

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra organické a jaderné chemie**

**FYTOEXTRAKCE/FYTOTRANSFORMACE  
NAPROXENU**

**Bakalářská práce**

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233148735

PRAHA 2009

MARIE VACÍKOVÁ

Poděkování:

Děkuji:

Vedoucímu práce Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za obětovaný čas, poskytnuté informace, podnětné připomínky, jeho podporu a trpělivost při psaní této bakalářské práce a Ing. Šárce Pšondrové za odborný dohled a pomoc při experimentální části této práce.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÝ ÚVOD.....	8
3.1. Farmaka v přírodě.....	8
3.1.1. Vstup farmak do přírody .....	8
3.1.2. Rozdělení farmak ve vodě.....	9
3.1.2.1. Detekce farmak v pitné vodě .....	9
3.1.2.2. Detekce farmak v půdní vodě.....	10
3.1.2.3. Detekce farmak v povrchové vodě .....	12
3.2. Metody stanovení.....	14
3.3. Možnosti odstranění.....	15
3.4. Biologické metody čištění.....	16
3.4.1. Fytoextrakce .....	16
3.4.2. Fytodegradace .....	16
3.4.3. Rhizodegradace .....	16
3.4.4. Fytostabilizace.....	16
3.4.5. Fytoakumulace .....	17
3.4.6. Rhizofiltrace .....	17
3.4.7. Fytovolatilizace .....	17
3.5. Naproxen.....	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
4.1. Použitý materiál, přístroje a metody .....	19
4.1.1. Chemikálie .....	19
4.1.2. Rostlinný materiál .....	19
4.1.3. Přístroje .....	19

4.2. Příprava <i>in vitro</i> kultur.....	20
4.3. Fytoextrakce naproxenu.....	20
5. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	21
6. ZÁVĚR.....	26
7. SOUHRN.....	27
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	28
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	31

# 1. ÚVOD

V souvislosti s rozvojem komfortu života lidské populace se lidskou činností do ekosystému dostává řada cizorodých látek, které jsou obvykle označovány jako xenobiotika. Jedná se především o produkty tzv. spotřební chemie, tedy chemikálie či jejich směsi užívané v nejrůznějších oblastech zemědělské výroby, jako jsou pesticidy (herbicidy, fungicidy, insekticidy, apod.). Značné využití mají rovněž třeba chlorovaná rozpouštědla, různé anorganické chemikálie obsahující těžké kovy, aditiva do polymerů či potravinářská aditiva. Těmto látkám je již dlouho věnována zvýšená pozornost. V poslední době se však věnuje zvýšená pozornost i látkám, které doposud nebyly centrem zájmu, ale u kterých se prokázala reálná či potenciální možnost ovlivnění životního prostředí a následně i vliv na zdraví živých organismů. Tato skupina látek se označuje jako PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products), která zahrnuje jak humánní tak i veterinární léčiva ve všech svých formách výskytu (primární sloučeniny, metabolity) a složky produktů osobní péče (sprchových gelů, mýdel, zubních past, šampónů, kondicionérů, přípravků dekorativní kosmetiky, opalovacích krémů, parfémů apod.). Významný podíl na pronikání organických kontaminantů do životního prostředí představuje údržba domácností, včetně zvýšené péče o hygienu, kdy jsou používány nejrůznější čisticí prostředky s obsahem dezinfekčních látek a především prací prášky a aviváže, které obsahují kromě povrchově aktivních látek i řadu aditiv jako jsou bělicí látky, parfemační kompozice apod.

Rizikovost řady těchto látek spočívá především v jejich prokázané či potenciální schopnosti zasáhnout do systému hormonální regulace živočichů v důsledku dlouhodobého tlaku nízkých koncentrací uvedených substancí. V odborné literatuře jsou označovány jako Endocrine disrupting chemicals (EDCs). Jsou to tedy látky ovlivňující endokrinní systém, většinou se uvádí jejich estrogenní efekt, přičemž samotné sloučeniny nejsou aktivní vůči receptorům estrogenů. Jejich působení spočívá v narušení hierarchie řízení exkrece endokrinních hormonů v organismu.

V důsledku uvedených skutečností sílí snahy o nalezení způsobu odstranění diskutovaných látek pokud možno přímo u zdrojů, tedy výpustí z čistíren odpadních vod. Jednou z možných technologií je metoda kořenových čistíren, tedy metoda fytoextrakce reziduí pomocí hydroponicky pěstovaných rostlin. Metoda je ekonomicky i esteticky výhodná a představuje biotechnologickou alternativu k čistě technickým řešením.

## 2. CÍL PRÁCE

V rámci studia možností eliminace reziduí farmak ze životního prostředí je nutné studovat především léčiva, u nichž je vysoká spotřeba a která nejsou vázána na lékařský předpis. Práce se zaměřuje na studium fytoextrakce nově zavedeného nesteroidního analgetika naproxenu (Nalgésin S tbl. , Emoxen gel), u něhož je předpoklad vysoké spotřeby. Fytoextrakční děj je studován v *in vitro* systému kultivovaných sterilních rostlin.

Práce představuje:

1. Přípravu sterilních *in vitro* celých rostlin kukuřice, slunečnice, lnu a řepky.
2. Kultivace v mediu obohaceném o různé koncentrace naproxenu.
3. Odběr vzorků v časových intervalech z kultivačních experimentů.
4. Vyhodnocení extrakční schopnosti zvolených rostlinných druhů.

