

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie

Klinická a toxikologická analýza



Extrakce antirevmatika diklofenaku v kulturách

vodních rostlin

Extraction of antirrheumatic drug diclofenac in water

plants cultures

Bakalářská práce

PRAHA 2008

Nicole Vinklová

UNIVERZITA KARLOVA v Praze

Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*PL.č. 126 b/08 stud
(org.)*

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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.....2.1.2008....

.....*Tomášová!*.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Šárce Pšondrové za všeestrannou pomoc v laboratoři a se zpracováním výsledků.

Obsah

1.	Úvod	- 5 -
2.	Teoretická část	- 6 -
2.1.	Nesteroidní antirevmatika	- 6 -
2.1.1.	Nesteroidní antirevmatika pro celkovou terapii.....	- 7 -
2.1.2.	NSA ze skupiny derivátů arylalkanových kyselin	- 8 -
2.1.3.	Diklofenak	- 8 -
2.2.	Fytořemediace	- 10 -
2.3.	Diklofenak v ekosystému	- 13 -
3.	Cíl práce.....	- 15 -
4.	Experimentální část	- 16 -
4.1.	Materiál a přístroje	- 16 -
4.1.1.	Chemikálie	- 16 -
4.1.2.	Rostlinný materiál.....	- 16 -
4.1.3.	Přístroje.....	- 16 -
4.2.	Příprava biologického materiálu /kultivace	- 17 -
4.2.1	Kultivace vodních rostlin.....	- 17 -
4.2.2	Kultivace řas.....	- 18 -
4.2.3	Imobilizace řas.....	- 18 -
4.3.	Fytoextrakce.....	- 18 -
4.3.1.	Fytoextrakce diklofenaku	- 18 -
4.3.2.	Izolace produktů biotransformace diklofenaku	- 19 -
5.	Výsledky a diskuze	- 20 -
6.	Závěr	- 28 -
7.	Seznam zkratek	- 29 -
8.	Použitá literatura.....	- 30 -

1. Úvod

Rozvoj vědy a techniky umožnil vznik látek, které nemají přirozený původ v přírodě, ale byly uměle syntetizovány člověkem, tzv. xenobiotika. Řada těchto sloučenin (polychlorované bifenyl, polyaromatické sloučeniny, chlorované alifatické uhlovodíky) ještě před nedávnem patřila díky svým výhodným fyzikálním a chemickým vlastnostem mezi látky průmyslově významné. Mnohem později bylo zjištěno, že se jedná o perzistentní a toxicke látky, které se hromadí v životním prostředí, mohou pronikat do potravních řetězců, a tak ohrožovat zdraví lidské i živočišné populace. Vzhledem k velkému rozšíření xenobiotik v ekosystému je v dnešní době celosvětově věnována pozornost možnosti odstraňování těchto látek a dekontaminaci zasažených ploch.

Existuje řada účinných fyzikálně-chemických metod, které lze použít, avšak většinou se jedná o ekonomicky velmi náročné postupy. Jedním z alternativních způsobů je levnější a přirozenější biologická dekontaminace, která využívá organismy schopné v kontaminovaném prostředí přežívat a kontaminující látky degradovat. V současné době jsou z tohoto hlediska středem zájmu bakterie, které odbourávají organické polutanty a xenobiotika za aerobních i anaerobních podmínek. Přestože i vyšší organismy, např. rostliny, jsou nedílnou součástí ekosystému, byla schopností rostlin extrahat, ukládat či metabolizovat xenobiotika věnována zatím velmi malá pozornost.

V posledních letech se kromě klasických kontaminantů výše zmíněných typů či různých pesticidů, antioxidantů nebo kontaminantů z průmyslových výrob věnuje velká pozornost přítomnosti reziduí farmak v životním prostředí. S masovým rozvojem farmakoterapie, která směřuje k nízkým dávkám velmi biologicky účinných sloučenin a s rozvojem analytických technik souvisí právě zájem o jejich přítomnost a působení v ekosystému. Ukazuje se totiž, že mnohé z těchto látek sice v přírodě nevykazují primární biologickou aktivitu, nýbrž simulují estrogenní aktivity se vsemi negativními vlivy s nimi souvisejícími.¹

2. Teoretická část

2.1. Nesteroidní antirevmatika

Nesteroidní antirevmatika patří mezi léčiva používaná k terapii nemocí pohybového ústrojí. Revmatická onemocnění lze rozdělit do následujících skupin²:

