka při dlouhodobé prahové expozici považuje za endokrinní dysharmonizátor, či pokud tato jeho vlastnost bude potvrzena, jedná se o závažný kontaminant, který je minimálně třeba v ekosystému pečlivě sledovat, stejně tak jako provádět monitorování u zdroje kontaminace – komunálních odpadních vod, či odtoků z čistíren odpadních vod. Další pochopitelnou snahou je možnost jeho odstranění, k čemuž mohou právě rostlinné biotechnologie úspěšně posloužit. Použijeme-li k výpočtu běžně udávané koncentrace na výstupu z čistíren odpadních vod 30 cg/l, tak při přepočtu na parametry pražské čistírny odpadních vod je výsledné číslo hmotnosti ibuprofenu vstupujícího do ekosystému asi kolem 15 g denně (odpovídá 37,5 standardní tablety Ibalginu Zentiva). Výsledná zátěž pro ekosystém je mnohem větší, protože se stanovuje pouze samotný ibuprofen a nikoliv jeho metabolity.

Výsledky, kterých bylo dosaženo ukazují jasně na možnost fytoextrakce ibuprofenu. Experimenty byly sice prováděny ve vyšších koncentracích než se na výstupu z čistíren vyskytují, jejich význam však není v technologii zpracování odpadních vod, ale v testování možností fytoextrakce ibuprofenu a zjištění jeho osudu v rostlinné tkáni. Na druhé straně, dosažená minimální koncentrace 0,06 mg/l je již poněkud srovnatelná s maximálními koncentracemi ibuprofenu, které byly např. nalezeny v německých řekách (0,0034 mg/l) [37] a prodloužení doby kultivace a zavedení citlivější analytické metody snadno umožní sledovat fytoextrakci v oblasti reálných koncentrací.

8 Závěr

Studium fytoextrakce ibuprofenu zcela jasně prokázalo schopnost vybraných druhů rostlin extrahovat ibuprofen a uchovat jej ve svých pletivech, kdy minimálně část extrahované látky je přítomno ve volné formě jako extrahovatelné reziduum a tedy látka zachovávající si svoji biologickou aktivitu. Protože je látka potenciálním endokrinním dysharmonizátorem, lze v práci uvedený důkaz považovat za zásadní zjištění, které dokumentuje možnost kontaminace potravních řetězců vyšších živočichů studovaným xenobiotikem. Získané výsledky zároveň naznačují možnost technologického řešení, kdy konstrukce kořenových čistíren či obdobných fytotechnologických zařízení by mohla být velmi účinným, levným a obecně přijatelným řešením pro odstraňování zbytkových koncentrací ibuprofenu případně komplexnější řady široce užívaných farmak z výtoků čistíren odpadních vod.

9 Použitá literatura

1. Daughton, Ch. G.; Ternem, T.: *Environ. Health Perspect.*, **107**, 907 (1999).
2. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Ziegler, A.: *Atlas Farmakologie*, (1994).
3. Hutt, A. J.; Caldwell, J.: *J Pharm. Pharmacol.*, **35**, 693 (1983).
4. <http://www.sukl.cz/cs02leciva/cs02vyhledavani.php?k=1&j=1&t=ibu&st_rana=2> [cit.24.4.2007]
5. Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L.: *Water Res.*, 163 (2004).
6. Sattelberger, R.: *Umweltbundesamt Sien.*, 162 (1999).
7. Jones, O.A.H.; Voulvoulis, N.: *Water Res.*, **36**, 5013 (2002).
8. Jones, O.A.H.; Voulvoulis, N.; Lester J.N.: *Environ. Technol.*, **22**, 1383 (2001).
9. Ternes, T.: *J Amer. Chem. Soc.*, **219**, 301 (2000)
10. Aherne, G.W.; Briggs R.: *Pharm. Pharmacol.*, **41**, 735 (1989).
11. Garrison, A.W.; Pope, J.D.; Allen, F.R.: *Ann. Arbor. Science Publishers*, 517 (1976).
12. Lignite, C.; Azarnoff D.L.: *Life Sci.*, **20**, 337 (1977).
13. Stan, H.J.; Heberer, T.: *Analysis. Mag.*, **25**, 20 (1997).
14. Ternes, T.A.: *Water Res.*, **32**, 3245 (1998).
15. Lai, K.M.; Johnson, K.L.; Scrimshaw, M.D.: *Environ. Sci. Technik.*, **34**, 3890 (2000).
16. Richardson, M.L.; Boston, J.M.: *J Pharm. Pharmacol.*, **37**, 1 (1985).
17. Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen S.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Holten Luthøft, H.C.; Jørgensen, S.E.: *Chemosphere*, **36**, 357 (1998).
18. Roefer, P.; Snyder, S.; Zegers, R.E.; Rexing, D.J.; Fronk, J.L.: *J AWWA*, **92**, 52 (2000).
19. Trussell, R.R.: *J AWWA*, **93**, 58 (2001).

20. Guillette, L.H.: *Hum. Ecol. Risk Assess.*, **1**, 25 (1995).
21. Cunningham, S.D.; Ow, D.W.: *Plant. Physiol.*, **110**, 715 (1996).
22. Hersch, P.: *Pollution Online Newsletter*, **2**, 16 (1999).
23. Cunningham, S.D.; Berti, W.R.; Juany, J.W.: *TIBTECH*, **13**, 393 (1995).
24. Watanabe, M.E.: *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 182 (1997).
25. Baker, A.J.M.; Brooks, R.R.: *Biorecovery*, **1**, 8 (1989).
26. Rugh, C.L.; Wilde, H.D.; Stach, N.M.; Thompson, D.M.; Summers A.O.; Meagher R.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3182 (1996).
27. Rugh, C.L.; Senecoff, J.F.; Meagher R.B.; Merkle S.A.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 925 (1998).
28. Anderson, T.A.; Guthrie, E.A.; Walton, B.T.: *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2630 (1993).
29. Newman, L.A.; Strand, S.E.; Choe, A.; Duffy, J.; Ekuan, G.; Ruszaj, M.; Shurtleff, R.B.; Wilmonth, J.; Heilman, P.; Gordon, M.P.: *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1062 (1997).
30. Goel, A.; Kumar, G.; Payne, G.F.; Dube, S.K.: *Nat. Biotechnol.*, **15**, 174 (1997).
31. Sandermann, H.: *Pharmacogenetics*, **4**, 225 (1991).
32. Sandermann H.: *TIBS*, **17**, 82 (1992).
33. Chromá, L.; Macková, M.; Macek, T.; Martínek, V.; Stiborová, M.: *Chem. Listy*, **95**, 212 (2001).
34. Vodrážka, Z.: *Biochemie (III)*, Academia, Praha, (1999).
35. Murashige T., Skoog F.: *Phys. Plantarum.*, **15**, 473 (1962).
36. Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J.M.: *Water Res.*, **39**, 4790 (2005).
37. Ternes, T.A.: *Trends in Anal. Chem.*, **20**, 419 (2001).

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Doc.Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a dobrého pracovního zázemí. Také moc děkuji všem spolupracovníkům z laboratoře za jejich ochotu kdykoli pomoci. Děkuji rodině a přátelům.