## 3. TEORETICKÝ ÚVOD

### 3.1. Farmaka v přírodě

#### 3.1.1. Vstup farmak do přírody

Farmaka, tak jako všechny ostatní látky, které se dostávají do organismu člověka, nebo do organismu zvířat, jsou právě lidmi či zvířaty resorbovány a následně podléhají různým metabolickým procesům. Část těchto farmakologických látek je využita, ale značné podíly a zbytky jsou pak vylučovány v nezměněné, nemetabolizované formě, nebo jako aktivní metabolity, a to prostřednictvím moče či fekálií. Poté jsou odváděny do odpadních vod či splašků. Ne všechny tyto odpadní látky jsou zachycovány nebo rozloženy v čistírnách odpadních vod, což způsobuje jejich vstup do životního prostředí. Ke kontaminaci životního prostředí však může docházet nejen tímto způsobem, ale také nezodpovědným zacházením s prošlými či nespotřebovanými léky, splachovanými třeba do kanalizace, případně stejnou manipulací s jinými nebezpečnými látkami z domácností, nebo z výrobních zařízení. Splachování nepoužitých léků do toalet nemusí mít až takový význam, jako je kontinuální vyměšování používaných léků z organismů lidí a zvířat. Dokonce i léčiva používaná na sklonku našich životů, se mohou vyluhovat do zemin hřbitovů a následně pak do podzemních vod.

Například v roce 2002 U.S. Geologický výzkum<sup>1</sup> provedl celostátní studii objevujících se imisí ve vodách. Testoval léky a osobní hygienické prostředky v několika lokalitách v 139 řekách ve 30 státech a objevil široký okruh biologicky aktivních sloučenin v téměř 80% z těchto lokalit, dokonce i ve vzdálených oblastech.

Osudy humánních a veterinárních léčiv vylučovaných močí a fekáliemi jsou různé. Vylučované humánní léky mohou projít čistírnami odpadních vod a dostat se do řek a jiných povrchových vod. Veterinární léčiva mohou velice snadno přímo znečistit půdu a podzemní vody. Hněj, močůvka a ostatní produkty živočišné výroby v zemědělství jsou důležitým zdrojem živin pro ornou půdu, zároveň však mohou obsahovat rezidua veterinárních léčiv či krmivových aditiv. Po dešťových srážkách může docházet k vyplavení těchto cizorodých látek z polí a luk a k následné kontaminaci povrchových vod.

### 3.1.2. Rozdělení farmak ve vodě

#### 3.1.2.1. Detekce farmak v pitné vodě

V důsledku rostoucí lidské populace ve světě a stále zvyšujícího se spotřeby vody pro průmysl a zemědělství, se zvyšuje nutnost a potřeba, aby se znovu využívala pro opětné použití i odpadní voda, jako voda užitková, ale také jako doplňující zdroj vody pitné. To zvyšuje riziko průniku nežádoucích látek do vodních zdrojů. Cizorodé látky mohou rovněž penetrovat z kontaminovaných vodních toků do podzemní vody a objevit se v různých koncentracích v pitné vodě. Některé látky objevující se v okolí zdrojů podzemních vod jsou absorbovány v zemině, jiné hladce procházejí do podzemních vodních rezervoárů. Standardní proces pro úpravu pitné vody v úpravárnách není schopen odstranit nízké koncentrace organických látek a tedy i farmak.

Řada studií prokázala, že v jižní Francii byly povrchových vodách nalezeny léky proti horečce a bolesti hlavy - diklofenak a karbamazepin.<sup>2</sup> Diazepam byl objeven v ošetřené pitné vodě v Milanu v Itálii. V Berlíně zjistili několik ng/L diklofenaku. Berlínské vzorky z vodovodních kohoutků obsahovaly klofibrovou kyselinu v koncentracích až do 165 ng/l.<sup>3</sup>

Frick objevil tři široce užívané volně prodejné léky - kofein, kotinin a acetaminofenon.<sup>4</sup> Stackelberg s kolegy identifikovali 17 organických kontaminujících látek včetně karbamazepinu (0.258 ng/l) v upravené pitné vodě.<sup>5</sup> Loraine et al. identifikovali ibuprofen (0.93 ng/l) a ibuprofen metylester (4.95 ng/l).<sup>6</sup> Tauber objevil karbamazepin a gemfibrozil. Často lze ve vodovodní vodě nalézt i rezidua antibakteriálních substancí jako sulfonamidů, linkomycinu, tetracyklinů a makrolidových antibiotik.<sup>7</sup>



### 3.1.2.2. Detekce farmak v půdní vodě

Z hlediska kontaminace potravních řetězcům stejně jako z hlediska průniku do podzemních vod je třeba zjišťovat i koncentrace léčiv v půdní vodě. Pro praktické účely byly látky rozděleny do šesti skupin dle použitých analytických metod.<sup>8</sup>

V tabulce 1 ve skupině 1 jsou diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, indometacin, naproxen, fenoprofen používány jako analgetika, antipyretika, antiflogistika nebo antirevmatika. Klofibrová kyselina, bezafibrát, gemfibrozil, etofibrát, fenofibrát, fenofibrátová kyselina jsou farmaka snižující cholesterol (hypolipidemika), karbamazepin je antiepileptikum, které je často používáno jako i jako antidepresivum. Pentoxifilin je používán jako vazodilatátor a diazepam jako trankvilizér.

Skupina 2 obsahuje analgetika (fenazon, dimethylaminofenazon, propyfenazon),  $\beta$ -blokátory (metoprolol, propranolol, atenolol, bisoprolol, sotalol, pindolol, betaxolol), broncholytika a sekretolytika (salbutamol, klenbuterol, terbutalin), dvě neoplastická farmaka (ifosfamid, cyklofosfamid) a cholesterol snižující látku simvastatin.

Skupina 3 obsahuje čtyři X-ray kontrastní média.

Skupiny 4, 5 a 6 obsahují antibiotika odlišného typu, hlavně sulfonamidy (skupina 4), makrolidy (skupina 5) a peniciliny (skupina 6)

Analytické metody použité u těchto farmak jsou uvedeny v kapitole 3.2.