- a) zánětlivá revmatická onemocnění
 - skupina revmatoidní artridy
 - systémová onemocnění pojiva
 - spondylartritydy
- b) degerativní kloubní onemocnění
 - osteoartróza
- c) mimokloubní revmatismus
 - celkový (fibromyalgie)
 - lokální (epikondylitida)
 - skupina bolestí v zádech
- d) metabolická kloubní onemocnění
 - dna
- e) metabolická kostní onemocnění
 - osteoporóza

Snaha terapie je navození remise, zmenšení nebo úplné potlačení bolesti, odstranění ranní ztuhlosti, udržení nebo zlepšení funkčních schopností pohybového ústrojí, udržení nebo zlepšení kvality života, potlačení zánětlivé aktivity, zpomalení pokračující destrukce kloubů. K dosažení těchto cílů, je způsob použití antirevmatik rozdílný, neboť tato onemocnění jsou velice heterogenní.

- a) Zánětlivá onemocnění autoimunitního původu – nutnost potlačit aktivitu cytokinů, jež jsou zodpovědné za lokální destrukci a systémové projevy. Podávají se kortikosteroidy a imunosupresivní léčiva. Dále je nutné potlačit účinek cyklooxygenasy . Ta je zodpovědná za syntézu prostaglandinů. Dojde k zmírnění symptomů onemocnění. K inhibici cyklooxygenasy se používají nesteroidní antiflogistika. Kortikosteroidy

- se používají v kombinaci s cytostatiky pro léčbu systémových onemocnění.
- b) Degenerativní onemocnění – používají se analgetika a nesteroidní antiflogistika.
 - c) Mimokloubní revmatismus – důraz je kladen na fyzikální léčbu a rehabilitaci. K léčbě se používají nesteroidní antiflogistika v lokálních lékových formách, centrální myorelaxancia a kortikosteroidy pro místní aplikaci.
 - d) Dna – nesteroidní antiflogistika potlačí zánětlivé projevy, urikosurie nebo allopurinolem se sníží urikémie v mezidobí mezi záхватy.
 - e) Metabolické kostní onemocnění – používá se široká paleta léčiv.

2.1.1. Nesteroidní antirevmatika pro celkovou terapii

Nesteroidní antirevmatika pro celkovou terapii jsou první volbou v revmatologii. Mají analgetické a protizánětlivé účinky, používají se u většiny bolestivých a zánětlivých stavů pohybového ústrojí. Jejich jednorázově aplikovaná dávka může být užita jako analgetikum při všech bolestivých stavech vedle cílené terapie. NSA při opakovaném podání v malých dávkách působí analgeticky. Aby se docílilo protizánětlivého účinku, je nutné podávat pravidelně vysoké dávky NSA. Malé dávky jsou účinné u méně pokročilých případů osteoartrózy a mimokloubního revmatismu.

Mechanismus účinku všech NSA spočívá v inhibici cyklooxygenasy. Tím dojde k zásahu do tvorby prostaglandinů. Inhibice syntézy prostaglandinů vede na jedné straně k potlačení zánětu, na druhé straně však snižuje tvorbu prostaglandinů obecně, což vede ke vzniku řady nežádoucích účinků (žaludek, ledviny, plíce).

NSA jsou rozdeleny do jednotlivých skupin dle chemického složení, ne dle rozdílu v účinnosti a mechanismu účinku, jelikož tyto rozdíly nejsou velké. Ale rozdílné jsou individuální odpovědi po jejich užití. Zhruba u 60 % pacientů se dá očekávat účinek podáním jakéhokoli antirevmatika. Pokud se po zahájení terapie nedostaví analgetický účinek do týdne a protizánětlivý účinek do tří týdnů, je třeba změnit použité NSA za jiné. Bud' za jiné ze stejné skupiny anebo z jiné skupiny.

2.1.2. NSA ze skupiny derivátů arylalkanových kyselin

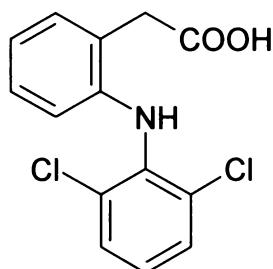
Tyto NSA se vyznačují dobrým protizánětlivým, antipyretickým a analgetickým účinkem. Rozdelení je následné: deriváty kyseliny octové – jsou účinnější (diklofenak, indometacin, tropesin, sulindac, tolmetin) a deriváty kyseliny propionové – jsou lépe tolerovány (ibuprofen, ketoprofen, naproxen, flurbiprofen).

