

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické a jaderné chemie

Využití rostlinných biotechnologií
k odstraňování farmak ze životního
prostředí

Diplomová práce

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 30.5.2010

.....
podpis

Tato diplomová práce vznikla v rámci řešení výzkumného záměru MSM0021620857 a grantového projektu COST 8590C09024.

Seznam zkratek a symbolů

DMSO – dimethylsulfoxid

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

MS – medium dle Murashiga a Skooga

PPCPs –(Pharmaceutics and Personal Care Products), farmaka a prostředky osobní péče

NSA- nesteroidní antirevmatika

NSAID- nesteroidní protizánětlivé látky

TPH - ropné látky

PAH - polyaromatické uhlovodíky

PCB, TCE - chlorované alifatické a aromatické uhlovodíky

SPE – extrakce pevným sorbentem

BTEX - mírně hydrofobní organické kontaminanty jako benzen, toluen, ethylbenzen, a xylen a alifatické uhlovodíky s krátkým řetězcem

TLC – tenkovrstevná chromatografie

NPX – naproxen

DCF – diklofenak

IBU- ibuprofen

SAL- kyselina salicylová

ČOV- čistírna odpadních vod

ATC- anatomicko-terapeuticko chemická klasifikace

EDC- endokrinní disruptory

KOW -rozdělovací koeficient oktan-1-ol :voda,

KH - Henryho konstanta

POP- perzistentní organické polutanty

BFR- polybromované retardátory hoření

ICM- jodově kontrastní media

LC/MS - kapalinová chromatografie/ hmotnostní spektrometrie

DDT - dichlordifenyltrichlormethylmethan

pKa – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty

Obsah

	Prohlášení	2
	Seznam zkratk a symbolů	3
	Obsah	4
1.	Úvod	5
2.	Fytoremediace	9
3	Fytoextrakce	12
4	Fytodegradace	13
5	Rhizofiltrace	14
6	Fytovolatilizace	16
7	Fytostabilizace	17
8	Nenarkotická analgetika	18
8.1	Diklofenak	19
8.2	Naproxen	20
8.3	Ibuprofen	21
9.	Výskyt xenobiotik v životním prostředí	22
10.	Cíl práce	25
11.	Experimentální část	26
11.1	Chemikálie a přístroje	26
11.2	Kultivace rostlin a odběr vzorků	27
11.3	Izolace extrahovatelných reziduí a produktů biotransformace	29
12	Výsledky a diskuse	30
13	Závěr	43
14	Seznam literatury	45
15.	Abstrakt.....	48

1. Úvod

S rozvojem farmakoterapie se v druhé polovině minulého století zvýšila spotřeba výrobků užití chemie a léčiv. Tyto látky výrazně přispěly ke zlepšení kvality života, na druhé straně však jejich užívání způsobilo průnik, nových cizorodých chemikálií do životního prostředí a to především do vodních toků. Vznikla tak nová skupina cizorodých látek kontaminující ekosystém. V důsledku kontinuálního přísunu se tyto sloučeniny často považují za perzistentní polutanty i když mnohé z nich mohou být v ekosystému alespoň částečně rozloženy. Uvedená skupina sloučenin se shrnuje pod pojem definovaný americkou Environmental Protection Agency jako farmaka a produkty osobní péče (Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs) [1].

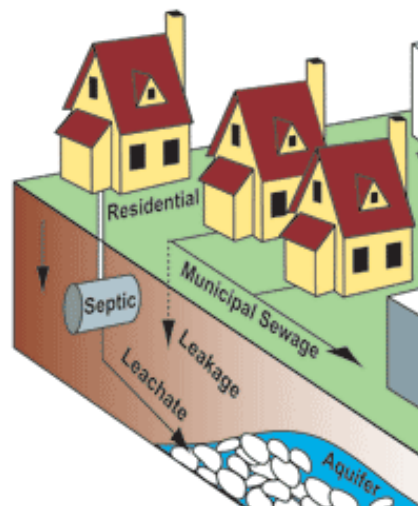
Mezi PPCPs patří nejrůznější léčiva, především paracetamol, kyselina acetylsalicylová, ibuprofen, diklofenak, antibiotika, antiepileptika, betablokátory, regulátory tuků, orální antikoncepční prostředky, cytostatika, antidepresiva či kontrastní látky a stopovače používané při vyšetřeních nebo např. aktivní látky opalovacích filtrů, tenzidy a parfemační substance přípravků osobní hygieny a pracích prášků. Současnými analytickými metodami zjišťují laboratoře přítomnost těchto látek a jejich metabolitů v podstatě ve všech větších řekách, a to jak ve vodě, tak i v sedimentech nebo tkáních vodních organismů [1].

Podle studie uveřejněné v prosinci 2002 v časopise *Environmental Health Perspectives* je množství PPCPs, které se do životního prostředí každoročně dostane, stejně velké jako množství použitých pesticidů [1,14]. Největšími znečišťovateli vodních zdrojů látkami z PPCP nejsou výrobci léčiv či kosmetických přípravků, ale jejich spotřebitelé. Prostorů zatěžují hlavně nemocnice a další zdravotnická zařízení, zemědělské závody (antibiotiky a hormonální prostředky přidávanými do krmení) a domácnosti. Metabolity léčiv se z organismu vylučují především do moči [7,15].

Výzkum se zaměřuje především na skupinu antibiotik a endokrinně aktivních substancí pronikajících do povrchových vod. Tyto dvě skupiny látek jsou v současné době považovány za nejvíce ekologicky nebezpečné. Antibiotika totiž mohou indukovat rezistenci u potenciálně patogenních bakteriálních kmenů a endokrinní látky, zejména rezidua

antikoncepčních přípravků, pak prokazatelně ovlivňují rozmnožovací schopnosti vodních organismů. Již od poloviny 90. let byla publikována řada výzkumů ukazujících, že jsou-li ryby vystaveny působení syntetických hormonálních přípravků, začne se u nich vytvářet bílkovina vitellogenin, která je přítomná hlavně v jikrách, popsány byly i případy, kdy se z exponovaných samců ryb vyvinuly samičky [6,16]. Jak se PPCP dostávají z domácností do podzemních vod je znázorněno na obr 1.

Již v roce 1976 tým z britského vládního Centra pro výzkum vod (Water Research Centre) uveřejnil zprávu „Steroids as Water Pollutants“ (Steroidy jako látky znečišťující vodu), o pět let později uskutečnila univerzita v Liverpoolu výzkum abnormalit, které jsou způsobeny přítomností syntetických hormonů ve vodě. Jeho výsledky však nikdy nebyly publikovány. V průběhu 80. let se problémem zabývaly i další vědecké týmy, jejich práci se však nedostalo větší pozornosti, protože své teze nemohly podložit konkrétními a přesnými měřeními. Začátkem 90. let se díky dokonalejší technice problémem přítomnosti léků ve vodních zdrojích detailněji začali zabývat němečtí odborníci, kteří v podzemní vodě našli stopy kyseliny klofibrové, která se používá jako lék na snížení hladiny cholesterolu v těle [8].



Obr. 1 Transport xenobiotik z domácností do podzemních a odpadních vod [5]

Mezi lety 1999 a 2000 provedli američtí vědci výzkum s názvem U. S. Geological Survey, zaměřený na zjišťování přítomnosti léčiv ve 139 vodních tocích 30 amerických států. Zjistili v nich 95 různých polutantů patřících k PPCPs, nejčastěji antibiotik, hormonálních prostředků a dalších léků. Navíc 80 % zkoumaných vodních zdrojů bylo pozitivních na minimálně jeden ze zjišťovaných kontaminantů, 75 % toků obsahovalo dvě a více látek z PPCP, 54 % více než pět, ve 34 % vzorků bylo nalezeno více než 10 těchto polutantů a 13 % bylo pozitivních na 20 a více látek patřících do PPCP. Míra znečištění specifickými polutanty, k nimž PPCP patří, není ovšem ve všech zemích stejná. Může to být dáno různou úrovní čistíren odpadních vod v jednotlivých oblastech a také rozdílnou spotřebou antibiotik nebo antidepresiv. Liší se i výběr léků předepisovaných na podobné zdravotní problémy v různých státech [9]. Problém s dlouhodobým výzkumem PPCP v povrchových vodách navíc také spočívá i v rychlém vývoji trhu s farmaceutickými výrobky. Může se stát, že se výzkum zaměří na sledování přítomnosti určitého druhu léku či aktivní látky v řece, a za několik měsíců tento lék nahradí nějaký jiný. Vzhledem k polárnímu charakteru farmak je hlavní cestou odstraňování PPCP jejich degradace mikrobiálními procesy v čistírnách odpadních vod, nezanedbatelná je i sorpce méně polárních substancí na čistírenské kaly. V současnosti se problémem PPCP ve vodních zdrojích zabývají všechny rozvinuté státy, výjimkou není ani Česká republika. Rozsáhlý jednorázový výzkum na toto téma u nás provedl mezinárodní tým geochemiků, při němž se zaměřili na množství estrogenů ve Vltavě a jejích přítocích v Praze a ve vodě, která se do pražské vodovodní sítě dostává z Želivky. Vědci ve vzorcích odebraných na podzim roku 2000 analyzovali estradiol, estriol, ethynylestradiol, mestranol a norethisteron. Zatímco v některých zkoumaných tocích nebyly hormony zjištěny nebo se pohybovaly na úrovni detekčních limitů, někde byla jejich koncentrace významně zvýšená. Většina hormonů odtéká do odpadních vod a velká část se zachytává v čistírenských kalech. Přesto jich malá část opět uniká do vodních toků [2].

Hormony, které se do vodních zdrojů dostávají kvůli hormonálním antikoncepčním přípravkům, nejvíce ohrožují organismy a živočichy žijící ve vodních tocích. „V řadě evropských řek mají rybí samci prokazatelné samičí znaky,“ prohlásil v roce 2000 na konferenci v Londýně, která se věnovala problémům životního prostředí, profesor Alan Pickering z Natural Environment Research Council [10,18]. Kanadští a američtí vědci prokázali, že hormony mohou dokonce některé druhy ryb vyhubit, protože zasahují do jejich pohlavního vývoje. Navíc se to již netýká pouze ryb žijících v řekách, ale také ryb mořských, kam se právě kontaminovaná voda dostává vodními toky [11,20].

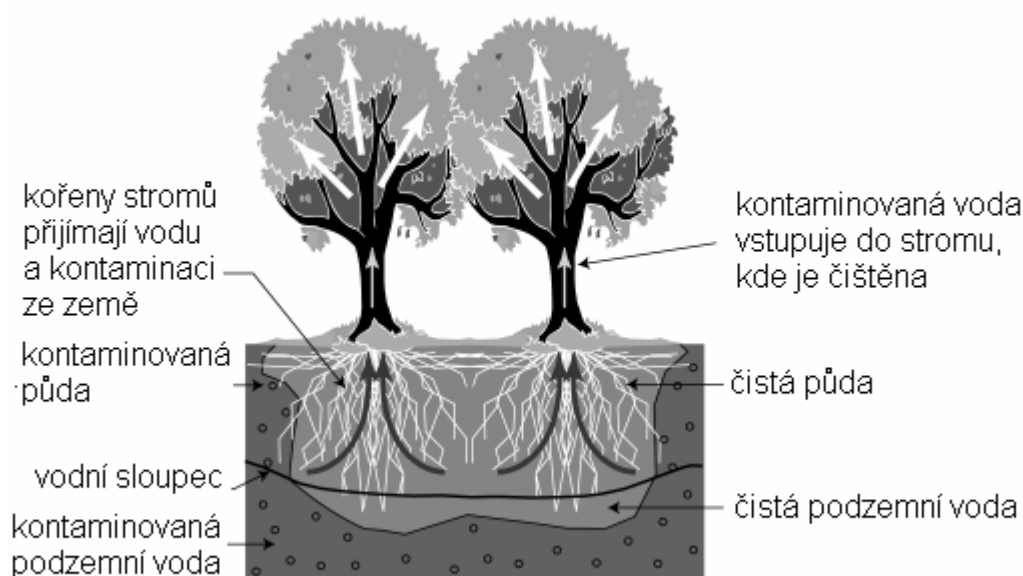
Syntetickými hormony jsou ale ohroženi i další živočichové. Podařilo se dokázat jejich vliv na schopnost rozmnožování u žab. Tým v čele s profesorkou Cecilíí Bergovou porovnával vývoj dvou skupin pulců skokana hnědého. Jedna skupina se vyvíjela v čisté vodě, druhá pak ve vodě, která obsahovala syntetické hormony z antikoncepčních přípravků, které se běžně nacházejí v životním prostředí. U první skupiny se polovina pulců vyvinula v samce, polovina v samice, ve druhé skupině však vědci zaznamenali pouze samice. Přítomnost estrogenů ve vodě má rovněž vliv na rozmnožovací schopnosti krokodýlů či želv [11,20]. Z dlouhodobého hlediska představují ve vodních zdrojích poměrně závažný problém také antibiotika. Jednak totiž snižují efektivitu bakterií, které přirozeně rozkládají živiny, především ale zvyšují rezistenci bakterií právě vůči těmto lékům. Obecně se rezistence bakterií rozděluje do dvou skupin. První z nich je primární, tedy přirozená, která je dána samotným druhem bakterie a jejími vlastnostmi. Jako příklad patogenu primárně rezistentního k některým antibiotikům uvádí RNDr. Jaroslav Spížek, CSc., ve svém článku „Rezistence na antibiotika“ bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Většina jejích kmenů byla vůči antibiotikům odolná hned od počátku užívání těchto léků. Druhou skupinou je rezistence získaná. Ta vzniká jako důsledek nejrůznějších mutací či genetických přenosů a objevuje se zpravidla několik let po objevu nového antibiotika [2]. Geny způsobující odolnost bakterie vůči antibiotikům se mohou přenést do dalších bakterií. Mají totiž schopnost předávat si geny rezistence vůči antibiotikům mezi sebou. O tom, jak rychle si bakterie dokáží vytvořit rezistenci i na nově objevená antibiotika, se nedávno přesvědčili kanadští vědci z Mc.Masterovy univerzity, kteří zkoumali účinek tradičních i zcela nových antibiotik na 480 druhů bakterií žijících v půdě. Zjistili, že každá odolává nejméně 6 druhům těchto léků, některé byly rezistentní dokonce vůči 20 druhům. Polovina testovaných mikrobů dokázala za pomoci enzymů rozložit rifampin, který se používá při léčbě tuberkulózy, několik bylo rezistentních na telitromycin předepisovaný při infekcích dýchacích cest a řada dokázala rozložit i velmi nedávno objevený daptomycin používaný při léčbě kožních nemocí nebo ciprofloxacín proti infekcím močového ústrojí či linezolid, jenž má být jednou z hlavních, nedávno objevených zbraní v boji proti vysoce odolným kmenům enterokoků, stafylokoků a pneumokoků [12,19].

Podle odborníků mohou za tak vysoký stupeň bakteriové rezistence půdních bakterií lidé. Ještě donedávna bylo v zemědělství zcela běžné plošné preventivní přidávání antibiotik do krmiva hospodářských zvířat. Kanadští vědci varovali, že původci lidských chorob mají kvůli tomu v půdních bakteriích k dispozici velké množství genů, které jim zaručí rezistenci na téměř celé spektrum antibiotik [12,19].

PPCP jsou látky obecně prospěšné, nelze je v žádném případě omezit či zakázat, je však nutné s nimi počítat také jako s polutanty. Specifický je na PPCP rovněž fakt, že hlavními znečišťovateli nejsou výrobci, jak tomu bylo u klasických polutantů, ale v podstatě každý člověk, který kdy užíval léky či použil běžný kosmetický prostředek [13,17].