Tab.1 - Klasifikace farmak dle skupin v půdní vodě

Skupina I.	diklofenak	ibuprofen	ketoprofen
	indometacin	naproxen	fenoprofen
	klofibrová kyselina	bezafibrát	gemfibrozil
	etofibrát	fenofibrát	fenofibrátová kyselina
	karbamazepin	pentoxifilin	diazepam
Skupina II.	fenazon	dimethylaminofenazon	propyfenazon
	metoprolon	propranol	atenolol
	bisoprolol	sotalol	pindolol
	betaxolol	salbutamol	klenbuterol
	terbutalin	ifosfamid	cyklofosfamid
	simvastatin		
Skupina III.	jopamidol	jopromid	jomeprol
	amidotriziová kyselina		
Skupina IV.	sulfametoxazol	sulfadiazin	sulfadimidin
	sulfamerazin	ronidazol	metronidazol
	furazolidon	trimetoprim	dapson
Skupina V.	chloramfenikol	virginiamycin	oleandomycin
	erytromycin	anhydro-erytromycin	roxitromycin
	klarithromycin	spiramycin	tylosin
Skupina VI.	amoxicillin	oxacillin	kloxacillin
	dikloxacillin	nafcillin	penicillin G
	penicillin V		

### 3.1.2.3. Detekce farmak v povrchové vodě

V povrchové vodě se často vyskytují analgetika - antipyretika (diklofenak a ibuprofen).<sup>9</sup> Ibuprofen je metabolizován oxidací a konjugací s kyselinou glukuronovou a vylučován v moči, méně než 10% je vyloučeno v nezměněné formě. Přibližně 65% diklofenaku je vyloučeno jako glukoronid a konjugát sulfátu hydroxylovaného metabolitu v moči a přibližně 35% se vylučuje v konjugované formě žlučí. Dále byl v povrchové vodě detekován nemodifikovaný gemfibrozil s koncentrací 0,5µg/l.<sup>10</sup> Klofibrová kyselina, jako hlavní metabolit fibrátů, je jednou z nejčastěji objevených chemikálií v monitorování stavu životního prostředí, co se týče léků. Byla nalezena v odpadních vodách, povrchových vodách, podzemní vodě a v mořské vodě. Klofibrová kyselina je považována jako jeden z nejvíce perzistentních lékových reziduí s odhadovaným přetrváním 21 let v životním prostředí. Jako další kardiovaskulární farmaka a reducenti cholesterolu se zde nacházejí atorvastatin a simvastatin.<sup>11</sup> Jsou zde k nalezení i β – blokátory.<sup>12</sup> Antidepressiva jsou zde zastoupena v podobě farmak: prozaku, zolofu, paxilu a celaxu. Antibiotika jsou rozřazovány více než do 10 tříd: 6 z nich (aminoglykosidy, β-laktamy, makrolidy, fluorochinolony, sulfonamidy, a tetracykliny) jsou důležité v lidské i veterinární medicíně. Tetracykliny použitelné pro lidskou i veterinární medicínu jsou hlavně zastoupeny v podobě chlortetracyklinu, oxytetracyklinu a tetracyklinu v maximálních koncentracích 0.69, 0.34, a 0.11 µg/l.<sup>13</sup>

**Tab.2 - Koncentrace naproxenu v povrchové vodě**

<b>NAPROXEN</b>			
<b>Povrchová voda</b>	<b>Nalezené množství [ng/l]</b>	<b>období</b>	
Greifensee (Švýcarsko)	n.d. - 10	říjen 1999	14
Abach	10 - 400		
Llobregat (Španělsko)	n.d. - 17	červen - listopad 2000	15
Cardener (Španělsko)	n.d. - 234		
Anoda (Španělsko)	n.d. - 120		
Rubí (Španělsko)	866 - 2000		
Tibera (Řím, Itálie)	n.d. - 22		
Baracciano (Itálie)	7 - 15	červenec - listopad 2002	16
Vico (Itálie)	n.d. - 1		
Mississippi (Louisiana)	37 - 39		
Pontchartrain (Louisiana)	22 - 107	2002	17
říční voda (Německo)	až 390	listopad 1995 - červen 1996	18
Španělsko, Belgie, Německo, Slovinsko	70	2006	19

Pozn. n.d. = pod mezí detekce

## 3.2. Metody stanovení

Metody stanovení sloučenin<sup>20</sup> uvedených v tabulce 1 jsou založeny na extrakci na pevné fázi a následujícím stanovení analytů HPLC – MS-MS(ESI) nebo GC –MS. V mnoha případech je MS detekce schopna zajistit spolehlivé stanovení a identifikaci příslušné cílové sloučeniny.

Analýza léčiv jako jsou diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, indometacin, naproxen, fenoprofen, klofibrová kyselina, bezafibrát, gemfibrozil, etofibrát, fenofibrát, fenofibrová kyselina, karbamazepin, pentoxifilin a diazepam se provádí GC –MS po extrakci na pevné fázi na RP-C<sub>18</sub> a derivatizaci.

Pro analýzu fenazonu, dimethylaminofenazonu, propyfenazonu, metoprololu, propranololu, atenololu, bisoprololu, sotalolu, pindololu, betaxololu, salbutamolu, klenbuterolu, terbutalínu, ifosfamidu, cyklofosfamidu a simvastatinu se používá detekce HPLC –MS – MS (ESI) po extrakci na pevné fázi obvykle na PPL Bond – Elut materiálu.

Analýza čtyř ionizujících X-ray kontrastních médií jopamidolu, jopromidu, jomeprolu a amidotriziové kyseliny se provádí pomocí HPLC –MS – MS(ESI) po extrakci na pevné fázi na LiChrolut EN materiálu.

Analýza antibiotik obsažených ve skupině 4, 5 a 6 se provádí HPLC –MS –MS(ESI) po společné extrakci na pevné fázi na Isolut ENV+ materiálu.