Léčiva se mohou podávat po dobu několika týdnů až měsíců. Mají krátký biologický poločas, vylučují se močí převážně ve formě metabolitů. Používají se při terapii zánětlivých a degenerativních onemocnění kloubů, páteře a měkkých tkání.

2.1.3. Diklofenak

Neustálá a rychlá modernizace našeho světa s sebou přináší mnoho nových rizik a „moderních“ chorob. Lidé, žijící v dnešním světě, jsou často vystavováni velkému pracovnímu vytížení. Nevhodný životní styl a nedostatek času způsobují, že mnoho lidí zanedbává první příznaky chorob a snaží se vyhnout časově náročné návštěvě lékaře. Pak používají léky, které jsou volně prodejně. Mezi takové léčebné přípravky patří léky s obsahem účinné látky – diklofenaku.

Patří do skupiny derivátů kyseliny [2-(2,6-dichlorfenylamino)fenyl]octové (Obr. 1)⁵.

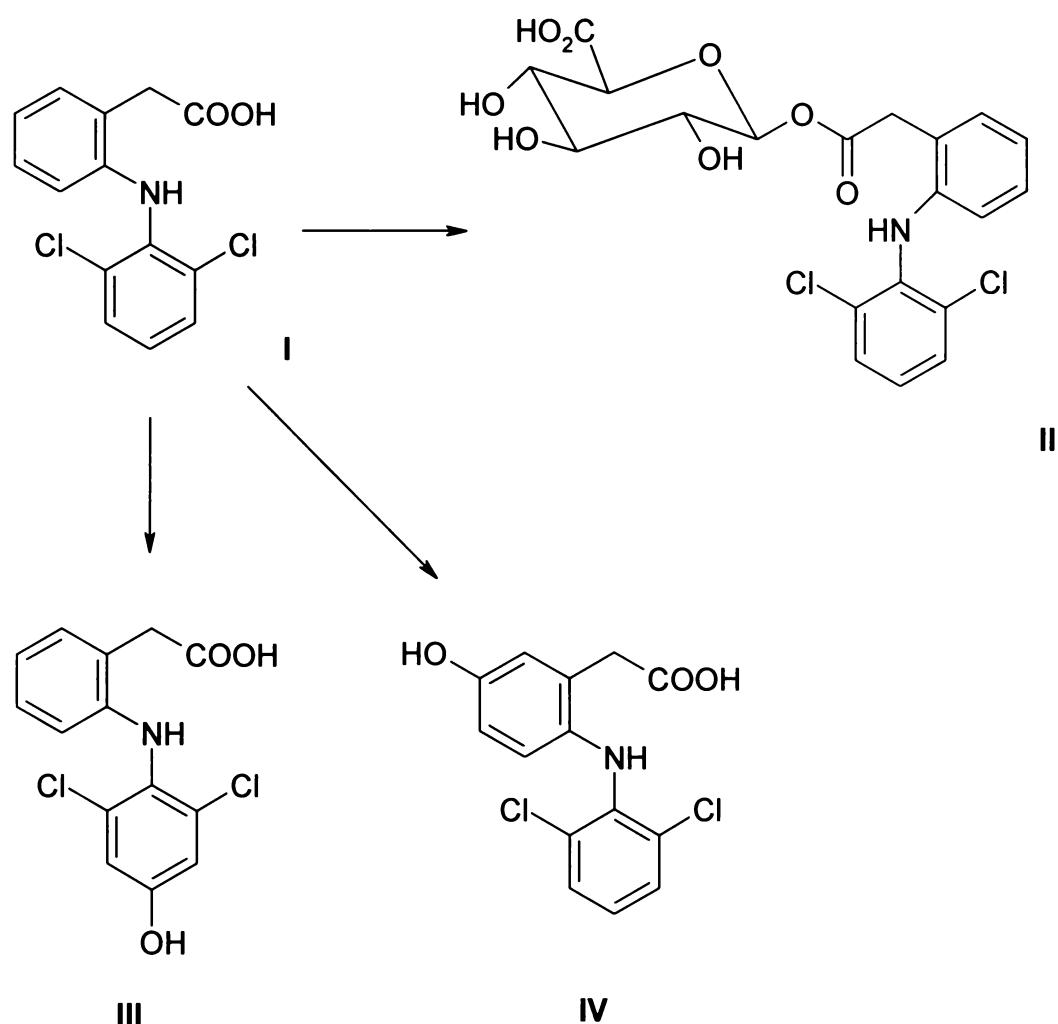


Obr. 1 Struktura diklofenaku

Toto nesteroidní antirevmatikum se vyznačuje analgetickým, antipyretickým a antiflogistickým účinkem³. Analgetické a antipyretické účinky se projeví již po jedné dávce na rozdíl od účinků antiflogistických, které se projeví až při vyšších dávkách

aplikovaných několik dnů. Snižuje projevy akutního i chronického zánětu, bolesti a hypertermii.

Mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymu cyklooxygenasy, který katalyzuje syntézu prostaglandinů, prostacyklinu a tromboxanu. Pokud se diklofenak podá intramuskulárně, pak za 10-20 minut je dosaženo maximální plazmatické koncentrace. Na plazmatické proteiny je vázáno až 99,7% tohoto léčiva. Antirevmatikum je převážně eliminováno močí (dvě třetiny) v konjugované formě s kyselinou glukuronovou, jen 1% je vylučováno v nezměněné formě, stolicí je vylučována pouze jedna třetina. Z části se také vylučuje do mateřského mléka⁴. Podrobnější studie prokázaly tvorbu tří základních metabolitů - majoritního glukuronidu a dvou minoritních hydroxyderivátů (obr. 2)⁵.



Obr. 2 Hlavní metabolity diklofenaku (I) v lidském organismu. Struktura II – majoritní glukuronid, III a IV – 4'-hydroxydiklofenak a 5-hydroxydiklofenak.

Podává se pacientům, kteří trpí akutním i chronickým zánětlivým nebo degenerativním onemocněním kloubů a páteře (revmatoidní artrida, osteoartróza), při léčbě mimokloubního revmatismu, pooperačních a poúrazových zánětů, akutního dnavého záchvatu, dále se používá na tlumení bolesti, neuralgií nebo neuritid, u nádorových onemocnění nebo zánětlivých onemocnění v gynekologii či urologii, ale také při bolesti zubů nebo hlavy.