2.Fytoremediace

Fytoremediace jsou technologie využívající zelených rostlin k odstranění nebezpečných polutantů z půd, vod a sedimentů, Jde tedy o proces ozdravení rostlinami. Vybrané rostliny se používají k extrakci iontů toxických kovů, včetně radioaktivních izotopů, i k odstranění některých organických látek z uvedených prostředí. Pro úspěšnou fytoremediaci je nutná biologická dostupnost kontaminantů z vody a půdy do rostliny, která je daná zejména rozpustností látky, typem půdy a stářím kontaminace. Obr. 2 znázorňuje princip fytoremediace [26].



Obr. 2 Princip fytoremediace [26]

Fytoremediace můžeme rozdělit do čtyř základních kategorií. Metoda, kdy v těle rostlin dochází k akumulaci kontaminantů, se nazývá fytoakumulace. Škodliviny, které jsou imobilizovány v rostlinných buňkách lze potom likvidovat řízeným způsobem kompostováním nebo spálením [21, 22].

Dalším procesem je fytodegradace jako metodika, která využívá enzymatických transformací rostlinnými enzymy. Některé rostliny jsou schopny některé organické látky rozložit až na jednoduché sloučeniny a tyto potom využít pro svůj metabolismus. Další metodou je tzv. fytostabilizace, kdy rostlina kontaminant nepřijímá, ale stabilizuje ho v rhizosféře, činí ho v podstatě nerozpustným v půdní vodě, tak aby už dále nemohl penetrovat do prostředí. Posledním typem metod jsou fytovolatilizace, která je charakteristická tím, že je kontaminant rostlinou přijat kořenovým systémem a posléze transportován do nadzemní části a přes průchody je odpařen do atmosféry. Tím, že se substance rozprostře do velkého objemu atmosféry a kontaminant se stává relativně neškodným [21,22].

Technologie je ovšem diskutabilní, protože pouze transformuje kontaminant do jiného prostředí a je omezena na relativně úzkou oblast sloučenin, nejčastěji se uvádí pro sloučeniny selenu a rtuti. Problémem je rovněž mnohem vyšší nebezpečnost těkavých sloučenin uvedených prvků [21,22].

Nespornou výhodou fytoremediace je šetrnost těchto technologií. Díky nim, můžeme zamezit čistě technickému řešení, jako je například likvidace kontaminované půdy, pomocí vybagrování a následnému odvezení na skládku. Kromě aplikace *in situ*, patří mezi další výhody využití známých postupů běžně používaných při zemědělském hospodářství, z čehož vyplývá, že finanční vstupy jsou obecně nízké a náklady na průběh remediace minimální [21, 22].

Nevýhodou této metody je dlouhodobý dekontaminační proces. Kontaminanty se mohou hromadit v listech a nich se uvolňovat do prostředí. V některých případech se zvyšuje rozpustnost polutantů a může dojít k jejich rozšíření do okolního prostoru. Nebezpečí je také ve vstupu do potravního řetězce, kdy kontaminované rostliny mohou být spásány živočichy. Každá z výše uvedených metod má své využití dle druhu dekontaminovaného prostoru. V tabulce 1 jsou uvedeny odpovídající dekontaminovaná prostředí, kontaminanty a typické rostliny jednotlivých technik [21, 22].

Tab. 1 Přehled fytoředičních technik [4]

<i>Aplikace</i>	<i>Prostředí</i>	<i>Kontaminanty</i>	<i>Typické rostliny</i>
Fytotransformace	Půda, podzemní voda, výluhy ze skládek, aplikace odpadních vod na půdy	Herbicide, chlorované alifatické a aromatické uhlovodíky, exploziva	<i>Salicaceae</i> (vrby, topoly), <i>Poaceae</i> (košťava, rákos, proso panenské, čirok), <i>Fabaceae</i> (jetel, vortěška, viona)
Rhizogenní bioremediace	Půda, sedimenty	Biodegradovatelné organické látky (benzen, toluen, PCB, pesticidy)	Trávy (košťava, žito), moruše, jabloň
Fytostabilizace	Půda	Ionty kovů (Pb, Cd, Zn, As, Cu, Cr, Se, U)	Trávy s vláknitými kořeny
Fytoextrakce	Půda, sedimenty	Ionty kovů (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu)	<i>Brassica juncea</i> , <i>Helianthus spp.</i> , <i>Thlaspi carulescens</i>
Rhizofiltrace	Podzemní voda, odpadní voda přes umělé mokřady	Sloučeniny kovů (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu), radionuklidy, hydrofobní organické sloučeniny	Řasy, stolístek vodní, <i>Potamogeton nodosus</i>
Fytovolatilizace	Půdy a sedimenty	Ionty Se, As, Hg, těžké organické sloučeniny	<i>Brassica juncea</i> , mokřadní rostliny

Výhody a nevýhody fytořediace

Největší výhodou fytořediace je, že nedochází k poškozování životního prostředí, protože při *in situ* postupu není třeba odčerpávání materiálu a používání těžké techniky. Má nízké energetické nároky, protože využívá slunečního záření [23].

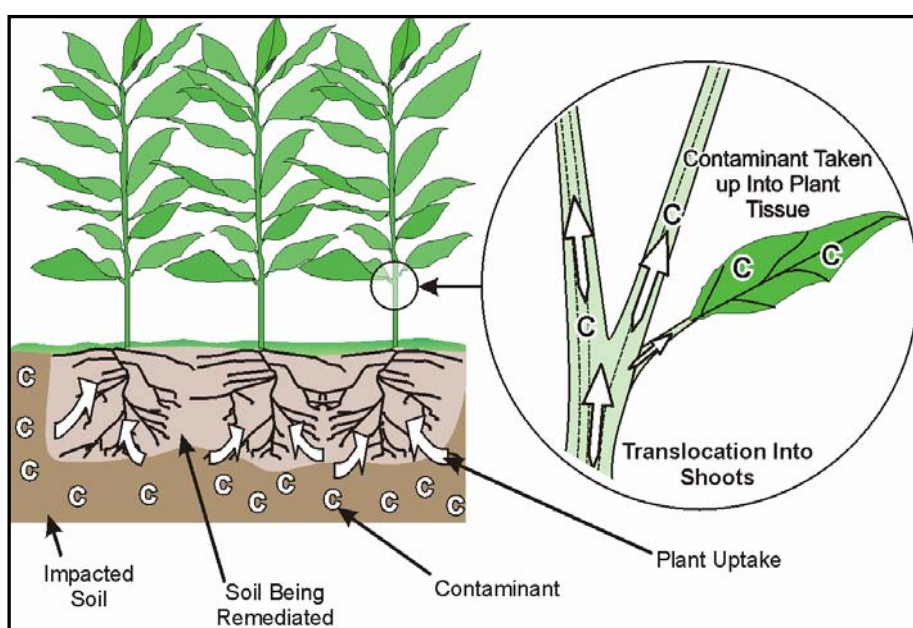
Fytořediace je také efektivní pro různé typy kontaminantů a je dobře přijímána veřejností. V neposlední řadě jsou výhodou nízké náklady na průběh metody a nízké vstupní investice. Nevýhodou fytořediace je u *in situ* postupu její špatná kontrolovatelnost. Fytořediace je limitována vlastnostmi dekontaminovaného média (pH, teplota, apod.), ale i druhem kontaminantu (některé mohou být fytoředické, nebo škodlivé pro určité typy použitých rostlin) [23].

Může docházet i k rozšiřování kontaminace vlivem akumulace xenobiotik v listech, které postupně odpadávají a látky se uvolňují do prostředí. Cizorodé látky se následně mohou šířit potravními řetězci býložravců. Při procesu transformace kontaminantů se může zvýšit jejich rozpustnost a tím mohou životní prostředí kontaminovat ještě ve větší míře. Na rozšiřování kontaminantů do prostředí má vliv hlavně typ půdy a další faktory související s typem ekosystému. Nutnost monitorování lokality při použití fytořediace je mnohem náročnější časově a tedy i finančně než u běžných sanačních metod. Právě čas bývá často rozhodujícím faktorem pro výběr této technologie k dekontaminaci dané lokality [23].

3. Fytoextrakce

Fytoextrakce je metoda, kdy je polutant z vody nebo půdy přijímán kořenem rostliny a může dojít k transportu kontaminantů do nadzemních částí rostliny. Metoda se s úspěchem používá pro látky s obsahem těžkých kovů a radionuklidů kontaminujících půdní systém. Fytoextrakční techniky se také využívají při odstranění farmak z vodního prostředí. Tato biotechnologická metoda se používá pouze pro kontaminanty, které se nacházejí ve vodě nebo v půdě v nízkých koncentracích. Rostliny zachytí kov nebo farmakum a přenesou jej přes selektivně permeabilní plazmatickou membránu, která ohraničuje buňku, pomocí ion-transportních proteinů přítomných v membráně. Z buňky je xenobiotikum dále transportováno do nadzemní části rostliny a akumulováno v jejich pletivech [25]. Princip fytoextrakce je znázorněn na obr. 3.

Dále jsou rostliny sklizeny a zpracovávány (mikrobiálně, tepelně, nebo chemicky). Výhodné je užívat rostliny, které jsou vysoce odolné vůči toxickým účinkům kovů a schopné tyto látky akumulovat do vysokých koncentrací, které jsou o jeden až dva řády vyšší než u běžných rostlin a jsou bez nežádoucích vlivů na jejich růst a vývoj. Takové rostliny se nazývají hyperakumulátory. Příkladem hyperakumulátoru schopného akumulovat těžké kovy je např. *Thalspi caerulescens*, rostlina z rodu hořčic [25].



Obr.3 Princip fytoextrakce [26]

4.Fytodegradace

Fytodegradace je zachycení a přeměna organických látek, které jsou v rostlinných tkáních následně metabolizovány v rámci detoxikačních reakcí. Přeměněný kontaminant je v rostlině uložen nebo uvolněn do prostředí. V některých případech může dojít ke kompletnímu rozkladu na oxid uhličitý a vodu [36].

Podmínkou využití fytodegradace je přeměna kontaminantu na látku, která je netoxická nejen pro rostliny, ale i pro ostatní organismy. Aby mohla být látka účinně metabolizována, musí být rostlině dobře dostupná. Záleží tedy na fyzikálních a chemických vlastnostech kontaminantů, ale i na jejich koncentraci v půdě nebo podzemní vodě [36].

Experimentálně bylo zjištěno, že fytodegradace je účinná pro odstraňování těchto typů látek:

- ropné látky (TPH)
- PAH (polyaromatické uhlovodíky)
- chlorované alifatické a aromatické uhlovodíky – PCB, TCE
výbušniny a jiné nitrolátky
- organofosfátové pesticidy
- detergenty
- mírně hydrofobní organické kontaminanty jako benzen, toluen, ethylbenzen, a xylen (BTEX) a alifatické uhlovodíky s krátkým řetězcem [36].

5. Rhizofiltrace

Rhizofiltrace zahrnuje odstranění nebo koncentraci kovových kontaminantů z vodného prostředí v kořenové zóně. Jednou z možností rhizofiltrace je odstranění kovů sorpcí. Kořeny absorbují, koncentrují a srážejí kovy z kontaminované odpadní vody, která může obsahovat výluhy z půd. Metoda může být aplikována *in situ* nebo může být voda přečerpána do speciálních nádob, které jsou předem vyplněny kořeny příslušných rostlin [28].

Další variantou rhizofiltrace je zkonstruování umělých mokřadů pro úpravu kontaminované vody nebo výluhů. Velmi účinné pro rhizofiltraci je používání kořenů hydroponicky vypěstovaných suchozemských rostlin (např. slunečnice). Jejich přednost spočívá hlavně ve schopnosti rychlého růstu a produkce velkého množství kořenové biomasy. Rostliny jsou pěstovány ve sklenících. Nejprve jsou vystaveny minimální koncentraci kontaminantů. Později se přesazují do kontaminované lokality, či do čistícího systému, ve kterém jsou kořeny ve styku s kontaminovanou vodou [28].

Bylo zjištěno, že rostliny, které byly pěstovány v provzdušňované vodě, jsou mnohem účinnější při odstraňování kovů z vodního prostředí. Takto pěstované rostliny produkují více kořenové biomasy, která potom účinně akumuluje více kovových iontů včetně Cu, Cd, Cr, Ni, Pb i Zn. Rhizofiltrace je také vhodná k záchytu radionuklidů, které jsou efektivně akumulovány kořeny hydroponicky pěstovaných slunečnic *Helianthus annuus* a kořeny rostliny *Brassica juncea*. Kultivar slunečnice *Helianthus annuus* byl také využíván k odstranění radionuklidů z povrchové vody v okolí Černobylu. Další vhodné rostliny pro akumulaci některých těžkých kovů rhizofiltrací jsou např. kukuřice nebo rýže [28].

Důležitým hlediskem k použití rhizofiltrace je její konkurenceschopnost vůči konvenčním iontově-výměnným technologiím a vůči dalším metodám používaným k odstranění těžkých kovů, např. různé živé a neživé biologické systémy, které zahrnují suchozemské rostliny, bakterie a řasy, houby a vodní rostliny [28].

Byla provedena měření [28], jejichž cílem bylo posoudit extrakční schopnosti různých rostlin a metod v procesu čištění vody. Důležité pro srovnání efektivity metod bylo zachování stejných podmínek. Sledovanými parametry efektivity byly počáteční rychlost v odstraňování kovů z vody a afinita různých druhů rostlin a jednoho typu gelu k určitým kovům. V odstraňování iontů Ni, Cd, Pb, Cr(VI), U, Sr a Cs z vody byli porovnávány sazenice indiánské hořčice (*Brassica juncea*), kořeny slunečnice, mechové rašeliny a iontově-výměnný gel [28].

Výsledkem porovnávání bylo, že větší počáteční rychlost v odstraňování kovů z vody prokázaly rostliny. Výjimkou byl Cr(VI), který byl přítomen ve formě dichromanu. Ukázalo se, že rostliny mají pouze omezenou schopnost akumulovat tento anion. Menší počáteční rychlost v odstraňování kovů u iontově-výměnného gelu byla způsobena jeho menším a méně porézním aktivním povrchem využitelným pro adsorpci kovových iontů, ale ve výsledku měl extrakční schopnosti lepší. Z tohoto pohledu iontově-výměnný gel předstihl všechny rostliny při odstraňování Ni, Cd, Pb a Cr(VI). Avšak na akumulaci U byly účinnější kořeny slunečnic. Naproti tomu ionty Sr a Cs byly akumulovány všemi maticemi stejně [28].

Z celkového hlediska by se dalo předpokládat, že biologické materiály jsou vhodnější než používání iontoměníčů a to hlavně při používání čistících systémů, kde je vysoký průtok vody a malá koncentrace kontaminantů. Na druhou stranu se ale iontoměníče vyznačují vyšší

afinitou a lepším odstraňováním kovů, zvláště při nízkých koncentracích. Proto je třeba zohlednit všechny podmínky procesu, dekontaminovaného prostředí a hlavně daný cílový kontaminant, aby se mohlo rozhodnout o zavedení iontoměničů, nebo biologického systému při dekontaminaci. Obecně lze konstatovat, že rhizofiltrace je účinná pro dekontaminaci velkých objemů vod s nízkou koncentrací kontaminantů a je vhodná pro anorganické i organické kontaminanty [28].