Ionizace elektrosprejem patří mezi ionizační techniky, které umožňují určení molekulové hmotnosti i pro sloučeniny, u kterých není pozorován molekulární ion. Hmotnostní spektra získaná touto ionizační technikou jsou vhodná pro určení molekulové hmotnosti neznámé látky, ale nevýhodou může být malé množství fragmentových iontů, což znesnadňuje odvození struktury. Řešením může být použití tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC. Typy spojení mohou být: s přímým spojením eluátu, spojení s nekonečným pásem, termosprejem, průtokovou sondou pro ionizaci. Při ionizaci elektrosprejem prochází eluát po výstupu z chromatografické kolony kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí. Na konci kapiláry jsou malé kapičky, které nesou buď kladný nebo záporný náboj, podle polarit vložení napětí. Postupným odpařováním se zmenšují kapičky a zvyšuje se hustota povrchového náboje, až se uvolní molekulární protonovaný iont při snímání kladných iontů, či deprotonovaný molekulární iont při snímání záporných iontů.<sup>21</sup>

### 3.3. Možnosti odstranění

Jednou z možností, jak odstranit kontaminaci životního prostředí, je využití tzv. přirozené atenuace. Proces přirozeného snižování kontaminace (přirozená atenuace – MNA) je souhrn dějů přirozeně se vyskytujících v životním prostředí, které bez lidského zásahu vedou k omezení množství, toxicity, mobility, objemu nebo koncentrace kontaminantů. Umělou technologii vycházející z principu přirozené degradace kontaminantů představuje fytoemediacce. Při fytoemediacích se mohou uplatňovat čtyři různé procesy: extrakce kontaminantů z půdy a vody (hlavně iontů těžkých kovů a radionuklidů), degradace organických sloučenin, volatilizace organických sloučenin (ale také některých sloučenin anorganických jako např. sloučenin Hg, Se a As) a stimulace mikrobiálního metabolismu v rhizosféře. Fytoemediacční techniky se dělí podle typu kontaminantu a jeho zpracování rostlinami.

Mechanismus fytoemediacčního odstranění iontů těžkých kovů může být zjednodušeně popsán jako odstranění kovů z půdy jejich transportem do kořenů, stonků a listů. Rostliny jsou následně sklizeny a odstraněny a plocha je opět osázena rostlinami do té doby, než se koncentrace kovů v půdě sníží na přijatelnou hladinu.

V případě organických látek se enzymy v kořenech rostlin účastní degradace organických kontaminantů. Fragmenty jsou pak zabudovány v nové rostlinné biomase. Fytodegradace využívá rostlinných enzymů k modifikaci či rozložení molekul. Enzymy schopné modifikovat organické látky tím, že vytvářejí postranní skupiny na organických sloučeninách a tím zvyšují rozpustnost a umožňují konjugaci, hrají ve výchozích krocích fytodegradace významnou roli. Mezi tyto skupiny enzymů účastnících se fytodegradace patří dehalogenasy, mono- a dioxygenasy, peroxidasy, peroxygenasy, karboxylesterasy, nitrilasy, fosfatasy a nitroreduktasy.

## **3.4. Biologické metody čištění<sup>22</sup>**

### **3.4.1. Fytoextrakce**

Fytoextrakce využívá vysázení rostlin na kontaminovanou plochu. Po akumulaci kontaminantů v rostlině jsou rostliny sklizeny a dále zpracovány tepelně, mikrobiálně nebo chemicky. Metoda se hlavně užívá pro odstranění toxických kovů. Hyperakumulátory jsou takové rostliny, které jsou tolerantní vůči přítomnosti těžkých kovů v půdě a navíc jsou schopné akumulovat kovy do vysoké koncentrace bez nepříznivého vlivu na jejich růst. Při výběru rostlin pro fytoextrakci kovů se zohledňují požadavky jako je schopnost akumulovat více druhů kovů, odolávat jejich vysokým koncentracím v půdě a tvořit dostatečné množství biomasy.

### **3.4.2. Fytodegradace**

Při fytodegradaci dochází k absorpci, transportu a přeměně kontaminantu uvnitř rostliny. Dochází i k snižování koncentrace kontaminantu v důsledku uvolňování enzymů do rhizosféry. Používá se především pro odstraňování organických polutantů (PAH, PCB, výbušniny, detergenty).

### **3.4.3. Rhizodegradace**

Na základě zvýšení množství půdních bakterií v půdě díky kořenovému systému vysázených rostlin, se snižuje množství kontaminantu v půdě. Kořeny vylučují do půdy mnoho organických sloučenin (např. cukry nebo alkoholy), jež se stávají potravou pro půdní bakterie. Při dostatku živin počet mikroorganismů vzrůstá a dochází ke stimulaci jejich aktivity, což je důležité pro odbourávání okolních polutantů.

### **3.4.4. Fytostabilizace**

Fytostabilizace využívá rostliny k imobilizaci vodních a půdních kontaminantů. Závisí na chemických, biologických a fyzikálních vlastnostech půdy. Kořenový systém díky adsorpci, absorpci, komplexaci a precipitaci snižuje možnost vymývání kontaminantu z půdy, sedimentů a kalů. Při fytostabilizaci se dále uplatňuje vliv produkce huminových látek, které váží kontaminant v půdě. Svým vzrůstem rostliny také zabraňují vodní a větrné erozi, čímž zamezují rozptylu kontaminace. Fytostabilizace lze užít tam, kde je potřeba

obnovit vegetační pokrývku, ale kvůli vysoké kontaminaci nelze na zasaženém území aplikovat běžnou vegetaci.

#### **3.4.5. Fytoakumulace**

Je metoda založená na absorpci kontaminantu kořeny rostliny s následnou akumulací v nadzemní části rostliny. Následuje sklizeň rostlin, se kterými se zachází jako s odpadem. Nutným předpokladem pro fungování metody je hyperakumulační vlastnost rostlinného druhu vůči sanovanému kontaminantu. Metoda se s úspěchem používá při sanaci iontů těžkých kovů, polokovů (As, Se), radionuklidů a nekovů (např. B), avšak není příliš vhodná pro organické látky, které mohou být rostlinou metabolizovány na toxičtější sloučeninu nebo mohou být rostlinou odpařeny do ovzduší.