Léčba diklofenakem je vyloučena v případě přecitlivělosti na léčivo nebo na některou pomocnou látku, na kyselinu acetylsalicylovou a ostatní NSA, při vředu žaludku a dvanáctníku i v anamnéze, při krvácivých stavech, při těžších poruchách funkce jater nebo ledvin, při těžších kardiovaskulárních onemocnění spojených s retencí tekutin. Nesmí být podáván v době gravidity a laktace. Injekční forma není určena pro děti⁶.

Přípravek je obvykle velmi dobře snášen. Nežádoucí účinky se objevují pouze ojediněle, většinou bývají mírné a přechodné. I přesto se u pacientů může vyskytnout bolest hlavy, závratě, únava, podrážděnost nebo projevy přecitlivělosti, alergické kožní reakce, bolesti žaludku, otoky.

Běžně se podává dospělým (75 mg) hluboko intragluteálně. Ve výjimečných případech se aplikuje druhá dávka týž den do opačného gluteálního svalu nejdéle však po dobu dvou dnů. Dle potřeby se přechází na užívání tablet nebo čípků.

Pokud dojde k předávkování, mohou se vyskytnout poruchy CNS (bolesti hlavy, poruchy vědomí, hyperventilace), poruchy GIT (bolesti břicha, krvácení) a funkční poruchy jater a ledvin.

Během léčby diklofenakem, není vhodné konzumovat alkoholické nápoje, neboť způsobuje pokles plazmatické koncentrace kyseliny močové a vzestup její hladiny v moči⁴.

2.2. Fytoremediace

Více než 15 let je fytoremediace nebo použití rostlinných biotechnologií, sloužících k odstranění organických nečistot a toxických kovů z odpadních vod a znečištěných míst, polem širokého zájmu vědců a rozvojových aktivit. Fytoremediace

se nyní jeví jako slibné a schůdné řešení pro dekontaminaci životního prostředí a je uznávána pro nízké náklady a svojí nenáročností na životní prostředí. Navíc je možné odstranit škodliviny přímo v původním prostředí, tzv. „in situ“ technologie. S rozvojem možností odhadnout rizika kontaminace životního prostředí je zřejmé, že v mnoha situacích je velmi vhodné použít právě pomalou, nekonfliktní a ekonomicky výhodnou metodu jakou je právě fytořemediace. Od fytořemediace se obecně očekává, že bude použitelná speciálně k extrakci iontů toxických kovů z kontaminovaných míst a k odstranění zbytků organických polutantů.