6. Fytovolatilizace

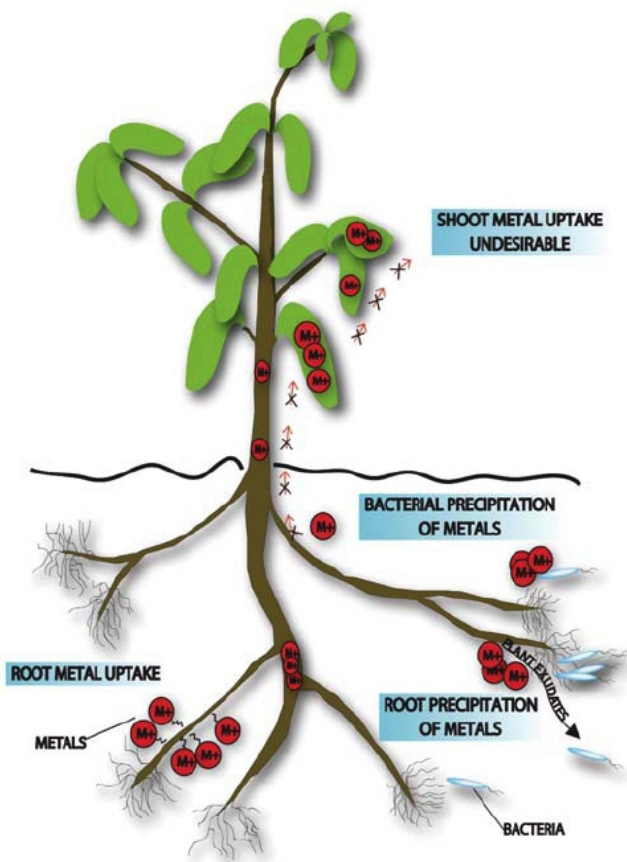
Fytovolatilizace je založena na schopnosti některých rostlin, například topolu, metabolizovat kontaminanty do těkavé formy a na schopnosti zachycovat těkavé organické sloučeniny z prostředí. Těkavé metabolické produkty a těkavé organické sloučeniny uvolňuje rostlina v procesu transpirace do atmosféry. Fytovolatilizace tedy vyžaduje monitorování ovzduší, aby nedocházelo k nadlimitnímu zvýšení toxických látek v prostředí [29].

Příkladem kontaminantů podléhajících procesu fytovolatilizace jsou těžké kovy jako Hg, Se a As (prokázáno u transgenní rostliny *Brassica juncea*). Některé mikroorganismy mají gen kódující reduktázu rtuti. Tento gen byl vnesen do rostlin a jeho expresí se zvýšila odolnost jejich pletiv vůči rtuťnatým iontům. Geneticky upravená rostlina potom ve svých pletivech redukuje ionty rtuti na kovovou rtuť, která se následně vypaří do ovzduší [29].

V polovině 70. let se ve Švédsku studovala schopnost různých druhů zeleně absorbovat polyaromatické uhlovodíky z výfukových plynů. Jako nejúčinnější se ukázal kaštan – jírovec maďal. Schopnost rostlin absorbovat kontaminanty (především těkavé organické látky) přímo v ovzduší závisí na rozdělovacím koeficientu mezi vodou a plynnou fází, druhu rostliny a kontaminantu, velikosti a typu povrchu listu a na obsahu lipidů v epidermu listů [29].

7. Fytostabilizace

Fytostabilizace se využívá ke stabilizaci kontaminovaných míst, kde díky přítomnosti toxických kontaminantů není dostatečný pokryv vegetací a může tak docházet k erozi nebo vyplavování kontaminantů a k rozšiřování kontaminace. Jde o snahu zamezit další šíření kontaminace. Rostliny vhodné pro fytostabilizaci jsou odolné vůči vysokým koncentracím toxických látek (především těžkých kovů). Rostliny imobilizují těžké kovy díky funkci kořenového systému, kde dochází k akumulaci, srážení nebo k redukcí těchto kovů. Průběh fytostabilizace je znázorněn na obr. 4. Bránit rozšiřování kontaminace vyplavování mohou rostliny i pomocí redoxních reakcí, přeměnou rozpustné formy kovu na nerozpustnou formu a následně zabudováním do orgánových struktur [25].



Obr 4 Základní procesy fytostabilizace [26]

8. Nenarkotická analgetika

Veškerá nenarkotická analgetika vykazují kromě analgetického rovněž antipyretický a antiflogistický účinek. Přestože mají tato léčiva podobný mechanismus účinku, u některých vystupují do popředí antipyretické vlastnosti (analgetika-antipyretika) a u jiných naopak účinky protizánětlivé (nesteroidní protizánětlivé látky). Z hlediska chemické struktury lze nenarkotická analgetika rozdělit na deriváty anilinu, deriváty salicylové kyseliny, deriváty anthranilové kyseliny, deriváty 2-arylalkanových kyselin [30,34]. Mezi nenarkotická analgetika řadíme léčiva, které se nazývají nesteroidní antirevmatika (NSA) v některých zdrojích mohou být uvedeny pod názvem nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID) [31].

Nesteroidní antirevmatika patří do celosvětově mezi nejčastěji užívané léky. NSA vedou ke zmírnění symptomů probíhajícího zánětu a bolesti, aniž však dojde k eliminaci jejich příčin. Podstatou protizánětlivého působení nesteroidních antirevmatik je inhibice syntézy prostaglandinů (PG), které se uplatňují jako univerzální modulátory intracelulárního metabolismu, některých fyziologických funkcí a také i jako modulátory zánětlivých reakcí a imunitní odpovědi. Prostaglandiny jsou deriváty kyseliny arachidonové, která je součástí fosfolipidů buněčných membrán. V menší míře se uplatňují také další mechanismy [31].

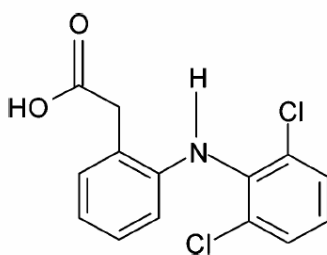
NSA jsou většinou slabé kyseliny, s pKa kolem 3,5. Jsou dobře vstřebávána ze žaludku a střevní sliznice. Tato léčiva se v krvi vážou na bílkoviny krevní plazmy (typicky > 95%), převážně na albumin. Distribuční objem se blíží objemu plazmy. Většina NSA jsou metabolizována v játrech oxidací a konjugací na neaktivní metabolity, které jsou obvykle vylučovány močí i když některé léky jsou částečně vylučovány žlučí. Ibuprofen a diklofenak mají poměrně krátký biologický poločas (2-3 hodiny). Některá NSA (typicky oxikamy) mají naopak velice dlouhý biologický poločas (20-60 hodin) [33]. Tato léčiva mají nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt, a to především na žaludeční sliznici vedoucí někdy až k tzv. indukované gastropatii. Mezi další nežádoucí účinky patří nefrotoxický účinek při dlouhodobém užívání, protože inhibice syntézy prostaglandinu v ledvinách vede k redukci renální perfuze a glomerulární filtrace a sníženému vylučování sodíku a hořčíku. NSA mohou interagovat s ostatními léčivy a to hlavně diuretiky a antihypertenzivy. Používání NSA u běžné populace je bezpečné a efektivní, pokud jsou NSA podávána v terapeutických dávkách po limitovanou časovou periodu [32,35].

8.1 Diklofenak

Je to derivát kyseliny fenyloctové, inhibuje cyklooxygenasu a tlumí syntézu prostaglandinu a dalších mediátorů zánětů. Má antiflogistické, analgetické a antipyretické účinky, pozitivně ovlivňuje syntézu makromolekul pojivové tkáně, tlumí agregaci trombocytů. Toto léčivo je indikováno při akutních a chronických artritidách, zejména při revmatologických artritidách. [38]. Diklofenak je také užíván při zánětlivých onemocněních páteře, artrózách, revmatismu měkkých tkání a bolestivých poúrazových a pooperačních otocích a zánětech.

Po chemické stránce je diklofenak kyselina 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctová kyselina (Obr.5). K vedlejším účinkům tohoto léčiva patří gastrointestinální obtíže, ojedinele bolesti hlavy, přecitlivělost, ospalost a retence solí a tekutin s otoky. Výchozí látkou k syntéze diklofenaku je N-(2,6-dichlorfenyl)fenylamin. Jeho N-acylace chloracetylchloridem následovaná intramolekulární Friedelovou-Craftsovou alkylací poskytne laktam, jehož alkalickou hydrolyzou se získá diklofenak [39].

Diklofenak se po perorálním podání dobře vstřebává, maximální plazmatická koncentrace nastupuje za 2 hodiny po podání. Výrazně se váže na plazmatické bílkoviny. Přibližně 60% podané dávky se vylučuje ledvinami ve formě metabolitů. Plazmatický eliminační poločas je 1-2 hodiny [40].



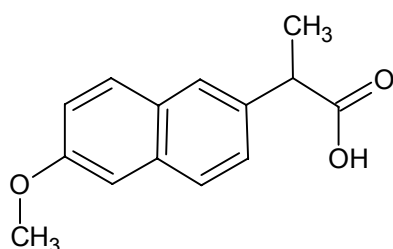
Kyselina 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino] fenyloctová

Obr. 5 Chemický vzorec a systematický název diklofenaku

8.2 Naproxen

Naproxen (Obr.6) má antipyretický, antiflogistický a analgetické účinky. Toto léčivo je nesteroidní antirevmatikum ze skupiny arylderivatů kyseliny propionové, inhibuje cyklooxygenasu a tlumí syntézu prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu [37]. Při perorálním užití se sodná sůl naproxenu velmi rychle a úplně vstřebává z gastrointestinálního traktu. Maximální koncentrace v plazmě je dosažena po 1-2 hodinách. Jídlo zpomaluje absorpci této látky, ale nezmenšuje její rozsah. Výrazně se váže na plazmatické bílkoviny. Přibližně 95% podané dávky se vylučuje močí, z toho 70% v nezměněné formě, zbývající část je vylučována jako inaktivní 6-desmethylnaproxen a jeho konjugáty. Poločas terminální eliminační fáze je přibližně 12-15 hodin [41].

Toto léčivo je indikováno při akutních a chronických revmatických onemocněních, bolestivých stavů při osteoporóze, léčbě zánětů šlach a svalových úponů. Je vhodný k léčbě porážových stavů, jako jsou pohmožděniny, podvrtnutí kloubů, poranění měkkých částí kloubů. Je určen k použití při rehabilitační terapii. Také se naproxen používá při bolestech hlavy, zubů, zad, kloubů, menstruační bolesti, prevence a léčba migrény, zánětů a horečky při infekčních onemocnění v ORL. Mezi nežádoucí účinky tohoto léčiva patří gastrointestinální potíže (nauzea, pálení žáhy, bolesti v podbříšku). Méně často se vyskytují bolesti hlavy, poruchy soustředění, nespavost, kožní reakce a gastrointestinální ulcerace [42].



Kyselina [2-(6-methoxynaftalen-2-yl)]propanová

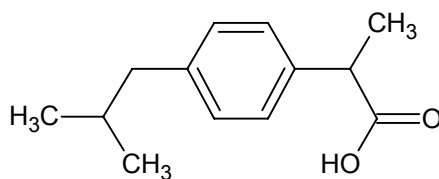
Obr. 6 Chemický vzorec a systematický název naproxenu

8.3 Ibuprofen

Toto léčivo (Obr.7) je nesteroidním antirevmatikem s dobrými analgetickými, protizánětlivými a antipyretickými účinky, vyznačuje se velmi dobrou snášenlivostí. Ibuprofen je syntetizován ve formě racemátu, po perorálním podání se rychle a dobře vstřebává, vrcholu plazmatické koncentrace při podání nalačno dosahuje již po 45 minut, při podání s jídlem za 1-3 hodiny. Ibuprofen se váže na plazmatické proteiny hlavně na albumin. Poměrně rychle se metabolizuje játry a vylučuje močí, hlavně ve formě metabolitů, menší část je vylučována žlučí do stolice. Biologický poločas má asi 2 hodiny. Při snížení vylučování může dojít ke kumulaci léku v organismu. Ibuprofen prochází placentární bariérou, je vylučován do mateřského mléka v množstvím menší než 1mg/ml [43].

Používá se při léčbě zánětlivých a degenerativních kloubních onemocnění, mimokloubního revmatismu a chorob páteře, používá se i při léčbě revmatoidní artritidy a osteoporózy. Jako analgetikum-antipyretikum při horečných stavech a nemocech z nachlazení, bolestech po operaci, bolestech zubů a bolestivé menstruaci [38].

Při jeho podávání se nejčastěji vyskytují gastrointestinální obtíže, nauzea, zvracení, pálení žáhy, průjem, zácpa, vzácně žaludeční nebo duodenální vřed, krvácení z GIT, změny v jaterních funkcích. Vlivem na CNS se mohou objevit závratě, bolesti hlavy, neostré vidění, zcela vzácně insomnie, deprese a emoční labilita [38].



Kyselina 2-(4-isobutylfenyl)propionová

Obr. 7 Chemický vzorec a systematický název ibuprofenu

9. Výskyt xenobiotik v životním prostředí

Antropogenní kontaminanty jsou uvolňovány do životního prostředí řádově desítky let, nicméně o jejich osud a působení na přírodu se lidé začali zajímat relativně nedávno. Jedná se především o tzv. perzistentní organické polutanty (POP). Do této skupiny patří již řadu let nechvalně známé DDT, dále např. polychlorované bifenyly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a také celá řada organických pesticidů. V posledních letech se k novým polutantům přidaly polybromované retardátory hoření (BFR), přípravky pro osobní hygienu, detergenty a také léčiva [44]. Léčiva lze dělit na základě jejich odolnosti vůči životnímu prostředí do tří skupin. Látky lehce odbouratelné (např. kyselina acetylsalicylová), látky hydrofilní (bezafibrát) a látky lipofilní (ofloxacin) [45].

Nejnebezpečnější z hlediska ochrany prostředí jsou látky zařazené do poslední skupiny, u kterých může dojít k začlenění do potravních řetězců. Obecně platí, že o příslušnosti látky k jedné ze skupin rozhoduje souhrn jejích fyzikálně-chemických vlastností, nejvíce pak rozpustnost, KOW (rozdělovací koeficient oktan-1-ol : voda), pKa a KH (Henryho konstanta). Základním problémem při odhadu, do které skupiny daná látka patří, je ovšem fakt, že u mnoha látek tyto parametry nejsou známy a navíc se nelze řídit ani zařazením do skupin ATC (tzv. anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace), protože stejný léčebný účinek mohou mít i dvě chemicky naprosto odlišné sloučeniny. Speciální podskupinou léčiv jsou tzv. EDC (z anglického endocrine disrupting compounds). Mezi nejvýznamnější látky této skupiny patří např. estrogeny nebo sloučeniny estrogenní aktivitou. Další podskupinou jsou ICM (Iodinated X-ray contrast media), která se používají jako kontrastní látky při rentgenovém vyšetření. Tyto látky jsou vysoce odolné vůči všem čistírenským procesům. Proto nejsou uspokojivě odstraňovány stávajícími konvenčními technologiemi [45].

Distribuce farmak do životního prostředí se poněkud liší v porovnání s tradičními polutanty. Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti nebo např. ženy užívající hormonální antikoncepci. Aktivní látky jsou po užití léku z těla vylučovány buď v nezměněné podobě nebo ve formě jejich metabolitů prostřednictvím výkalů a moči a odcházejí díky splaškům až na čistírny odpadních vod (ČOV). Zde však nejsou některé z nich dostatečně zachycovány a přecházejí tak dále do přečištěné vody (schéma 1), kde následně mohou působit na říční biocenózu a také se transportovat do dalších částí ekosystému [47].

Není tak vyloučena ani kontaminace podzemních vod a pitných zdrojů, čímž se vlastně pomyslný koloběh těchto látek uzavírá. Pokud se navíc stabilizované čistírenské kalů

používají jako druhotné hnojivo na zemědělských plochách, může dojít k jejich kontaminaci a následnému proniknutí odolných léčiv nebo jejich metabolitů do potravních řetězců.

Za další významný zdroj jsou považovány léky s proslou trvanlivostí, které se do koloběhu dostávají buď formou průsaků ze skládek nebo díky spláchnutí do odpadu. Mezi menší zdroje lze zařadit např. stabilizovaný kal z ČOV, farmaceutická výrobní zařízení a další [47].