#### **3.4.6. Rhizofiltrace**

Rhizofiltrace se aplikuje při odstraňování kontaminantu z povrchových, splaškových nebo vyčerpaných podzemních vod použitím kořenového systému rostlin. Dochází k precipitaci kontaminantu na kořenovém systému, nebo k absorpci přímo v kořenech. Při rhizofiltraci jsou cílovou částí rostliny kořeny.

#### **3.4.7. Fytovolatilizace**

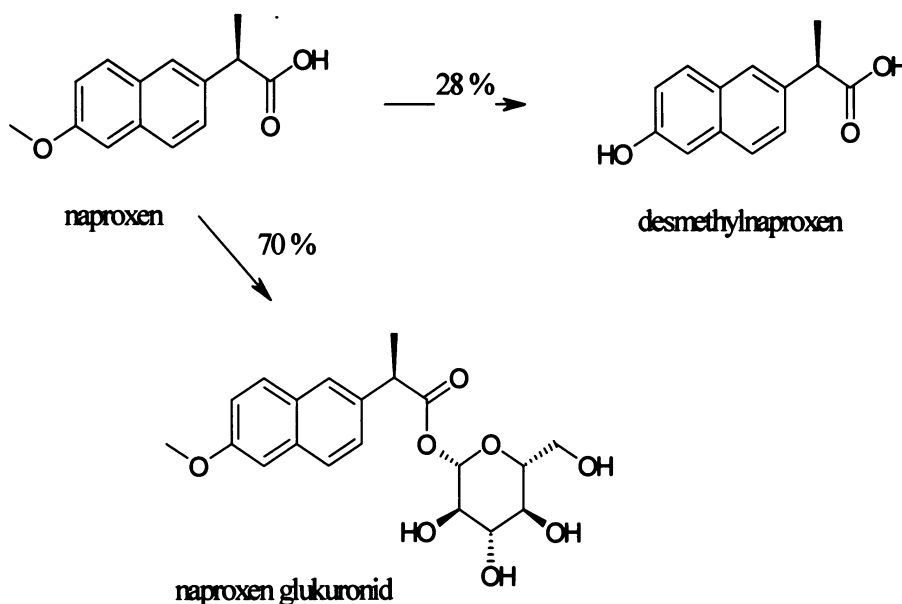
Při fytovolatilizaci dochází k příjmu kontaminantu kořenovým systémem rostliny a transportu do nadzemní části, v některých případech ještě následovaný biotransformací kontaminantu. Poté proběhne transpirace těkavého kontaminantu, těkavého produktu metabolismu, nebo těkavé formy původně netěkavé látky. Metodu lze aplikovat spíše při odstraňování organických polutantů, jako je např. MTBE a jiných složek benzínu.



### 3.5. Naproxen

Naproxen (Kyselina [2-(6-methoxynaftalen-2-yl)] propanová)<sup>23</sup> je podáván ve formě sodné soli a je rychle a úplně vstřebáván z trávicího traktu. Maximální plazmatická koncentrace se objevuje po 1 až 2 hodinách. Plazmatická koncentrace naproxenu roste lineárně do dávky zhruba 500 mg, se zvyšující dávkou se mění už jen velmi málo. Důvodem je zvýšení jaterní clearance. Biologický poločas je 12-15 hodin a 95% látky či metabolitu je vyloučeno močí, zbytek stolicí. Přibližně 70 % látky je vyloučeno v nemetabolizované formě (10 % jako volná látka, 60 % jako konjugát s glukuronovou kyselinou). Zbytek je metabolizován na 6-desmethyl-naproxen (Obr. 1).

Obr.1 - Struktura naproxenu a jeho metabolitů<sup>24</sup>



Spotřeba naproxenu je poměrně vysoká, i když zdaleka nedosahuje hodnot uváděných pro ibuprofen a diklofenak. Svoji roli hraje zřejmě i to, že je to léčivo relativně nové a jeho spotřeba bude ještě stoupat. V Anglii se udává spotřeba asi 35 tun účinné substance za rok.<sup>25</sup> Podle údajů SÚKL byl počet distribuovaných kusů balení s léčivou látkou NPX v ČR asi 699 tisíc.<sup>26</sup>

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Použitý materiál, přístroje a metody

#### 4.1.1. Chemikálie

Anorganické chemikálie pro přípravu kultivačního media byly v kvalitě vhodné pro analýzu (Lach-Ner), myo - inositol byl v kvalitě pro tkáňové kultury (Sigma), jako sacharosa byl použit komerční krystalový cukr. Naproxen byl pořízen od firmy Aldrich. Rozpouštědla pro HPLC (methanol, acetonitril) byla HPLC kvality, kyselina octová p.a. byla od firmy Fluka . Voda pro přípravu medií i jako komponenta mobilní fáze byla připravena na přístroji Demiwa 3roi..

#### 4.1.2. Rostlinný materiál

Jako biologický materiál byla použita semena následujících druhů a kultivarů:

- Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Extrasol, (Monsanto)
- Kukuřice setá (*Zea mays*) hybrid DKC2971 (Monsanto)
- Len setý (*Linum usitatissimum*) (Oseva Agro Brno)
- Řepka olejka (*Brassica napus*) cv.Catalina (Monsanto)

#### 4.1.3. Přístroje

Ke sterilním pracím byl použit laminární box BHSL Labox, kultivace byly prováděny v kultivačních boxech TCH 100 9 (Laboratorní přístroje, Praha) při teplotě 25 °C a světelném režimu 12 h světlo/12 h tma. Pro nastavení pH media byl použit pH metr IQ (Scientific Instruments)

HPLC analýzy byly provedeny na chromatografickém zařízení INCOS. Přístroj se skládal z vysokotlakého čerpadla INCOS LCP 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS LCS 5000. Pro měření byla použita kolona o rozměrech 4,4 x 250 mm se sorbetem Reprosil 100 -C18 (Watrex). Detekce byla prováděna při vlnové délce 270 nm. Nástřik vzorku byl standardně prováděn automatickým dávkovačem v objemu 20 µl. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril: methanol: voda (4:4:2, v/v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Ke zpracování a vyhodnocení

naměřených hodnot byl použit chromatografický program Clarity (Data Apex), koncentrace byly určeny dle kalibrační závislosti, mez detekce 0,05 mg/l.