Současné lidské aktivity vedou nejčastěji k chemické kontaminaci půdy, sedimentů, vody nebo vzduchu, což může mít výrazný vliv na veškerou živou hmotu. Existující kontaminanty představují velký soubor chemických látek od anorganických (ionty těžkých kovů) až po organické molekuly s více či méně komplikovanou strukturou a variabilní rozložitelností. V případě organických sloučenin je často cílem modifikovat strukturu kontaminantu s cílem snížit jeho toxicitu, někdy však se používá jenom metoda k extrakci sledované látky, jak je tomu například u anorganických sloučenin nebo metoda fixace v určité kontaminované oblasti s cílem zabránit šíření polutantu.

Technologické strategie využívající rostliny k extrakci či modifikaci látek se nazývají „fytořemologie“ mezi které se řadí i fytořemediace jako metoda speciálně vyhrazena za účelem odstranění nebo destrukce kontaminantů. Je definována jako užití zelených rostlin k přesunu, akumulaci nebo odstraňování kontaminantů životního prostředí⁸. Fytořemologie a fytořemediace využívají přirozené rostlinné fyziologické procesy. Podobné využití rostlin se datuje již od dávné minulosti, již římská, mayská a čínská civilizace využívala možnosti čištění odpadní vody v přírodních mokřadech. V současné době jsou nejvyužívanějšími rostlinami vyšší suchozemské rostliny, stromy, trávy a z nich především běžně kultivované rostliny se známou agrotechnikou. Klasická fytořemediace je určena k čištění kontaminovaných půd nicméně moderním trendem je právě čištění především povrchových či odpadních vod v umělých mokřadech. S tím souvisí i myšlenka využití vodních rostlin k dočišťování povrchových vod, především na výstupu z čistíren odpadních vod u velkých městských aglomerací.

Ukazuje se, že remediační potenciál rostlin má výjimečný význam a to hned z několika důvodů:

1. Velká část povrchu planety je pokryta rostlinami.
2. Rostliny jako celek mají velký podíl biochemických (hlavně enzymatických) aktivit, které mohou být použity pro katabolické transformace mnoha xenobiotik.
3. Od neolitického období se lidé naučili pěstovat rostliny a tato aktivita – zemědělství - vedla k nejdůležitější produkci na světě.
4. Procesy zahrnující rostliny jsou dobře přijímány veřejností, protože tyto procesy jsou snadno pochopitelné i se základními znalostmi života rostlin, jejich cena je nízká a mohou být snadno začleněny do zemědělských i lesních porostů. Nezanedbatelnou roli hraje mnohde i estetický přínos.

Bohužel má tato metoda i své nevýhody. Je pomalejší než běžné fyzikálně-chemické metody. Může dojít k negativnímu ovlivnění průběhu dekontaminace změnou klimatických podmínek nebo obecně životních podmínek rostlin jako jsou obsah živin, vody apod. Mezi další faktory, které mohou ovlivnit průběh fytoremediační technologie patří např. struktury půdního profilu, hodnota pH půdy, koncentrace solí a polutantů, resp. přítomnost dalších polutantů. U těchto metod rovněž nedochází k úplnému odstranění polutantů, ale pouze ke snížení koncentrace, naštěstí však na biologicky přijatelnou mez.

Technologii fytoremediace lze rozdělit dle principu na následující typy:

Fytostabilizace znamená imobilizaci organických a anorganických kontaminantů mechanismem záhytu v kořenech rostlin či v rhizosféře. Hlavním úkolem této technologie je prevence migrace kontaminantů v půdě, zamezení průniku do podzemních vod či omezení rozšiřování polutantu v důsledku splachu či eroze.

Rhizodegradace (neboli rhizosférální degradace) využívá jak rostlinné kořeny, tak půdní mikroorganismy. Interakce mezi rostlinou a mikroorganismy v rhizosféře vede k rozkladu, modifikaci či mineralizaci organických kontaminantů. Rostlinné exsudáty v těchto případech stimulují růst a metabolismus mikroorganismů.