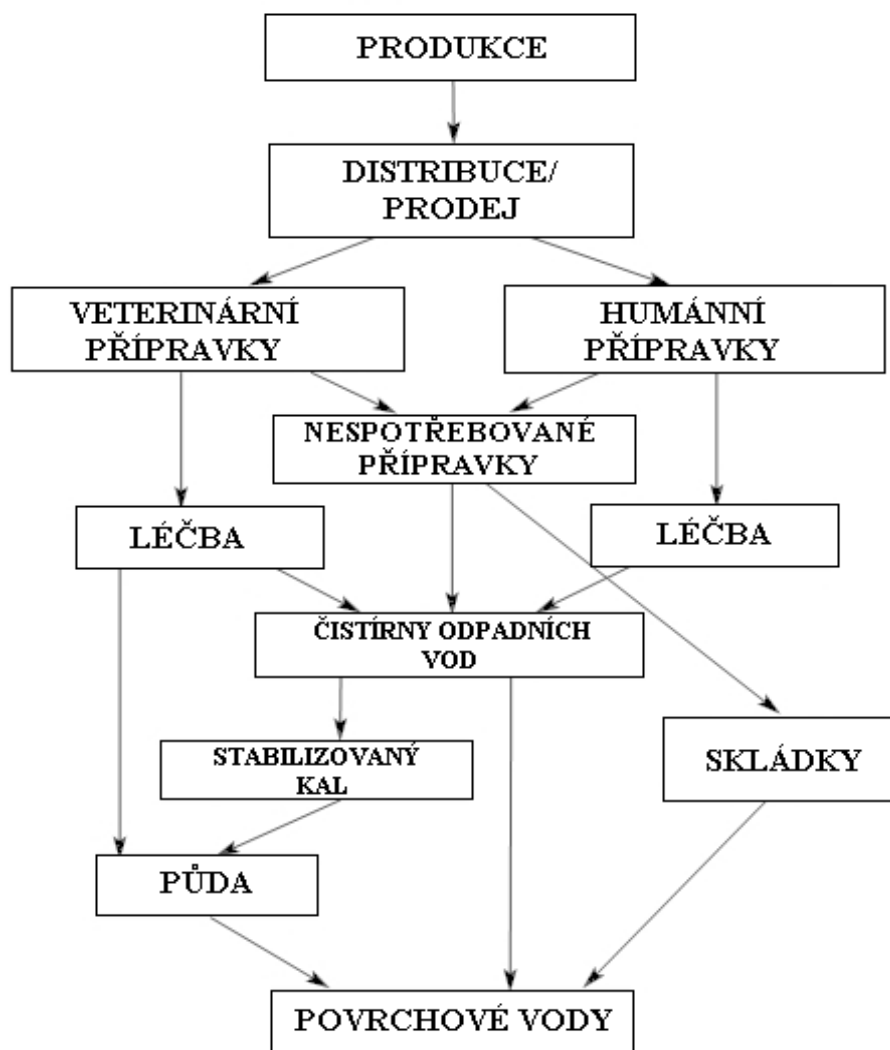


Schéma 1. Tok léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí [46]

Povrchové vody bývají zpravidla nejexponovanějšími částmi životního prostředí, zejména střední a dolní toky řek, na kterých se vyskytují velké aglomerace a tím i mnoho ČOV.

Výskyt jednotlivých xenobiotik se liší v závislosti na mnoha okolnostech a lze je tak detekovat v různých koncentracích. Doposud bylo provedeno jen málo měření týkajících se stavu znečištění podzemních vod léčiv. Navíc se ukazuje, že ve většině případů pocházejí nalezené látky z blízkých skládek nebo dalších bodových zdrojů, jako např. kanalizace nebo ČOV a tudíž nevypovídají nic o globálním stavu věci. Nicméně se našly 2 látky (diklofenak a kyselina klofibrová), které neměly zjevný vztah k lokálnímu zdroji. Poměrně malé znečištění podzemních vod je pravděpodobně dáno jejich dobrou izolací od vod povrchových díky vrstvám s nízkým koeficientem propustnosti a dobrou sorpční schopností zemin, kterými podzemní voda proudí. Prvním xenobiotikem z kategorie léčiv, které před 15 lety našli němečtí vědci v podzemní vodě, byla kyselina klofibrová. Od té doby byla vypracována řada studií, které potvrdily kontaminaci pitné vody několika různými látkami. U nás byla např. zjištěna přítomnost estrogenů ve vodní nádrži Želivka [46].

V současnosti lze v životním prostředí velice dobře určit a kvantifikovat kolem 100 různých léčiv. Nicméně jen v ČR je prozatím registrováno přes 1200 nejrůznějších léčivých přípravků, což mimo jiné znamená, že jsme prozatím schopni sledovat pouze desetinu celkového lékového znečištění. Při analýzách nejvíce komplikuje situaci interakce farmak s huminovými látkami. Druhým problémem jsou velmi nízké koncentrace samotných xenobiotik. Tento fakt vyžaduje předběžnou úpravu vzorku. Nejčastěji se používá SPE (Solid Phase Extraction). Oba tyto faktory kladou velké nároky na přístrojové vybavení, úpravu vzorků a metodiku stanovení. Jako analytické metody se nejčastěji využívá LC-MS díky své vysoké selektivitě a citlivosti [48].

Aktivní látky léčivých přípravků, produkty jejich degradace a metabolity byly nalezeny ve všech částech životního prostředí. Ačkoliv ještě nejsou u všech přesně známy jejich účinky na přírodu, je zřejmé, že představují vážný problém, a to nejen pro člověka, ale také pro všechny zasažené ekosystémy. Je proto nutné pokračovat ve výzkumu tohoto celosvětového problému i nadále[49].

10. Cíl práce

Cílem práce je stanovit schopnost fytoextrakce farmak ze skupiny nesteroidních protizánětlivých substancí – naproxenu, ibuprofenu a diklofenaku vybranými kultivary *Pisum sativum*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, a *Brassica napus*. V rámci projektu je zkoumáno vzájemné ovlivnění testovaných substancí při fytoextrakci a rovněž ovlivnění extrakční účinnosti přítomností další substance, kyseliny salicylové jako metabolitu hojně využívaného analgetika-antipyretika – kyseliny acetylsalicylové. Součástí práce je i vyhodnocení extrahovatelných reziduí z rostlinných tkání po fytoextrakčním experimentu.

Práce zahrnuje:

- 1) Přípravu sterilních in vitro kultur vybraných rostlinných species, stanovení optimálních parametrů pro sterilizaci a kultivaci nově získaných polních kultivarů.
- 2) Provedení fytoextrakčních experimentů s monokomponentními a dikomponentními roztoky farmak v kultivačním médiu a stanovení časové závislosti poklesu koncentrace testovaných látek pomocí HPLC.
- 3) Extrakce vybraných rostlin a test extrahovatelných reziduí.
- 4) Vyhodnocení vzájemného vlivu farmak na účinnost fytoextrakce jako modelu kořenové čistírny.

11 Experimentální část

11.1 Chemikálie a přístroje

Byla použita semena následujících rostlinných druhů:

- Peluška jarní (*Pisum sativum*) cv. Andrea (Selgen a.s.)
- Kukuřice setá (*Zea mays*) hybrid DKC2971 (Monsanto)
- Slunečnice roční (*Helianthus annuus*) cv. Extrasol, Belem (Monsanto)
- Řepka olejka (*Brassica napus*) cv. Exocet

Přehled použitých chemikálií

Ibuprofen (čistota 99,9 %, Zentiva), diklofenak (čistota 99,9 %, Zentiva), naproxen (čistota 99,9 %, Sigma), sacharosa čistotou p.a ,firma Kulich z Hradce Králové, myo-inositol pro tkáňové kultury (Sigma). Methanol, acetonitril a dichlormethan pro HPLC výrobce firma Lab-Scan, kyselina fosforečná 85% a kyselina octová 99,8%(p.a.,Merck,), dihydrogenfosforečnan sodný (p.a.,Lachema), DMSO kvalitou pro tkáňové kultury zakoupený od firmy Sigma. Savo zakoupené jako klasický komerční produkt od firmy Biochemie s.r.o Bohumín, voda pro experimenty byla připravena na přístroji DEMIVA od výrobce Watek, ČR a další anorganické chemikálie pro přípravu media čistotou p.a Lachema, ČR. Chloroform a ethanol čistotou p.a byl od firmy Merck.

Přístroje: HPLC analýza byla provedena na chromatografickém systému INCOS, složeném z vysokotlakého čerpadla INCOS LPC 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS 5000. Použita byla kolona se sorbentem Reprosil 100 C-18 (5µm) o rozměru 4,4 x 250 mm. Analýzy byly prováděny v mobilní fázi za UV detekce. Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 2. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min. Data byla vyhodnocována chromatografickým programem Clarity (DataApex) s automatickým přepočtem dle naměřené kalibrační závislosti, mez detekce 0,05 mg/l. Dále byly použity přístroje: laminární box (Labox, ČR), pH-metr (IQ, Scientific instruments), magnetická míchačka IKA-basic, TLC folie Kieselgel 60 F254 (Merck), vakuová rotační odparka a běžný laboratorní materiál a pomůcky.

Tab. 2 Podmínky měření – mobilní fáze a UV detekce

Farmakum	Použitá mobilní fáze	UV detekce [nm]
ibuprofen	acetonitril: methanol: kyselina octová (1%); (1:1:0,7; v/v/v)	230
naproxen	acetonitril: methanol: voda (4:4:2, v/v/v)	270
diklofenak	methanol/pufr (2:8,v/v); pufr (směs 1:1 (v/v) H ₃ PO ₄ (1g/l) a NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O (2,08 g/l)	280

11.2 Kultivace rostlin a odběr vzorků

Semena byla nejprve sterilizována působením 70 % ethanolu po dobu 1 min a následně 10 % nebo 15 % roztokem Sava s přídatkem smáčedla po dobu 20 min. Takto sterilizovaná semena byla poté několikrát promyta sterilní destilovanou vodou a přenesena za sterilních podmínek do Erlenmeyerových baněk (250ml, 500ml) obsahujících sterilní kultivační médium dle Murashiga a Skooga, které navíc obsahovalo sacharosu a myo-inositol (tabulka 3). Hodnota pH byla nastavena před sterilizací na 5,8-6. Do každé kultivační baňky byla vnesena 4 semena kukuřice, slunečnice nebo pelušky a při použití řepky bylo přidáno 8 semen. Tento postup byl proveden za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Semena byla kultivována při 25°C. Baňky s rostlinami u kterých byla vizuálně prokázána bakteriální kontaminace byly průběžně odstraňovány. Po dosažení optimální velikosti byly k rostlinám přidána sledovaná farmaka ve formě zásobních roztoků tak, aby bylo dosaženo vstupních koncentrací v experimentu v

intervalu 15-20 mg/l. Ibuprofen byl přidáván ve formě zásobního roztoku o koncentraci 4 mg/ml v DMSO, naproxen o koncentraci 4 mg/ml ve vodě a diklofenak o koncentraci 4 mg/ml v DMSO. Po přidání farmak bylo medium v kultivačním experimentu promícháno a okamžitě byl odebrán kontrolní vzorek pro stanovení aktuální výchozí koncentrace.

Další vzorky určené k HPLC analýze byly odebírány za sterilních podmínek v množství 0,5 ml po dobu tří až pěti dnů. Experiment byl vždy ukončen při počátečních příznacích odumírání rostliny nebo známkách kontaminace kultury. Po skončení experimentu byly rostliny myty destilovanou vodou, zváženy a byl změřen objem zbylého media. Rostliny i medium byly dále zamrazeny při mínus 18°C za účelem dalších analýz.

Tab. 3 Složení media dle Murashiga a Skooga

Chemikálie	Koncentrace [mg/l]
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
H ₃ BO ₃	6,2
KH ₂ PO ₄	170
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	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
Sacharosa	30000
Myo- inositol	100

11.3 Izolace extrahovatelných reziduí a produktů biotransformace

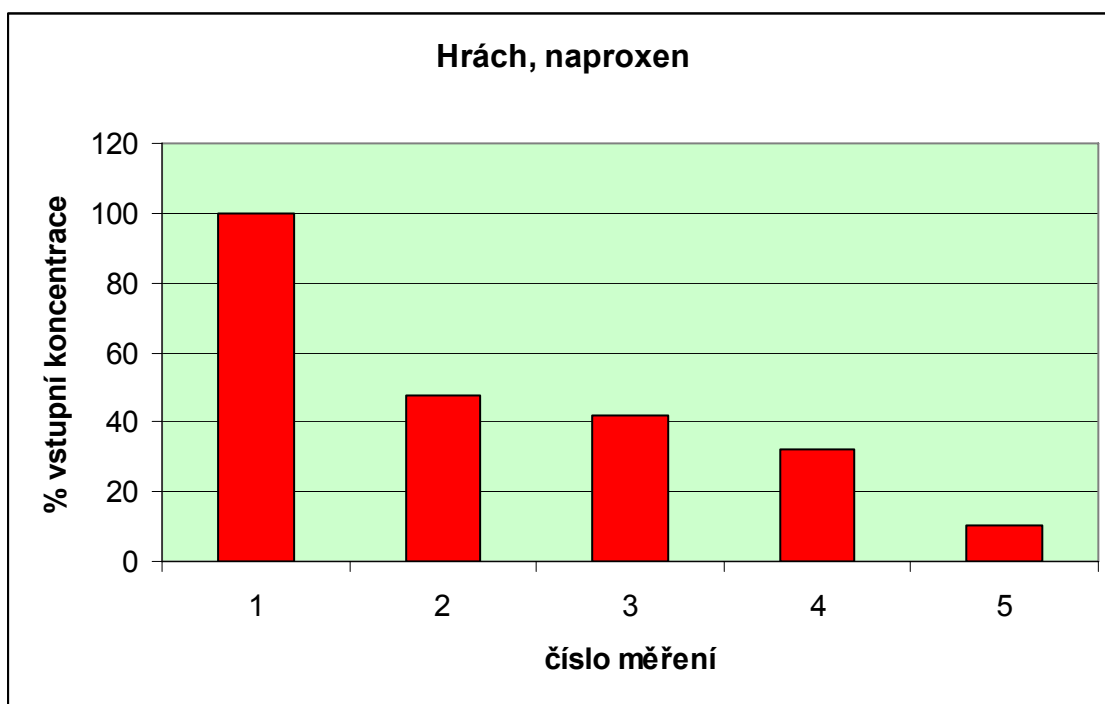
Rostliny z fytoextrakčních experimentů byly použity pro analýzu extrahovatelných reziduí a možných produktů biotransformace. Zmražená a zvážená rostlina byla homogenizována za přítomnosti mořského písku v třecí misce. K vzniklé suspenzi byl následně přidán dichlormethan a celá směs byla umístěna do ultrazvukové lázně na dobu 10 minut. Směs byla zfiltrována přes papírový filtr a tuhé části rostliny tím byly odděleny. Roztok byl následně dvakrát extrahován dichlormethanem. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem hořečnatým přes noc a poté bylo sušidlo odfiltrováno. Rozpouštědlo bylo odpařeno za vakua a odparek byl uchován pro další analýzy.

Rozmražené medium bylo extrahováno třikrát dichlormethanem (150ml media na 30 ml rozpouštědla) po dobu několika minut. Extrakt byl vysušen bezvodým síranem hořečnatým přes noc. Sušidlo bylo odfiltrováno ze směsi přes filtrační papír a rozpouštědlo bylo odpařeno za vakua. Odparek byl uchován pro další analýzy.