## 4.2. Příprava *in vitro* kultur

Semena kukuřice, lnu, hrachu, řepky a slunečnice byla před nasazením na živné médium sterilizována 70% ethanolem po dobu 1 minuty a poté roztokem chlornanu sodného (10% SAVO) dvakrát 20 minut. Poté byla semena třikrát promyta sterilní destilovanou vodou, při třetím promývání byla semena ponechána ve sterilní destilované vodě. Takto upravená semena byla za sterilních podmínek v laminárním boxu vysázena do sterilních kultivačních baněk s živným médiem. Pro semena kukuřice byly použity 500 ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml živného média a sázelo se po 5 semenech. Pro hrách, len a slunečnice byly použity 250 ml Erlenmayerovy baňky s 10 ml kultivačního média a sázelo se po 5-6 semenech. Jako živné médium bylo použito medium dle Murashiga a Skooga.<sup>27</sup> Obohacené o myo-inositol (100 mg/l) a sacharosu (30 g/l), pH bylo upraveno před sterilizací na hodnotu 5,8. Kultivace rostlin probíhala v kultivačních boxech při 25 °C a světelném režimu 12h světlo/12 h tma. Při nedostatku média v kultivaci bylo za sterilních podmínek přidáno další medium stejného složení. Po zhruba třech týdnech dosáhly rostliny optimální velikosti pro další experimenty.

## 4.3. Fytoextrakce naproxenu

Medium s naproxenem bylo připraveno přidáním vypočteného množství vodného roztoku naproxenu ke sterilnímu mediu tak, aby koncentrace testované látky byla v rozsahu přibližně 8 – 20 mg/l. Takto byly připraveny zásobní roztoky sterilního média o různých koncentracích naproxenu.

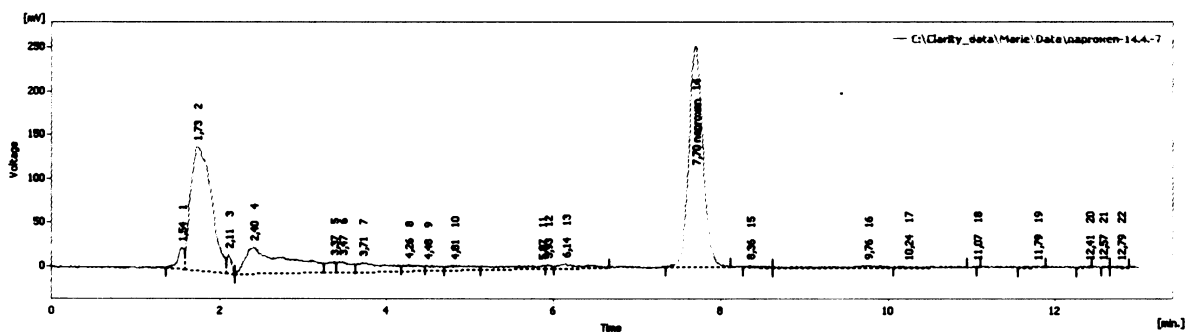
Za sterilních podmínek byly z kultivačních baněk s rostlinami odstraněny zbytky původního média a přidáno čerstvé medium obsahující naproxen. Ihned po přidání byl odebrán kontrolní vzorek (1 ml) k stanovení aktuální výchozí koncentrace naproxenu v experimentu. Rostliny byly dále kultivovány za výše popsaných podmínek. Vzorky média byly poté odebírány v intervalu 24 hodin a analyzovány HPLC, kde byla určena aktuální koncentrace testované látky v příslušném čase. Experimenty u nichž se projevil vliv kontaminace byly z vyhodnocení vyřazeny.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Fytoextrakce naproxenu, jako v ČR relativně nového nesteroidního analgetika s protizánětlivými účinky, byla provedena na čtyřech rostlinných species, u kterých jsou známé fytoextrakční charakteristiky pro další látky ze stejné farmakoterapeutické skupiny, jako je ibuprofen a diklofenak.<sup>28</sup>

Aktuální koncentrace na mediu dopovaném o různé koncentraci naproxenu byly stanovovány HPLC přímým nástřikem media, což dovolilo zpracovat poměrně velké množství vzorků a experimenty byly ukončeny v okamžiku, kdy nebyla nalezena měřitelná koncentrace naproxenu, nebo když byla pozorována mikrobiální či plísňová kontaminace kultivované rostliny či media. Příklad chromatogramu je uveden na obr. 2., kde je zřejmý signál naproxenu při 7,70 min a jeho dostatečná separace od dalších složek media.

Obr. 2 – Chromatogram naproxenu v kultivačním mediu (přímý nástřik kultivačního media za podmínek uvedených v materiálech a metodách).



V následující tabulce 3 jsou uvedeny výchozí koncentrace a čerstvá hmotnost rostlin po posledním odběru. Aktuální koncentrace byly stanoveny HPLC/UV a jsou uvedeny v procentech výchozí koncentrace ( - jsou označeny výsledky, které byly pod mezí detekce).