Fytodegradace je technologie, při které jsou organické kontaminanty vstřebány s rostlinou a přeměněny v jejích tkáních. Rostlinné buňky obsahují některé enzymy, které mohou metabolizovat organické kontaminanty a vzniklé produkty

mohou být dále uloženy ve vakuolách nebo buněčných stěnách. V některých případech se dá docílit i kompletní mineralizace jako například u TCE.

Fytovolatilizace využívá absorpcí kontaminantu kořeny a jeho translokaci do listů, kde je dále uvolněn do vzduchu v průběhu transpiračních dějů. Tím dojde ke zředění kontaminantu a snížení jeho toxicity.

Fytoextrakce (případně fytoakumulace) využívá možnosti akumulovat kontaminanty v rostlinných tkáních a ukládat je v extrahovatelné či neextrahovatelné formě. Často se používá pro ionty kovů, jejichž extrakci lze zvýšit použitím chelatačních činidel. Použitelná je ale rovněž pro organické kontaminanty, které se v původní či metabolizované formě mohou ukládat v rostlinných buňkách⁹.

2.3. Diklofenak v ekosystému

Jak již bylo naznačeno, použitá farmaka pro terapii nejsou v živočišných organismech účinným způsobem likvidována, jsou pouze částečně metabolizována a farmakon či jeho metabolity jsou vylučovány převážně močí. Tím snadno dochází ke kontaminaci komunálních odpadních vod, která sice podléhá technologickému zpracování v čistírnách odpadních vod, nicméně účinnost technologie vůči nízkým koncentracím farmak je obecně velmi malá. Množství odstraněného diklofenaku závisí na konkrétní technologii a podmínkách, ve kterých je provozována, ale ani v nejlepších případech nepřevyšuje hodnotu kolem 50 %. Tak například ve Švýcarsku byly u Gossau naměřeny hodnoty 1920 ng/l na vstupu čistírny a na odtoku 930 ng/l, což odpovídá 52 % účinnosti, v jiných švýcarských městech však byly při vstupních koncentracích 600-700 ng/l nalezeny na výstupu čistíren hodnoty odpovídající účinnosti 5 – 12 %¹⁰. Zajímavé jsou především hodnoty na odtoku čistíren odpadních vod, kdy třeba v Německu byly běžně stanoveny hodnoty kolem 800 ng/l¹¹. Značné koncentrace byly rovněž nalezeny v březnu 2001 v Itálii, kdy na odtoku z čistírny komunálních odpadních vod bylo v Římě nalezeno 1480 ng/l a u Neapole dokonce 5450 ng/l¹².

Vysokým hodnotám se nelze příliš divit, protože diklofenak je substancí používanou hojně a navíc léky s jeho obsahem jsou volně prodejné. Proto také informace o celkovém spotřebovaném množství jsou těžko dostupné. Publikováno

bylo například, že v Německu byla spotřeba v roce 1995 5 tun diklofenaku¹³ a v Rakousku v roce 1997 přibližně 6 tun diskutovaného preparátu¹⁴. V obou případech se však jedná pouze o množství, které prošlo lékařskou preskripcí. Data pro ČR nejsou v současné době dostupná, nicméně při přepočtu na obyvatele by hodnoty měly být srovnatelné.

Zajímavé jsou rovněž údaje o koncentracích diklofenaku v povrchových vodách. V Německu byl v řekách nalezen diklofenak v období 1995 – 1996 v koncentracích 50 – 450 ng/l¹³. Ve Švýcarsku zhruba ve stejném období do 370 ng/l¹⁵. V roce 2000 byla prováděna měření ve Španělsku, kdy byly stanoveny hodnoty do 610 ng/l¹⁶. V ČR se koncentrace této látky nemonitorují, i když jsou, jakož i ostatní farmaka, v popředí zájmů EU.

Z uvedených dat je zřejmé, že stávající čistírenské technologie nejsou dostatečně účinné vůči znečištění odpadních vod užívanými farmaky a v současné době se hledají možnosti jejich odstranění ať už klasickými metodami, či metodami biotechnologie.

3. Cíl práce

1. Provést fytoextrakční experimenty diklofenaku s vodními rostlinami
Elodea canadensis (vodní mor kanadský),
Ceratophyllum demersum (růžkatec ponořený),
Egeria najas (douška dlouholistá)
2. Imobilizovat řasu *Chlorella Kessleri* v alginátové matrici ve formě kuliček.
3. Použít imobilizovanou řasu k extrakci diklofenaku z vodného prostředí.
4. Vyhodnotit extrakční účinnost použitých rostlinných species.