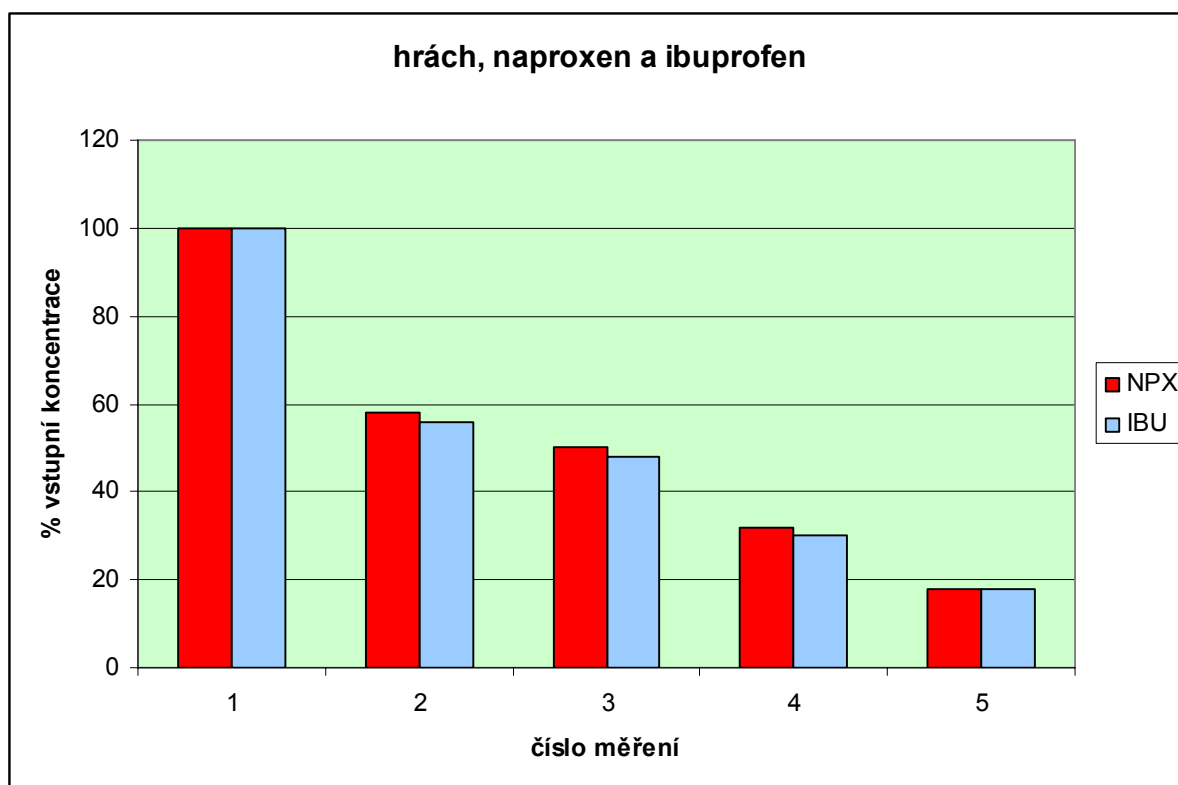
Analýzy extraktů byly prováděny TLC chromatografií srovnáním extraktu z rostliny nebo media se standardem. Detekce látky byla provedena pod UV světlem o vlnové délce 254 nm. Jako mobilní fáze byl použit chloroform v případě analýzy rostlin a media z fytoextračních experimentů s ibuprofenem a diklofenakem. Při analýze rostlin nebo media obsahující naproxen byla tato mobilní fáze ještě okyselena 1 % kyselinou octovou v methanolu v poměru (1:0,3; v/v).

12. Výsledky a diskuse

Byla provedena fytoextrakce rostlinami pelušky jarní v roztoku s obsahem naproxenu (výchozí koncentrace naproxenu byla 20,15 mg/l) a ve směsi naproxen/ibuprofen. Průměr výchozích koncentrací ve směsi byl 17,48 mg/l naproxenu a 20,46 mg/l ibuprofenu. Sledován byl vliv ibuprofenu na extrakci naproxenu. Při srovnání extrakce naproxenu v monokomponentním roztoku (graf 1) a v dikomponentním roztoku (graf 2) je zřejmé, že přidaný ibuprofen výrazně neovlivňuje extrakci naproxenu. Extrakční schopnost rostlin v dikomponentním roztoku je mírně snižená oproti monokomponentnímu což může být způsobeno vyšší koncentrací substancí ve směsi naproxen/ ibuprofen. Po 24 hodinách bylo v mediu stanoveno 47,8% a ve směsi 58% výchozí koncentrace naproxenu. Čtvrtý den experimentu se koncentrace naproxenu v monokomponentním roztoku snížila o 89,51% a v dikomponentním roztoku o 81,4% vstupní koncentrace.

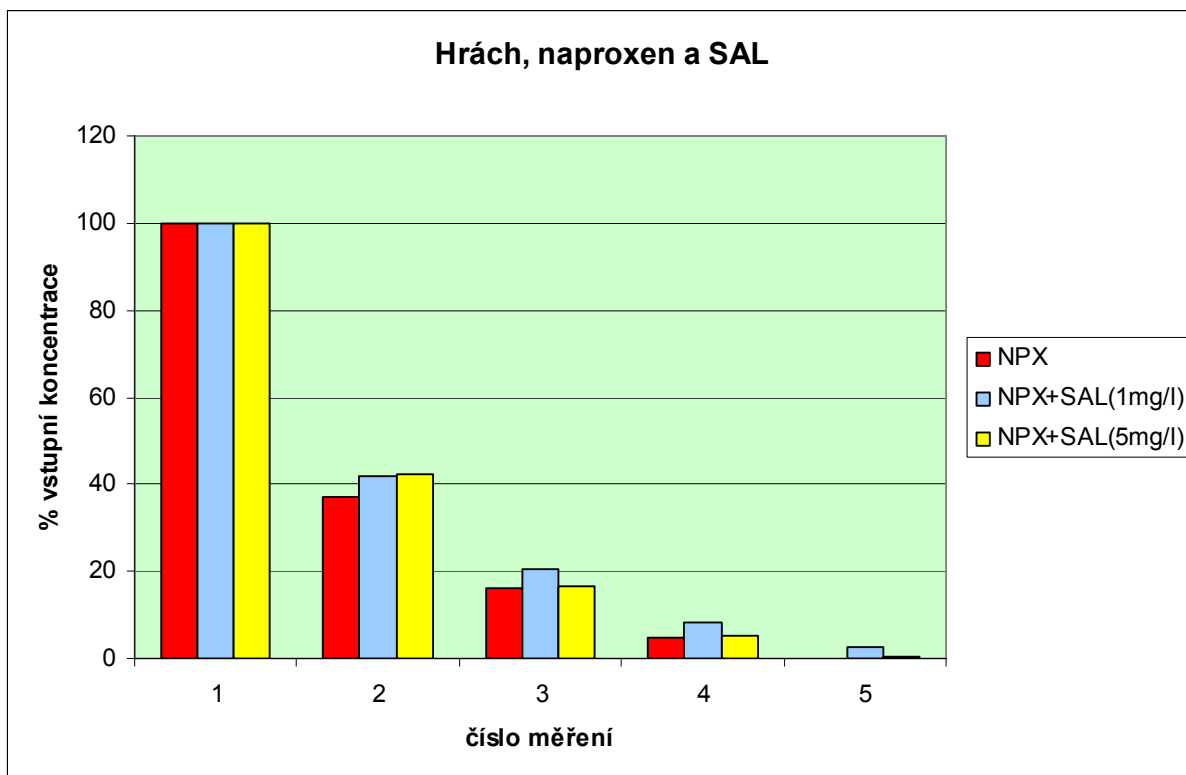


Graf 1. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (20,15 mg/l) peluškou jarní, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96h, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).



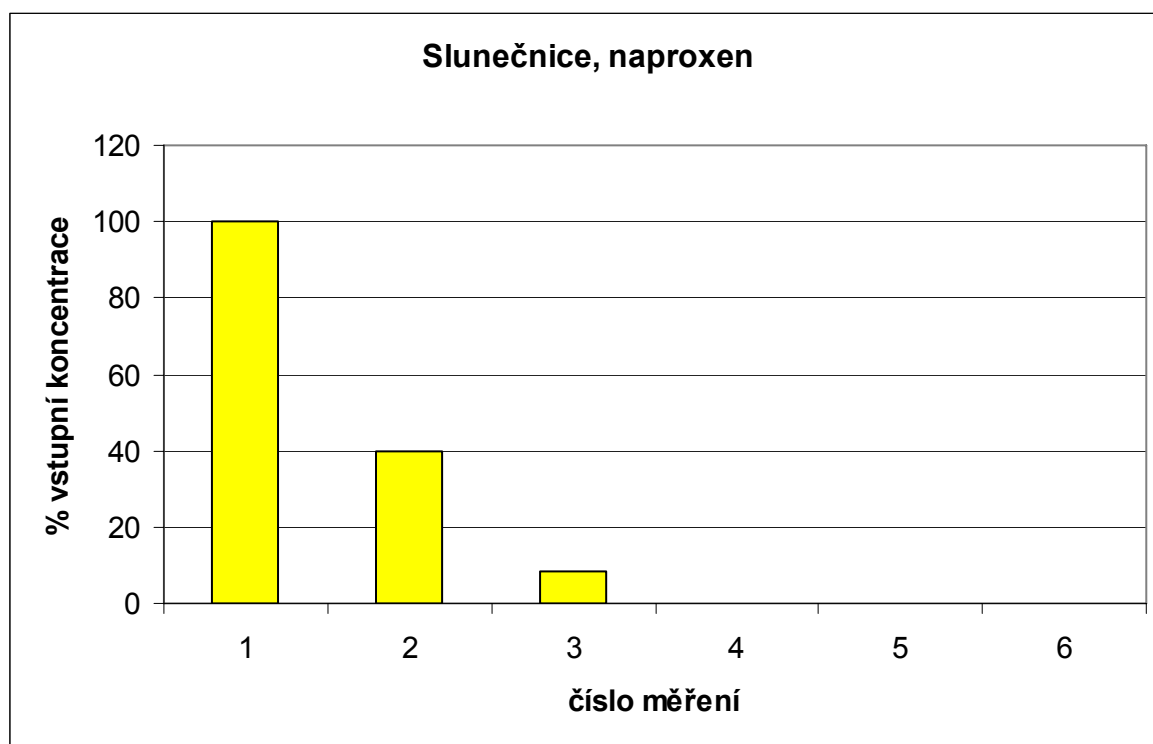
Graf 2. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (17,48 mg/l,) a ibuprofenu (20,46mg/l,) peluškou jarní, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

Porovnávala jsem také fytoextrační schopnost naproxenu ve směsi naproxen/ kyselina salicylová (graf 3) s monokomponentním roztokem naproxenu v rostlinách pelušky jarní. Ve směsi naproxen a kyselina salicylová byla měřena pouze extrační schopnost pro naproxen a vyhodnocoval se vliv kyseliny salicylové na její průběh. V dikomponentních roztocích byla přidána kyselina salicylová ve dvou koncentracích (1mg/l a 5mg/l). Extrační schopnost rostlin pro naproxen se působením kyseliny salicylové mírně snížila. Z grafu 3 však vyplývá, že přidání takto nízkých koncentrací do roztoku nemá na fytoextrační schopnost naproxenu výrazný vliv. Při srovnání časového průběhu fytoextrakce směsi naproxen (14,66mg/l)/ kyselina salicylová (1 mg/l) s roztokem naproxen (15,53mg/l)/ kyselina salicylová (5mg/l) vyplývá, že ve směsi s vyšší koncentrací kyseliny salicylové je extrační schopnost naproxenu třetí a čtvrtý den experimentu mírně vyšší. Po 24 hodinách bylo stanoveno 36,9% vstupní koncentrace naproxenu v monokomponentním roztoku a ve směsi v průměru o 5% vyšší. Poslední den měření byla stanovena hodnota naproxenu v monokomponentním roztoku pod mezí detekce a ve směsi naproxen / kyselina salicylová (1mg/l) bylo nalezeno 2,7% vstupní koncentrace naproxenu.

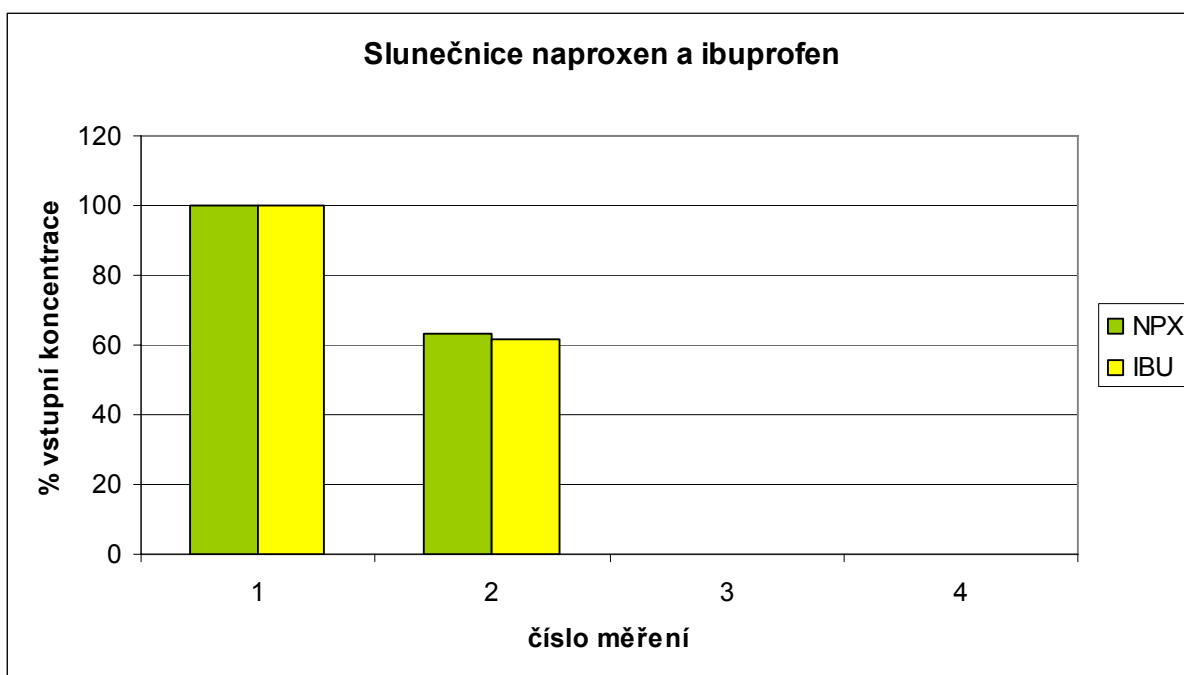


Graf 3. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (14,80 mg/l) v porovnání s časovým průběhem fytoextrakce ve směsi naproxen(14,66 mg/l)/ kyselina salicylová (1mg/l) a časovým průběhem fytoextrakce ve směsi naproxen (15,53 mg/l)/ kyselina salicylová (5mg/l) peluškou jarní, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h , množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