Tab . 3 – Časový průběh extrakce naproxenu rostlinami kukuřice

<b>Kukuřice setá hybrid DKC2971</b>						
<b>Experiment č.</b>	<b>Výchozí koncentrace [mg/l]</b>	<b>Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]</b>				<b>Hmotnost rostliny [g]</b>
		<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	
1	11,99	100	1,8	-	-	14,4
2	18,08	100	9,7	1,3	0,4	16,8
3	19,95	100	2,7	0,6	-	17,3
4	20,86	100	25,9	0,3	-	17,3
5	20,97	100	3,9	-	-	8,3

V případě rostlin kukuřice došlo k rychlému úbytku koncentrace naproxenu v mediu během prvních 24 hodin na průměrnou hodnotu pod 9 % výchozí koncentrace. Reálně je extrakce zřejmě ještě účinnější, protože jedna měřená hodnota silně vybočuje z hodnot naměřených u ostatních kultivací. Po 72 hodinách již byl naproxen nalezen jen u jedné kultivace z pěti vyhodnocovaných. Jak je zřejmé z tabulky 3, kde je znázorněn časový průběh fytoextrakce, není účinnost v relaci s množstvím biomasy ani s výchozí koncentrací a naproxen je rostlinami prakticky úplně extrahován.

V tabulce 4 jsou uvedena data z experimentu s rostlinami slunečnice. Po 48 hodinách extrakce již nebyly u čtyřech z pěti experimentů nalezeny měřitelné koncentrace naproxenu a data ukazují určitou závislost na množství biomasy v experimentu. Ve srovnání s rostlinami kukuřice je extrakce slunečnicí zjevně účinnější. Dále jsou uvedeny výchozí koncentrace a čerstvá hmotnost rostlin po posledním odběru. Aktuální koncentrace byly stanoveny HPLC/UV a jsou uvedeny v procentech výchozí koncentrace ( - jsou označeny výsledky, které byly pod mezí detekce).

Tab . 4 – Časový průběh extrakce naproxenu rostlinami slunečnice

<b>Slunečnice roční</b>					
<b>Experiment č.</b>	<b>Výchozí koncentrace [mg/l]</b>	<b>Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]</b>			<b>Hmotnost rostliny [g]</b>
		<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	
1	16,58	100	8,6	-	7,1
2	17,44	100	33,0	1,7	3,2
3	17,8	100	21,0	-	4,2
4	18,77	100	8,9	-	6,6
5	19,51	100	7,8	-	6,9

V následující tabulce 5 je uveden časový průběh extrakce naproxenu rostlinami lnu setého, a výchozí koncentrace v experimentech. Aktuální koncentrace byly stanoveny HPLC/UV a jsou uvedeny v procentech výchozí koncentrace.

Tab. 5 – Časový průběh extrakce naproxenu rostlinami lnu

<b>Len setý</b>					
<b>Experiment č.</b>	<b>Výchozí koncentrace [mg/l]</b>	<b>Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]</b>			
		<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	
1	12,18	100	80,6	36,9	
2	12,21	100	76,2	31,0	
3	13,09	100	57,2	19,0	
4	13,62	100	60,8	23,6	
5	19,53	100	95,0	39,8	

V případě pokusů s rostlinami lnu setého dochází k menšímu poklesu koncentrace naproxenu v mediu, což může být dáno jak menší schopností rostlinné species extrahovat studovanou látku. Dalším důvodem však může být velmi malé množství biomasy tvořené v *in vitro* kultuře. Čerstvá hmotnost nebyla v tomto případě stanovena, protože se jedná o velmi malé rostliny, které jsou vitrifikovány. Při interakci s xenobiotikem se vizuálně vitrifikace ještě zvýšila a proto byl pokus po 48 hodinách ukončen.

V následující tabulce 6 je časový průběh extrakce naproxenu rostlinami řepky olejky, a výchozí koncentrace v experimentech. Aktuální koncentrace byly stanoveny HPLC/UV a jsou uvedeny v procentech výchozí koncentrace. Fytoextrakce rostlinami řepky olejky se vyznačovala poměrně vysokou diverzitou, kde stupeň fytoextrakce zjevně nezávisí na výchozí koncentraci. Experimenty byly ukončeny po 72 hodinách, kdy byly nalezeny koncentrace uvedené v tabulce. Čerstvá hmotnost rostlin nebyla podobně jako u lnu stanovena z důvodu vitrifikace kultury.

**Tab. 6 – Časový průběh extrakce naproxenu rostlinami řepky**

<b>Řepka olejka</b>					
<b>Experiment č.</b>	<b>Výchozí koncentrace [mg/l]</b>	<b>Koncentrace v čase t [% výchozí koncentrace]</b>			<b>Koncentrace v mediu po 48 h [mg/l]</b>
		<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	
1	8,96	100	95,3	30,2	2,7
2	11,63	100	70,9	18,1	2,1
3	13,14	100	63,9	27,9	3,7
4	16,53	100	38,4	3,9	0,6
5	18,23	100	40,9	7,7	1,4

Z uvedených výsledků je zřejmá poměrně účinná extrakce naproxenu z vodného media. Srovnáním s výsledky extrakce dalších látek stejné farmakoterapeutické skupiny jako ibuprofen a diklofenak, byla nalezena vyšší účinnost rostlin pro extrakci naproxenu. Z chromatografických dat, kde nebyl nalezen signál metabolitu vylučovaného do media vyplývá, že naproxen dobře vstupuje do kořenové části a zůstává imobilizován v rostlině. Transport do nadzemních částí nebyl vyhodnocován a vyžadoval by využití izotopicky modifikované sloučeniny.



## 6. ZÁVĚR

Z výsledků vyplývá, že naproxen je podstatně lépe extrahován z kapalného média, než obdobné farmakoterapeutické látky s podobnou strukturou jako je ibuprofen, nebo diklofenak. Podstatným je fakt, že zachycený naproxen přetrvává v rostlině a nezpůsobuje sekundární kontaminaci vlivem vylučování látek z kořenového systému do rhizosféry. Z jiného pohledu pak lze očekávat určité množství naproxenu v ekosystému a v rostlinách kultivovaných na kontaminovaných plochách či při pobřeží řek, do kterých ústí výpustě čistíren odpadních vod.