4. Experimentální část

4.1. Materiál a přístroje

4.1.1. Chemikálie

Pro přípravu medií byly použity anorganické chemikálie čistoty p.a. firmy Lachema, ČR. Alginát sodný pro imobilizaci řas byl získán od firmy Fluka. Myoinositol a DMSO v kvalitě pro tkáňové kultury byl dodán firmou Sigma. Demineralizovaná voda byla získána přístrojem DEMIVA (Watek, ČR). Ethyl-acetát byl získán vlastním rektifikačním čištěním (Lachema, ČR). Diklofenak byl poskytnut firmou Zentiva a.s. Pro přípravu některých medií byl použit komerční roztok hnojiva pro vodní rostliny - Plantamin (TetraPlant). Pro HPLC analýzy byl použit methanol od firmy Lab-Scan UK) v kvalitě pro HPLC, trihydrogenfosforečná kyselina byla od firmy Fluka.

4.1.2. Rostlinný materiál

Jako biologický materiál byly použity vodní rostliny *Elodea canadensis* (vodní mor kanadský) a *Egeria najas* (douška dlouholistá) zakoupené v prodejnách PET centrum. *Ceratophyllum demersum* (růžkatec ponořený, sbírka školitele) a kultura řasy *Chlorella Kessleri* Fot e NovakLARG/1 získaná ze sbírek algologického ústavu v Třeboni (BÚ AV ČR).

4.1.3. Přístroje

Pro HPLC měření byl použit přístroj tuzemské firmy INCOS sestávající z vysokotlakého čerpadla INCOS LPC 5020, autosampleru INCOS LCS a UV detektoru INCOS 5000. Použitá mobilní fáze se skládala z 8 dílů methanolu a 2 dílů tlumivého roztoku o složení 1g/l kyseliny trihydrogenfosforečné a 2,08 g dihydrogenfosforečnanu sodného, pH pufru bylo nastaveno na hodnotu 3,2. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml za minutu, detekce UV při 280 nm. Chromatografická kolona

o rozměrech 4x250 mm byla naplněna reversní fází Reprosil 100 C18 5 µm. Data byla vyhodnocena pomocí programu Clarity (DataApex) včetně vyhodnocení kalibrační závislosti. Z dalších přístrojů byl použit pH metr (IQ, Scientific instruments), magnetická míchačka IKA-basic, rotační vakuová odparka Heidolph Laborota Digital (SRN), ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 514 M.

4.2. Příprava biologického materiálu / kultivace

4.2.1. Kultivace vodních rostlin

Vodní rostliny byly kultivovány v 0,05 % roztoku komerčního akvaristického hnojiva Plantaminu v demineralizované vodě nebo v roztoku Murashige-Skoogova media o poloviční koncentraci. Složení media je uvedeno v tabulce 1 pH roztoku bylo nastaveno na hodnotu 5,8 před sterilizací. Roztoky byly sterilizovány teplem, i když další experimenty byly prováděny nesterilně. Sterilizace vedla k výraznému potlačení kontaminace nežádoucími řasami. Kultivace byly prováděny při 25 °C se světelným režimem 12 h světlo/12 h tma.

<i>Chemikálie</i>	<i>Koncentrace (mg/l)</i>
NH ₄ NO ₃	825
KNO ₃	950
CaCl ₂ · 2H ₂ O	220
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85
H ₃ BO ₃	3,1
MnSO ₄ · 4H ₂ O	11,15
ZnSO ₄ · 4 H ₂ O	4,3
Komplexon I	0,415
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,125
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,0125
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,0125
Na ₂ EDTA	18,65
FeSO ₄ · 7H ₂ O	13,9
Myo-inositol	50

Tabulka 1 Murashige – Skoog medium o poloviční koncentraci

4.2.2 Kultivace řas

Řasy byly kultivovány v mediu dle Knoppa (tab. 2) při 25 °C se světelným režimem 12h světo/12 h tma. Alikvot 20 ml mateřské suspenze byly použity jako inokulum pro každou následnou kultivaci.