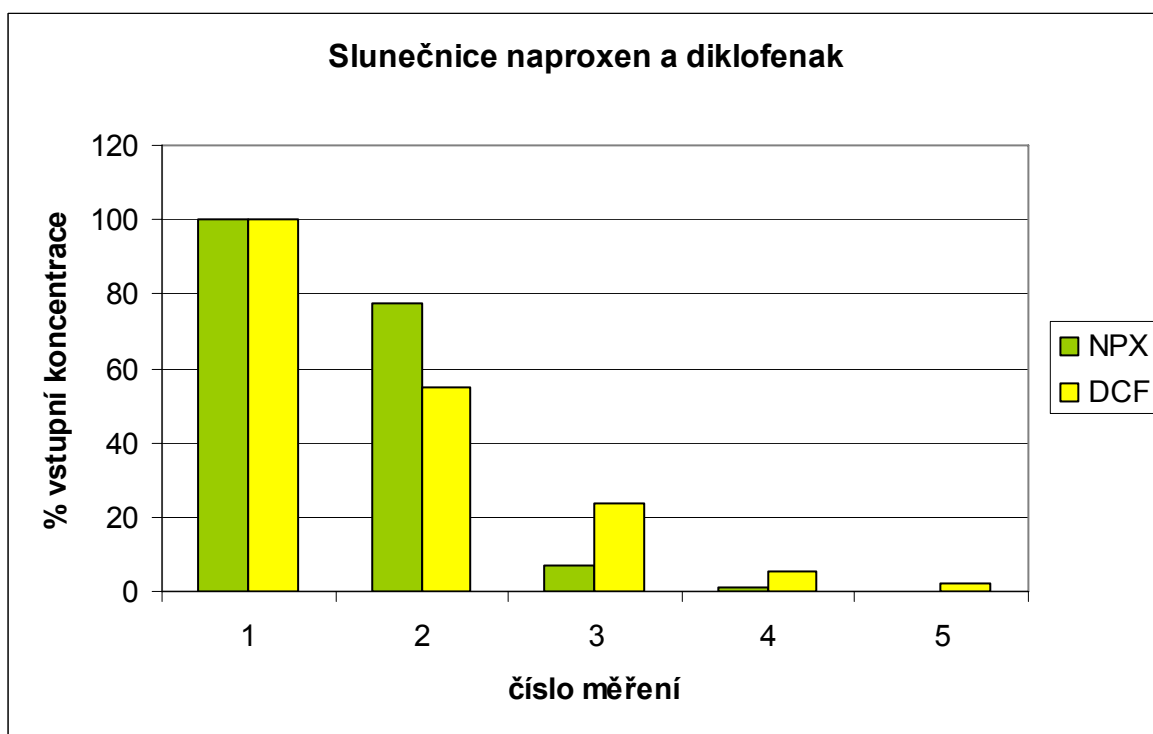
Časový průběh fytoextrakce rostlinami slunečnice roční byl proveden pro naproxen a směsi naproxen/ibuprofen a naproxen/diklofenak. Byla porovnáována jsem fytoextrační schopnost naproxenu v monokomponentních a dikomponentních roztocích. Při srovnání fytoextrační schopnosti samotného roztoku naproxenu (graf 4) a směsi naproxen a ibuprofen (graf 5) vyplývá, že přítomnost ibuprofenu v mediu zvyšuje extrakci naproxenu. Po 48 hodinách byla koncentrace naproxenu ve směsi naproxen/ ibuprofen pod hodnotou meze detekce, ale v monokomponentním roztoku byla stanovena na 8,3% vstupní koncentrace. V dalším experimentu byl stanoven časový průběh fytoextrakce směsi naproxen/ diklofenak (graf 6). Časový průběh fytoextrakce naznačuje, že přítomnost diklofenaku snižuje extrakci naproxenu. Po 24 hodinách byla koncentrace naproxenu v monokomponentním roztoku stanovena na 40% a ve směsi na 77,4% výchozí koncentrace. Třetí den byla koncentrace naproxenu pod hodnotou meze detekce a ve směsi s diklofenakem byla stanovena na 1% vstupní koncentrace.



Graf 4. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (15,12 mg/l) slunečnicí roční cv. Belem, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h, 6 = 120 h, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

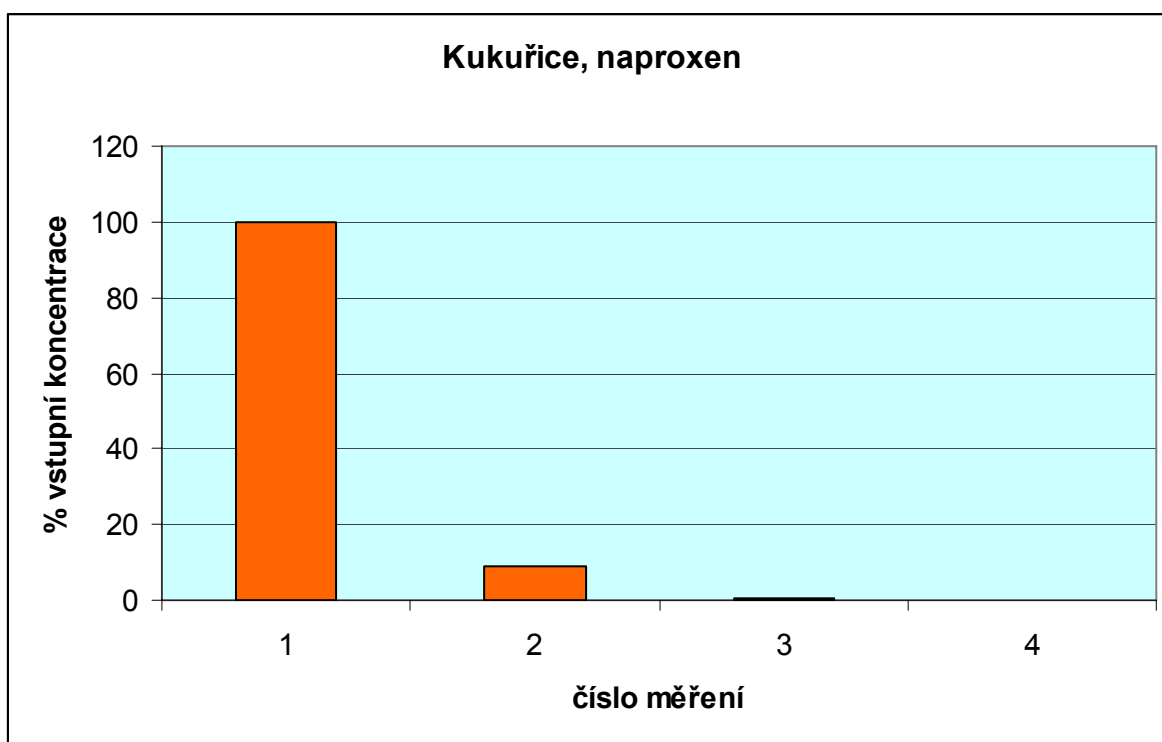


Graf 5. Časový průběh fytoextrakce naproxen (20,11 mg/l)/ibuprofen (20 mg/l) slunečnicí roční cv. Belem, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

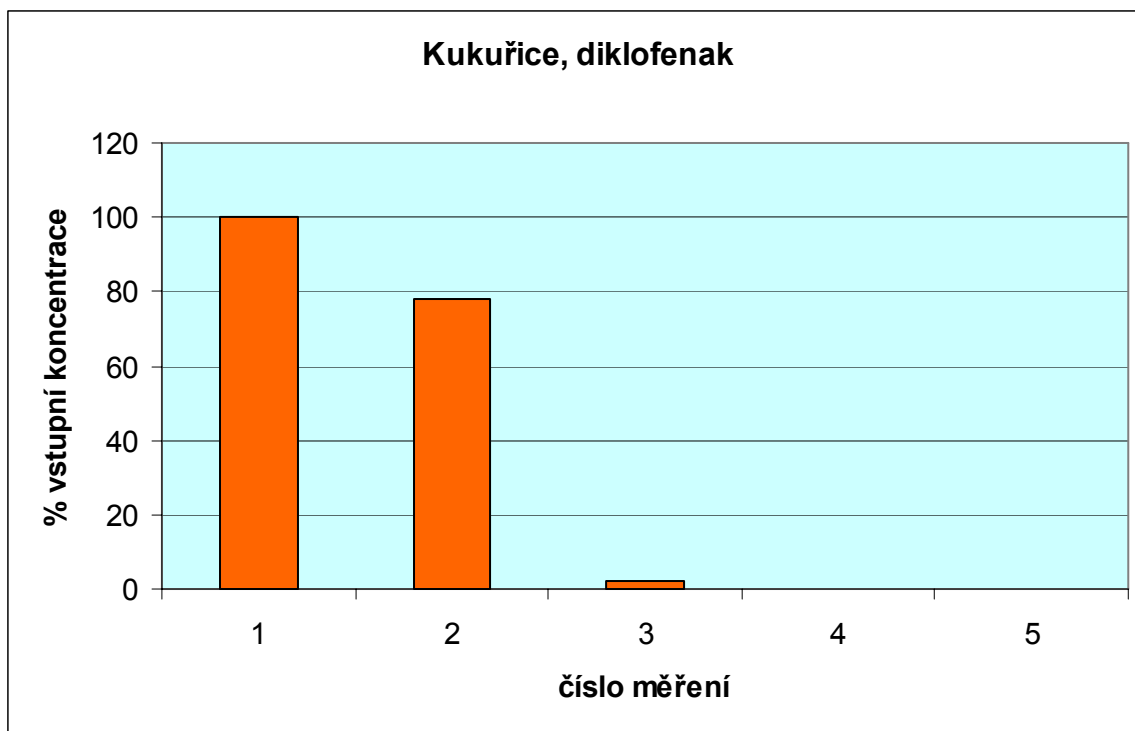


Graf 6. Časový průběh fytoextrakce naproxen (15,03 mg/l)/ diklofenak (15,1 mg/l) slunečnicí roční cv. Belem, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

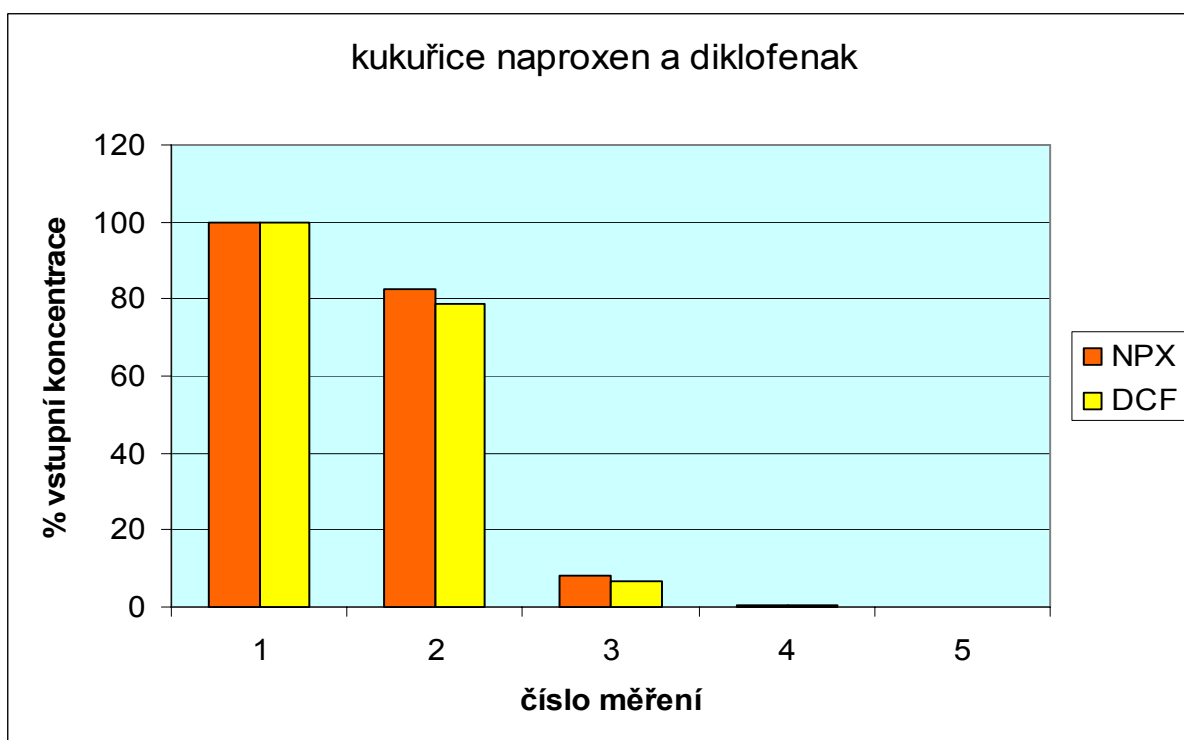
Dále byla provedena fytoextrakce rostlinami kukuřice seté pro naproxen (graf 7), diklofenak (graf 8) a směs diklofenak/naproxen (graf 9). Porovnávala jsem extrakční schopnost naproxenu a diklofenaku v monokomponentních roztocích a ve směsích těchto dvou farmak. Z časového průběhu extrakce je zřejmé, že naproxen má vyšší fytoextrakční schopnost než diklofenak. Po 24 hodinách po přidání farmak do monokomponentních roztoků byla stanovena přítomnost naproxenu na 8,7% a diklofenaku na 78% vstupní koncentrace. Z grafu 9 vyplývá, že extrakční schopnost naproxenu ve směsi je přítomností diklofenaku výrazně snížena pouze při prvním odběru (po 24 hodinách) a v následujících dvou dnech koncentrace naproxenu a diklofenaku ve směsi klesá přibližně na stejnou koncentraci jako u medií, které obsahují pouze jedno z léčiv.



Graf 7. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (20,04 mg/l) kukuřicí setou, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

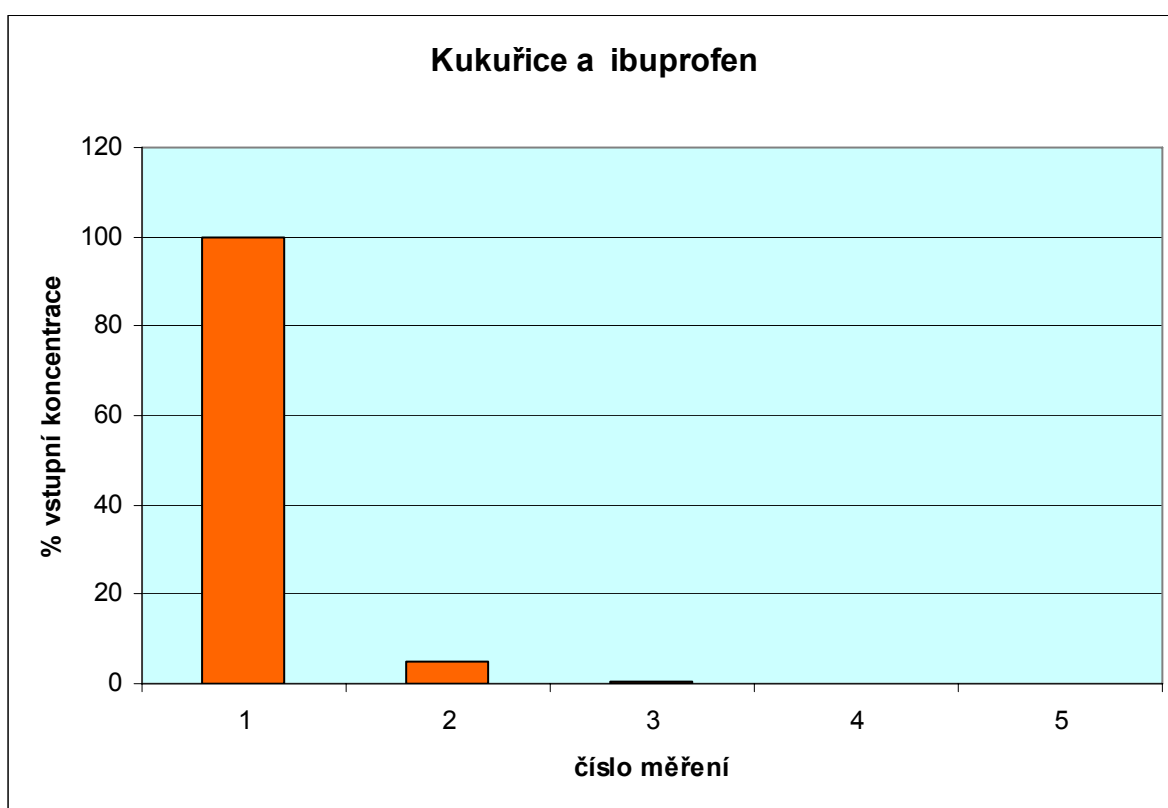


Graf 8. Časový průběh fytoextrakce diklofenaku (20,12 mg/l) kukuřicí setou, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).