## 7. SOUHRN

V posledních letech se začal používat v ČR nový typ analgetika s názvem naproxen. Chemicky je látka obdobná známému analgetiku ibuprofenu. Vzhledem k tomu, že ve státech, kde je jeho užívání zavedeno již déle a byla jeho určitá množství nalezena v povrchových vodách, je i v ČR velká pravděpodobnost jeho výskytu v ekosystému. V práci byla studována fytoextrakce naproxenu v *in vitro* kulturách kukuřice seté, slunečnice roční, lnu setého a řepky olejky a to ze dvou hledisek. Prvním byla možnost využití těchto rostlin k odstranění naproxenu z vod metodou kořenové filtrace a druhou potom možnost vstupu naproxenu do rostlinných tkání a potenciální nebezpečí kontaminace potravních řetězců. U všech rostlinných druhů byla prokázána schopnost extrahovat naproxen z vodných roztoků a nevratný záchyt v rostlinách.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T.: *Envir. Sci. Technol.* (2002), 36, 1202.
2. Rabiet, M.; Togola, A.; Brissaud, F.; Siedel, J. L.; Budzinski, H.; Elbaz-Poulichet, F.: *Envir. Sci. Technol.* (2006), 40, 5282.
3. Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Meyer, M. T.: *NGWA 4th International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water; Minneapolis, MN, (2004).* V *Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry;* Khetan, S. K.; Collins, T. J.: *Chem. Rev.* (2007), 107, 2319-2364.
4. Frick, E. A.; Henderson, A. K.; Moll, D. M.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.: *Georgia Water Resources Conference, Athens, GA, (2001).* V *Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry;* Khetan, S. K.; Collins, T. J.: *Chem. Rev.* (2007), 107, 2319-2364.
5. Stackelberg, P. E.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Zaugg, S. D.; Henderson, A. K.; Reissman, D. B.: *Sci. Tot. Envir.* (2004), 329, 99.
6. Loraine, G. A.; Pettigrove, M. E.: *Envir. Sci. Technol.* (2006), 40, 687.
7. Tauber, R.: *Quantitative analysis of pharmaceuticals in drinking water from ten Canadian cities; Enviro-Test Laboratories: Winnipeg, Manitoba, 2003.* V *Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry;* Khetan, S. K.; Collins, T. J.: *Chem. Rev.* (2007), 107, 2319-2364.
8. Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H.-J.; Blankenhorn, I.: *J. Chromatogr. A* (2001), 938, 199-210.
9. Buser, H. R.; Poiger, T.; Muller, M. D.: *Envir. Sci. Technol.* (1999), 33, 2529.
10. Zimetbaum, P.; Frishman, W. H.; Kahn, S. J.: *Clin. Pharmacol.* (1991), 31, 25.
11. Prueksaritanont, T.; Ma, B.; Fang, X. J.; Subramanian, R.; Yu, J.; Lin, J. H.: *Drug Metab. Dispos.* (2001), 29, 1251.

12. Kim, Y.; Choi, K.; Jung, J.; Park, S.; Kim, P. G.: *Envir. Int.* (2007), 33, 370.
13. Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T.: *Envir. Sci. Technol.* (2002), 36, 1202.
14. Óllers, S.; Winter, H. P.; Fässler, P.; Miller, S. R.: *J. Chromatogr. A* (2001), 911, 225.
15. Farré, M.; Ferrer, I.; Ginebreda, A.; Figueras, M.; Olivella, L.; Tirapu, L.; Vilanova, M.; Barceló, D.: *J. Chromatogr. A* (2001), 938, 187.
16. Marchese, S.; Perret, D.; Ventilu, A.; Curini, R.; Pastori, F.: *Chromatographia* (2003), 58, 263.
17. Boyd, G. R.; Reemtsma, H.; Grimm, D. A.; Mitra, S.: *Sci. Tot. Envir.* (2003), 311, 135.
18. Ternes, T. A.: *Wat. Res.* (1998), 32, 3245.
19. Hernanado, M. D.; Heath, E.; Petrovic, M.; Barceló, D.: *Anal. Bioanal. Chem.* (2006), 385, 985.
20. Hernando, M. D.; Heath, E.; Petrovic, M.; Barceló, D.: *Anal. Bioanal. Chem.* (2006), 385, 985-991, Trace-level determination of pharmaceuticals residues by LC-MS/MS in natural and treated waters
21. Holčapek, M.; Jandera, P.: *Chem. listy* (1998), 92, 278-286
22. Soudek, P.; Petrová, Š.; Benešová, D.; Koryta, J.; Vaněk, T.: *Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti*, *Chem. listy* (2008), 102, 346-352
23. Craig, C.R.; Stitzel, R.E.: *Modern Pharmacology With Clinical Applications*, Sixth Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2003), ISBN 978-0781737623  
<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC21000.doc>, staženo 24.3.2009
24. Bougie, D.; Aster, R.: *Blood* (2001), 97, 3846.
25. Rice, S. L.; Mitra, S.: *Anal. Chim. Acta* (2007), 589, 125.
26. <http://www.sukl.cz>, staženo 22.3.2009

27. Murashige, T.; Skoog, F.: *Physiol. Plant.* (1962), 15, 473-497.

28. Houdková B.: *Diplomová práce*, PřF UK Praha 2009.

## **9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

PPCPs – Pharmaceuticals and Personal Care Products

EDCs – Endocrine Disrupting Chemicals

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

MS – Mass Spectrometry

ES – Electrospray ionisation

NPX – Naproxen

SÚKL – Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv

GC – Gas Chromatography

## **Klíčová hesla**

Fytoremediace

Naproxen

In vitro kultury

## **Předmětová slova**

Fytotransformace naproxenu

Příprava in vitro kultur

Fytotransformace