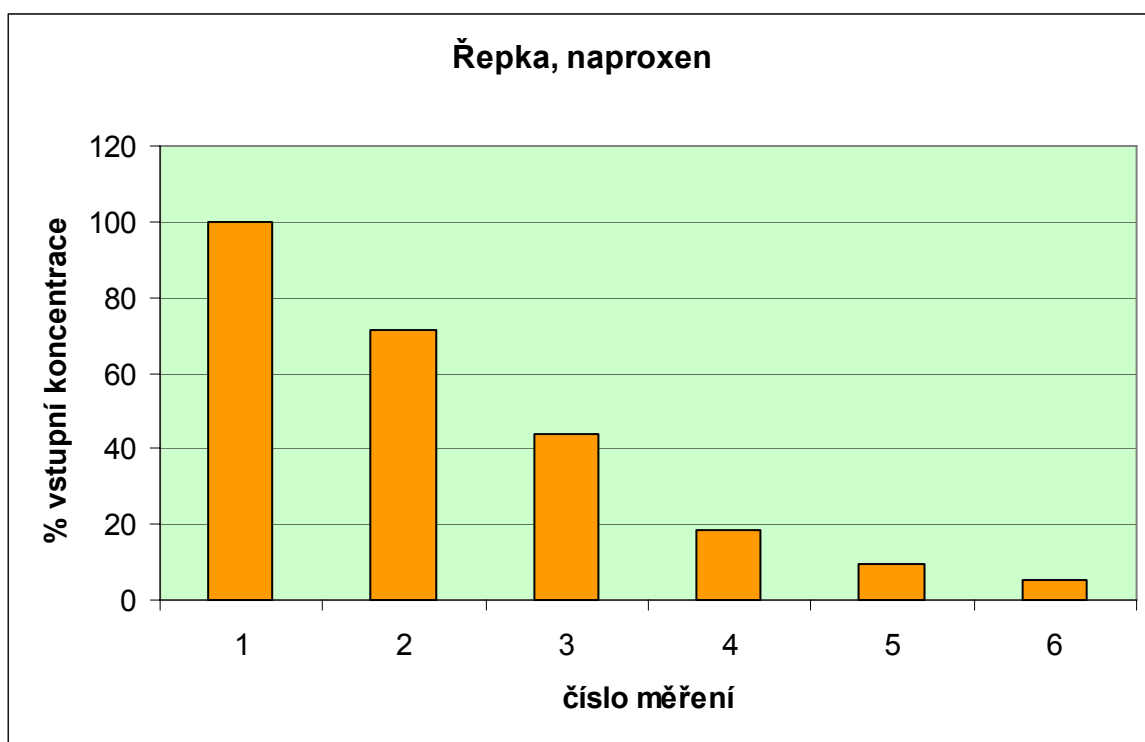
Graf 9. Časový průběh fytoextrakce směsi naproxen (20,1 mg/l)/diklofenak (20 mg/l) kukuřicí setou, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

V dalším experimentu jsem stanovovala fytoextrakční schopnost ibuprofenu kukuřicí setou (graf 10). Po 24 hodinách klesla koncentrace farmaka v mediu o 95,1%. Třetí den bylo množství ibuprofenu v mediu již pod hodnotou meze detekce. Časový průběh fytoextrakce ibuprofenu je podobný naproxenu (graf 7) v monokomponentních roztocích kukuřice seté. Při srovnání extrakce ibuprofenu (graf 10) a diklofenaku (graf 8) je zřejmé, že ibuprofen je výrazně rychleji transportován do kořenového systému rostliny. Po 48 hodinách je však koncentrace léčiv v mediu přibližně na stejné úrovni.

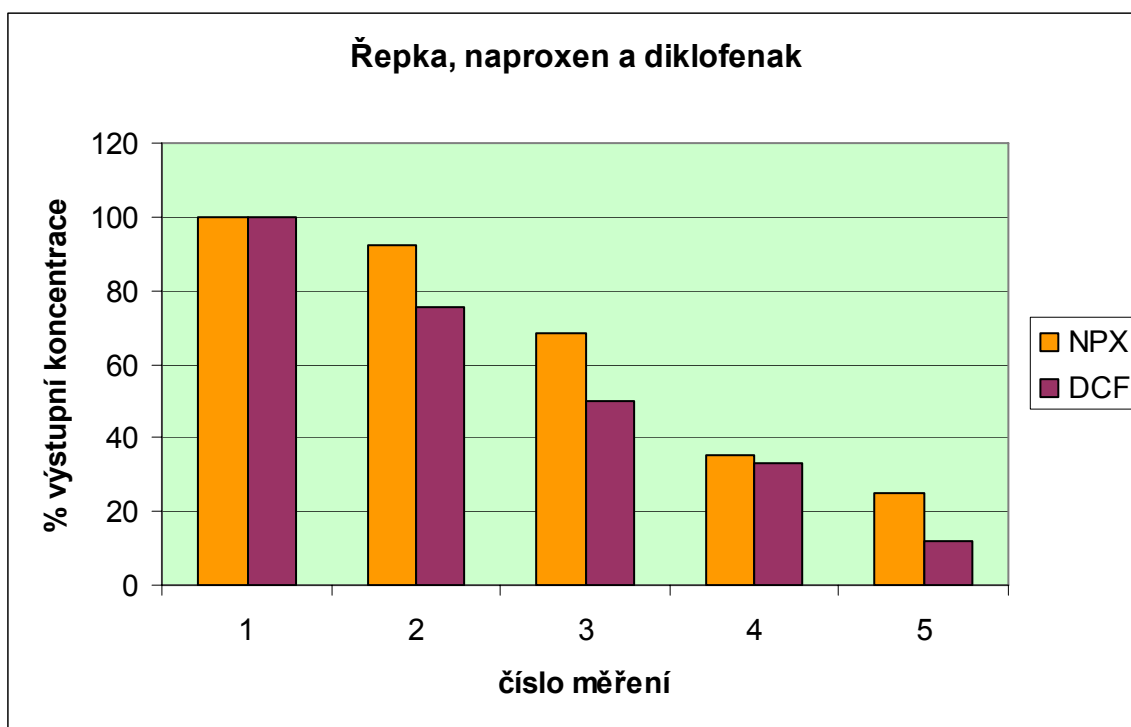


Graf 10. Časový průběh fytoextrakce ibuprofenu kukuřicí setou (20,05mg/l) (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

Rovněž byla provedena fytoextrakce rostlinami řepky olejky pro naproxen (graf 11) a směsi naproxen/diklofenak (graf 12) a diklofenak/ibuprofen (graf 13). Porovnávala jsem průběh extrakce monokomponentních a dikomponentních roztoků a rozdily ve fytoextrakci směsí, které obsahovaly diklofenak. Fytoextrakční schopnost pro použítá farmaka po jejich přidání do media byla nižší než při použití kukuřice, slunečnice a pelušky. Tento fakt je částečně způsobem menším množstvím biomasy u této plodiny. Při srovnání extrakce naproxenu v mediu (graf 11) a v přítomnosti diklofenaku (graf 12) je zřejmé, že fytoextrakční schopnost pro naproxen ve směsi je snížena. Po 24 hodinách bylo stanoveno množství naproxenu v mediu na 71,2% a ve směsi na 92,5% vstupní koncentrace. Čtvrtý den měření se koncentrace naproxenu snížila o 90,5% v monokomponentních roztocích a v přítomnosti diklofenaku pouze o 75%. Tento rozdíl v extrakci je zřejmě způsoben vyšší koncentrací léčiv ve směsi naproxen/diklofenak.

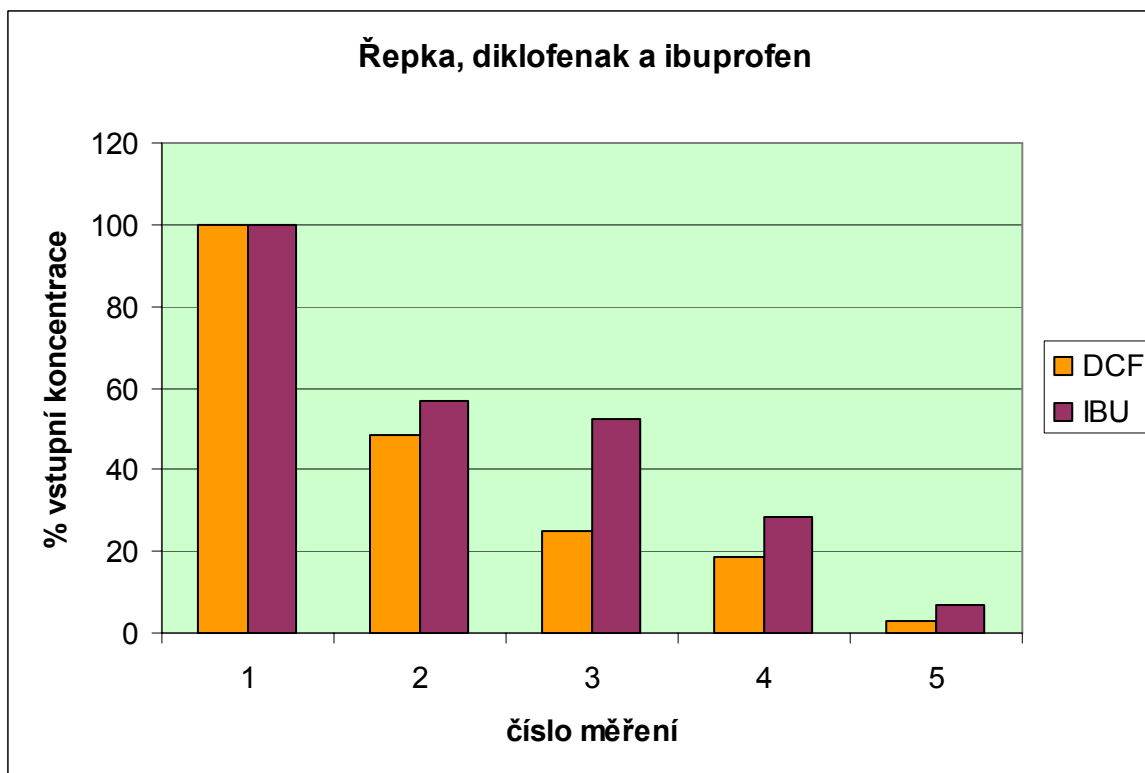


Graf 11. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (20,4 mg/l) řepkou olejkou, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h, 6 = 120, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).



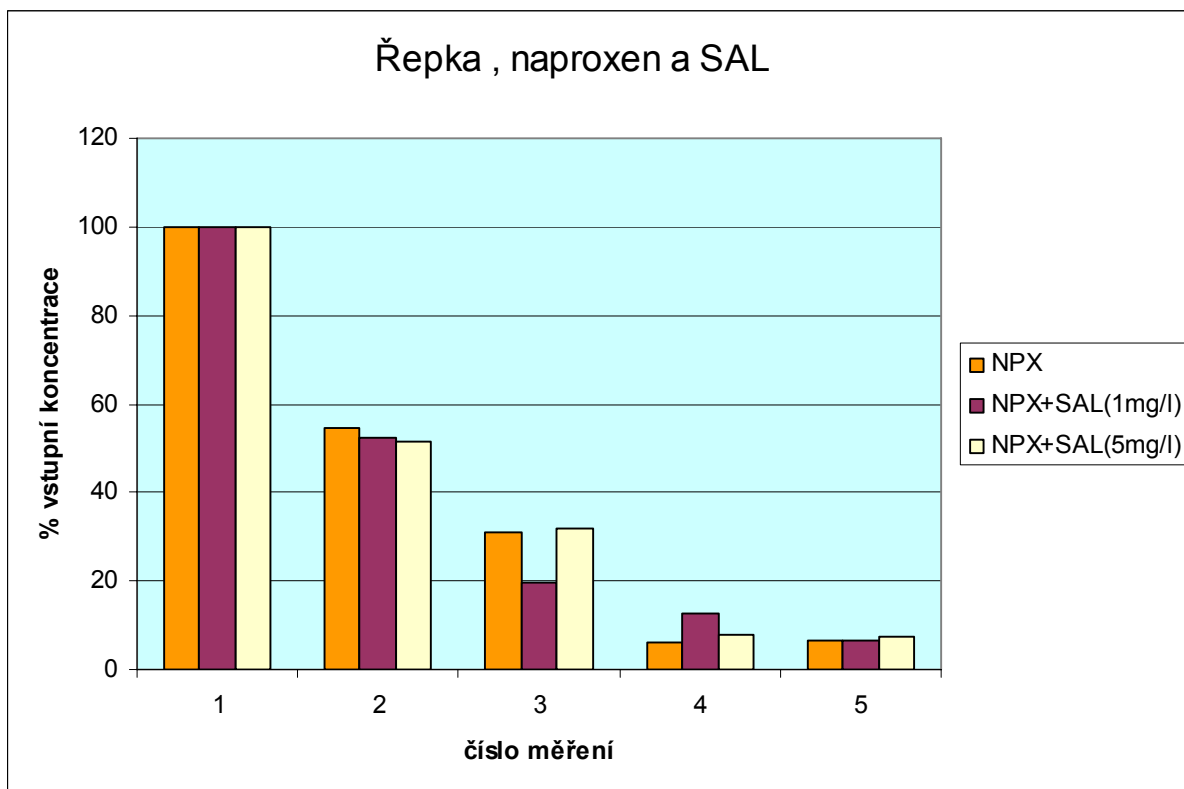
Graf 12. Časový průběh fytoextrakce směsi naproxen (20,12 mg/l)/diklofenak(20,3 mg/l) řepkou olejkou,(číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

V dalším experimentu jsem stanovovala fytoextrakční schopnost směsi diklofenaku a ibuprofenu rostlinami řepky olejky. Z grafu.13 vyplývá, že extrakce diklofenaku je vyšší než ibuprofenu . První den odběru klesla koncentrace diklofenaku o 51,8% a ibuprofenu o 43,2%. Po 72 hodinách bylo stanoveno množství diklofenaku na 2% a ibuprofenu na 6,7% vstupní koncentrace. Při extrakci NSA rostlinami řepky olejky nedošlo ani u jednoho farmaka ke snížení koncentrace pod hodnotu meze detekce. Při porovnání extrakce diklofenaku v přítomnosti naproxenu (graf.12) a ibuprofenu (graf.13) je zřejmé, že diklofenak se transportuje rychleji a ve vyšší míře do kořenového systému řepky za přítomnosti ibuprofenu. První den odběru byl rozdíl v extrakci diklofenaku v těchto dikomponentních roztocích o 27,15% vstupní koncentrace. Po 96 hodinách byla stanovena koncentrace diklofenaku v přítomnosti naproxenu na 12% a v přítomnosti ibuprofenu na 6,7% vstupní koncentrace.



Graf 13. Časový průběh fytoextrakce směsi diklofenak (20,23 mg/l)/ibuprofen(20,12 mg/l) řepkou olejkou, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72h, 5 = 96 h množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

Při dalším experimentu jsem porovnávala fytoextrakční schopnost pro naproxen ve směsi naproxen/ kyselina salicylová (graf 15) s monokomponentním roztokem naproxenu v rostlinách řepky olejky. Ve směsi naproxen/ kyselina salicylová byla měřena pouze extrakční schopnost pro naproxen a vyhodnocoval se vliv kyseliny salicylové na její průběh. V dikomponentních roztocích byla přidána kyselina salicylová ve dvou koncentracích (1mg/l a 5mg/l). Při prvním odběru (po 24 hodinách) klesla koncentrace naproxenu v mediu průměrně o 50%. Po 48 hodinách byla výrazně vyšší extrakční schopnost pro naproxen v přítomnosti kyseliny salicylové (1mg/) a to rozdílem 12% vstupní koncentrace. Poslední dva dny odběrů nebyly rozdíly ve fytoextrakční schopnosti naproxenu výrazné a po 96 hodinách byla stanovena koncentrace naproxenu v mediích v rozmezí 6% a 7% vstupních koncentracích. Z grafu 15 je zřejmé, že extrakce naproxenu se v přítomnosti kyseliny salicylové výrazně nezměnila.



Graf 15. Časový průběh fytoextrakce naproxenu (15,45 mg/l) v porovnání s časovým průběhem fytoextrakce ve směsi naproxen(15,98 mg/l)/ kyselina salicylová (1mg/l) a časovým průběhem fytoextrakce ve směsi naproxen (16,38 mg/l)/ kyselina salicylová (5mg/l) řepkou olejkou, (číslo měření odpovídá časovému úseku 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h, množství studovaných látek je vyjádřeno jako % výchozí koncentrace).

Tab.4 Přehled fytoextrakčních experimentů a analýzy extraktů z rostlin a medií provedené TLC (+ fytoextrakce, + analýza extraktů z rostlin, + analýza extraktů z media)

	NPX	DCF	IBU	DCF*IBU	NPX*IBU	NPX*DCF	NPX*SAL
hrách	+ +				+		+
slunečnice	+ +	++	+ +		+	+	
kukuřice	+	+				+	
řepka	+			+		+	+

V tabulce 4 jsou přehledně znázorněny všechny provedené fytoextrakční experimenty. Provedený extrakční experiment je označen černým symbolem(+). Dále by provedeny experimenty s materiálem získaným během kultivačních experimentů a to s rostlinami pěstovanými na mediu obohaceném studovanými xenobiotiky. U rostlin byly po homogenizaci připraveny dichlormethanové extrakty, které byly testovány na přítomnost extrahovatelného rezidua použité substance, v případě medií byly testovány dichlormethanové extrakty na přítomnost látek aromatického charakteru, které by naznačovaly možnost vylučování transformovaných výchozích substancí do media. Ve všech testovaných případech (analýza extraktů z rostlin je označena zeleným symbolem (+) a z media červeným symbolem (+)) byla nalezena extrahovatelná rezidua výchozích farmak, naopak nebyly nalezeny žádné látky, které by byly zpětně vylučovány do media a souvisely by s výchozí použitou substancí.

Srovnáním získaných výsledků fytoextrakčních experimentů v monokomponentních a dikomponentních směsích lze dojít k závěru, že průběh extrakce testované substance je do jisté míry ovlivněn přítomností dalších látek v modelovém roztoku. Vzájemné ovlivnění účinnosti lze nalézt u dikomponentních kombinací ibuprofenu, naproxenu a diklofenaku, vliv kyseliny salicylové na fytoextrakci výše uvedených látek je velmi slabý. V případě ibuprofenu, naproxenu a diklofenaku se jedná o jistou strukturní podobnost, která může rezultovat v kompetici těchto látek o transportní kanály či sorpční povrch a vzájemné ovlivnění extrakční účinnosti je potom důsledkem těchto vlivů.

Vzhledem k tomu, že projekt je zaměřen na studium procesů v kořenových čistírnách je významným poznatkem i fakt, že v kultivačním mediu nebyly nalezeny metabolity vylučované zpětným transportem. Nedochozí tedy ke zpětné kontaminaci remediovaného systému což by výrazně omezovalo možnosti zavedení jinak atraktivního dekontaminačního systému do praxe.

13. Závěr

Z výsledků experimentů je zřejmé, že farmaka v monokomponentních a dikomponentních roztocích jsou extrahována rostlinami rozdílně. Tyto rozdíly jsou způsobené druhem rostliny, množstvím biomasy, koncentrací léčiv a jejich vzájemnými interakcemi. Při srovnání fytoextrakce farmak v různých druzích rostlin vyplývá, že slunečnice roční a kukuřice setá je pro fytoextrakci NSA vhodnější než peluška jarní a řepka olejka. Časové průběhy fytoextrakce NSA v monokomponentních a dikomponentních roztocích farmak slunečnicí roční a kukuřicí setou znázorňují, že třetí den (po 72 hodinách) bylo množství NSA v mediu již pod hodnotou meze detekce. Výjimkou byla pouze fytoextrakce směsi naproxen a diklofenak slunečnicí roční (graf. 6) kde množství NSA v mediu po 72 hodinách nebylo pod hodnotou meze detekce. Z grafů časového průběhu fytoextrakce NSA rostlinami peluškou jarní a řepkou olejkou vyplývá, že extrakční schopnost pro NSA těchto plodinami je nižší. Při každodenním odběru vzorků z media v pelušce jarní a řepce oleje nedošlo ke snížení koncentrace farmaka pod hodnotu meze detekce po 96 hodinách v žádném z provedených experimentů. Rozdílná extrakční schopnost pro NSA u použitých rostlin je částečně způsobena rozdíly v množství biomasy a zřejmě velikostí absorpčního povrchu kořenového systému.

Při porovnání fytoextrakce použitých léčiv ze skupiny nesteroidních antirevmatik konkrétně diklofenaku, naproxenu a ibuprofenu je zřejmé, že průběh extrakce v monokomponentních roztocích těchto farmak je podobný. Rozdíly ve fytoextrakční schopnosti NSA jsou výraznější při srovnání monokomponentních a dikomponentních roztoků farmak. Z experimentů vyplývá, že extrakční schopnost farmak ve směsi je většinou snižena. Důvodem nižší extrakce v provedených experimentech je koncentrace léčiv ve směsi a jejich možné vzájemné interakce. Porovnávaná byla vždy fytoextrakční schopnost naproxenu ve směsi s jiným NSA. Z grafů vyplývá, že extrakce naproxenu je přítomností jiného NSA snižena. Výjimkou byla fytoextrakce směsi naproxen/ibuprofen slunečnicí roční, kde však rozdíly nebyly jinak výrazné. Sledován byl rovněž vliv přítomnosti kyseliny salicylové na extrakční schopnost naproxenu. Z grafu 3 a 15 vyplývá, že přítomnost kyseliny salicylové v nízkých koncentracích (1mg/l a 5mg/l) na extrakci naproxenu nemá výrazný vliv.

Fytoextrakce je metoda, kdy je xenobiotikum z vody nebo půdy přijímáno kořenovým systémem a může dojít k jeho transportu do nadzemních částí rostliny. Tato biotechnologická metoda se používá pouze pro kontaminanty, které se nacházejí ve vodě nebo v půdě v nízkých koncentracích. Rostliny zachytí farmakum a přenesou jej přes selektivně permeabilní plazmatickou membránu, která ohraničuje buňku, pomocí ion-transportních proteinů přítomných v membráně [25]. Léčivo se následně může akumulovat v pletivech. Rostlinná buňka obsahuje pestrou škálu enzymů, které jsou potencionálně schopné metabolizovat farmakum. Je tomu tak proto, že v rostlinných buňkách je syntetizována celá řada sloučenin složitých struktur v mnohých směrech podobných strukturám látek cizorodých. Podstatnou úlohu při metabolismu xenobiotik v rostlinách hrají monooxygenasy se smíšenou funkcí s cytochromy P450 jako terminální oxidasou a dále pak peroxidasy. V případě, že biotransformačními reakcemi dochází ke snížení toxicity sloučenin, je tento proces označován jako detoxikace. Jestliže však dochází k reakcím, které vedou ke zvýšení toxického účinku cizorodé látky, je biotransformace označována jako aktivace xenobiotika.

Přeměnu cizorodých látek rostlinami můžeme rozdělit do tří fází. Při biotransformaci v rostlinách nedochází k efektivnímu vylučování metabolitů xenobiotik. Derivatizační fáze zahrnuje enzymově katalyzované zavedení nebo odkrytí polárních skupin molekuly xenobiotika. U toxických sloučenin vedou reakce této fáze většinou ke tvorbě detoxikačních metabolitů. V řadě případů však dochází i k aktivaci xenobiotik za tvorby toxicitějších produktů. Pokud cizorodá látka obsahuje vhodnou funkční skupinu může biotransformace probíhat reakcemi druhé fáze tzv. konjugacími. Konjugáty jsou pak v rostlinách ukládány v některých částech buňky. Místem akumulace pro rozpustné konjugáty jsou vakuoly. Některé produkty konjugací fáze procházejí ještě třetí fází při které dochází k reakcím s některými složkami buněčné stěny jako jsou ligandy a pektiny [50]. Metabolismus nesteroidních antirevmatik v rostlinných buňkách nebyl ještě prozkoumán. Není známo v jaké míře jsou tato léčiva biotransformována v rostlinách a nejsou určeny metabolity těchto reakcí a jejich potenciální toxicita. Při využití fytoextrakce k odstranění nesteroidních antirevmatik a dalších léčiv z vodních toků je důležité nejdříve prozkoumat osud těchto látek v rostlinách. Pokud by totiž došlo k aktivaci léčiva za tvorby toxicitějších produktů způsobila by tato metoda jen zhoršení stávající situace.

14. Seznam literatury

1. Kummerer K.: Pharmaceuticals in the Environments, str. 3-21, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008.
2. Zdravotnické noviny, 3.3.2008, str.16-17.
3. Rathouská L.: Fytoextrakce galaxolidu a tonalidu z vodných roztoků, Bakalářská práce, UK v Praze, PřF, Praha 2009, str. 13-14.
4. Houdková B.: Fytoextrakce směsí nesteroidních antirevmatik in vitro v podmínkách, Diplomová práce, UK v Praze, PřF, Praha 2009, str.16.
5. "Origins and Fate of PPCPs in the Environment." U.S. Environmental Protection Agency, www.epa.com, 20. 4. 2009.
6. Daughton Ch.: Pharmaceuticals in the Environment: Sources and Their Management, Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry series, 2007, Volume 50, str.2-30.
7. Alvarez D., Petty J.D., Huckins, J.N.: Environ. Toxicol. Chem. **2004**, 23, 1640-1648.
8. Bendz D., Paxéus N., Ginn T.R., Loge F.J.: Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, *122*, (2005), str.195-204.
9. Toxic Exposure Surveillance System, American Association of Poison Control Center, dostupné na <http://www.aapcc.org/poison1.htm>, 15.3 2009.
10. Bound J.P., Voulvoulis N.: Environ. Health. Perspect. **2005**, 113, 1705-1711.
11. Bound J.P., Kitsou K., Voulvoulis N.: Envir.Toxicol. Pharmacol. **2006**, 21, 301-307.
12. Fent K., Weston A.A., Caminada D.: Aquatic Toxicol. **2006**, 76, 122-156.
13. Assessment of Ingredients in Personal and Care Products, Environmental Working Group, Washington, DC, dostupné na <http://www.ewg.org/reports/skindeep>, 20.3. 2009.
14. Jorgensen S.E., Sorensen B.: Chemosphere. **2002**, 40, 691-699.
15. Preferred Drug List, dostupné na <http://www.ebrx.com/Docs/EBRxPreferredFormulary.Pdf>, staženo 20.2.2009.
16. Consumer products program, California Air Resources Board, Sacramento, CA ,dostupné na <http://arb.ca.gov/consprod/consprods.htm>, 22.1.2009.
17. Wennmalm A., Gunnarsson B.: Drug Inform J. **2005**, 39, 291-297.
18. Zuccato E., Calamari D., Natangelo M.: The Lancet. **2000**, 355, 1789-1790.
19. Animal Poison Control Center , American Society for the Prevention of Cruelty to Animals , dostupné na <http://www.apcc.asPCA.org>, 23.6.2009.
20. Sumper J.P., Johnson A.C.: Environ, Sci.Technol. **2005**, 39, 4321-4333.

21. http://www.cvut.cz/pracoviste/odbor-rozvoje/dokumenty/hab_inaug, 21.1.2009.
22. Dietz A.C., Schnoor J.L.: Environmental Health Perspectives. **2001**, *109*, 163-168.
23. <http://www.frtv.gov>, 27.1.2010.
24. <http://www.recetox.muni.cz>, 10.1.2010.
25. http://www.phytosanitary.org/projekty_04.html, 11.2.2010.
26. <http://www.itreweb.org/Documents/Phyto-2pdf>, 20.10.2009.
28. Dercová K., Makovníková J., Barančíková B., Žuffa J.: Bioremediace toxických kovů kontamující vody a půdy, Chem.listy. **2005**, *99*, 682 – 693.
29. Rugh C., Wilde D., Stack N., Thompson D.M., Summer A.O., Meagher R.B.: Proc. Natl. Acad. Sci. **2008**, *93*, 3182-3187.
30. Hampl F., Rádl S., Paleček J.: Farmakochemie, str.105-112, GRADA Publishing, Praha 2007.
31. Suchý D., Reichl M.: Klin. Farmakol. Farm. **2003**, *17*, 166-169.
32. Rychlík I., Tesař V.: Nesteroidní antirevmatika a ledviny, str.25-34, Nefrologické oddělení I, interní kliniky Všeobecné fakultní nemocnice a 1.lékařská fakulta, Praha 1998.
33. Rovenský J., Stančíková M., Ferenčík M., Rybář I., Lukač J.: Rheumatologie. 1996, *10*, 121-130.
34. Pavelka K.: Čes Revmatol. **1996**, *4*, 3-6.
35. Pavelka K.: Čes Revmatol. **1993**, *1*, 22-31.
36. Vaněk T., Koryta J., Benešová D., Soudek P., Petrová Š.: Chem.Listy. **2008**, *132*, 346-356.
37. Lullmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: Barevný atlas farmakologie, str. 200-201, GRADA Publishing, Praha 2001.
38. <http://www.novartis.com>, 12.2.2010.
39. Burce J.W: Diclofenac salts, their synthesis, characterization and lyophilization, Department of Chemistry and Biochemistry, University of North Carolina, (2007), str.1-15.
40. Green E.G., Nicholl J.: Gut. **1986**, *27*, 1390-1393.
41. databáze ISLAP, informace o léku
42. Lincová D.: Základní aplikovaná farmakologie, str. 303-304, Galén, Praha 2007.
43. Měsíčník pro lékaře a farmaceuty číslo 9/ 2009 str.3.
44. Castensson S., Gunnarsson B.: Environment and Pharmaceuticals, str.10-14., Apoteket AB, Stockholm 2006.
45. Morteani G., Moller P., Fuganti A., Paces T.: Environ.Geochem. Health. **2006**, *28*, 257
46. Kotyza J., Soudek P., Kafka Z., Vaněk T.: Chem. Listy. **2009**, *103*, 540-547.

47. Pharmaceuticals in the Environment: *Information for Assessing Risk website*,
<http://www.chbr.noaa.gov/peiar/default.aspx>, 17.10.2009.
48. Xia K., Bhandari A., Das K., Pillar G.: J. Environ. Qual. **2005**, 34, 91.
49. Ternes T.: Water Res. **1998**, 32, 3245.
50. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: Chem. Listy. **2001**, 95,
212-222.

15. Abstrakt

V práci byl studován vzájemný vliv ibuprofenu, naproxenu a diklofenaku na účinnost fytoextrakce z vodných roztoků rostlinami *Helianthus annuus*, *Zea mays*, *Pisum sativum* a *Brassica napus* plants. Pro experimenty byla vybrána farmaka ze skupiny nesteroidních protizánětlivých látek. Výsledky ukázaly, že při porovnání účinnosti fytoextrakce samotné substance s fytoextrakcí ve směsi farmak dochází k změnám ve fytoextrakční účinnosti. Fytoextrakce naproxenu byla negativně ovlivněna přítomností další látky ze skupiny nesteroidních antirevmatik ze skupiny arylalkanových kyselin. Vliv kyseliny salicylové v nízkých koncentracích nebyl významný. Efektivita použitých rostlin byla v souladu s množstvím produkované biomasy a velikosti absorpční plochy kořenového systému. Analýza rostlin prokázala přítomnost extrahovatelných reziduí použitých substancí. Při analýze media nebyly nalezeny látky vylučované zpětným transportem do kultivačního roztoku, což je příznivým faktem pro praktické použití testovaného systému v kořenových čistírnách.

Abstract

This work has studied interaction between ibuprofen, naproxen and diclofenac for phytoextraction efficiency by *Helianthus annuus*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Brassica napus* plants. The experiments were focussed to massively used non-steroidal anti-inflammatory drugs. The results showed differences when compare of the phytoextraction efficiency single substance and their mixtures. The presence of diclofenac or ibuprofen in plants decreased extraction of naproxene from the cultivation medium. The presence of salicylic acid showed no influence in extraction of mixtures. The efficiency of plants depends on the amount of produced biomass and root surface. The analysis of plant showed the presence of extractable residues. The compounds excreted into medium by back-transport did not found. This is a positive factor for practical using of tested system in constructed wetlands.