Chemikálie	Koncentrace mg/l
KNO ₃	1000
KH ₂ PO ₄	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100
FeCl ₃	0,01

Tabulka 2 Složení media dle Knoppa

4.2.3 Imobilizace řas (optimalizované podmínky dle ¹⁷)

Řasy byly imobilizovány jako suspenze řasové kultury v 1 % alginátu kapáním vzniklého roztoku do 5 % CaCl₂ za míchání na magnetické míchačce. Vzniklé kuličky byly promyty 0,7 % roztokem chloridu draselného a přeneseny do kultivačního media dle Knoppa tak, jak je uvedeno pro kultivaci suspenzních řasových kultur.

4.3. Fytoextrakce

4.3.1. Fytoextrakce diklofenaku

Předem zvážené vodní rostliny byly vloženy do Erlenmayerových baněk. K nim bylo přidáno 150 ml připraveného media dle Murashiga a Skooga o poloviční koncentraci a definované množství diklofenaku ve formě roztoku v DMSO (zásobní roztok, 5 mg/ml). Po promíchání bylo okamžitě odebráno 0,5 ml media k analýze. Rostliny byly kultivovány za těchto podmínek: 25 °C, světelný režim 12 hodin světlo / 12 hodin tma. Každý den byly odebírány vzorky media (0,5 ml) po dobu cca 2 týdnů. Vzorky byly vyhodnocovány pomocí HPLC, kdy byla sledována koncentrace diklofenaku v mediu na základě předchozí kalibrace.

Po skončení experimentu byly jednotlivé rostliny vyndány z media, omyty destilovanou vodou, osušeny na filtračním papíře a zváženy. Poté byly rostliny zamrazeny pro další experimenty stejně tak jako výsledná media.

4.3.2. Izolace produktů biotransformace diklofenaku

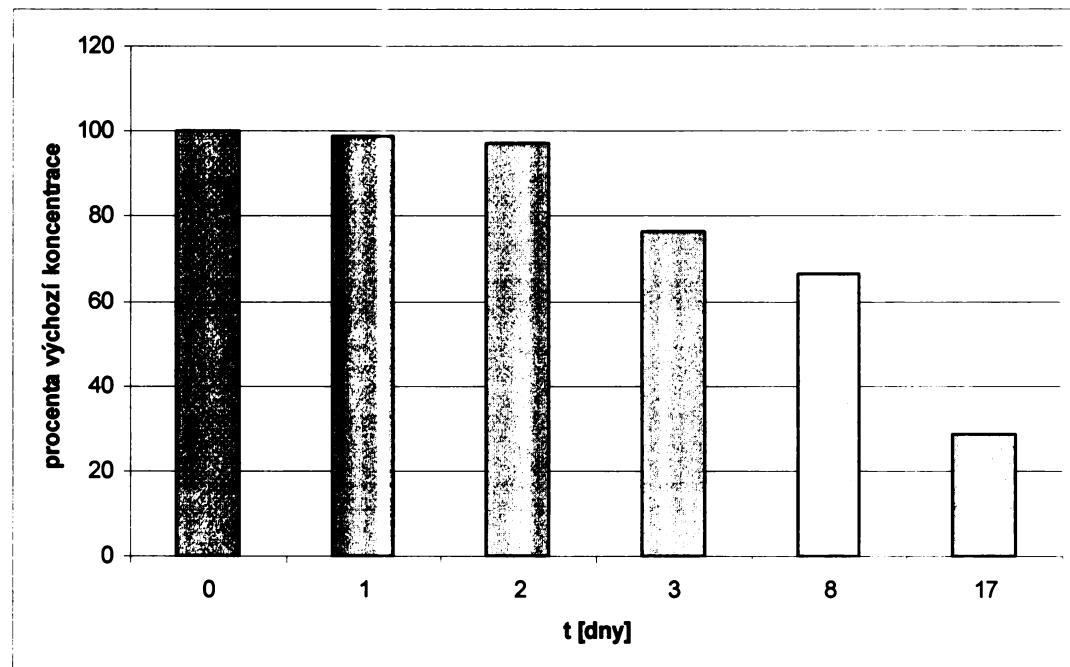
Zamražené rostliny byly homogenizovány ve třecí misce s přídavkem malého množství mořského písku. Homogenáty byly převrstveny 20 ml ethyl-acetátu a extrakce probíhala v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut. Po oddělení organického extraktu byl postup ještě 2x opakován. Spojené ethyl-acetátové extrakty byly sušeny přes noc bezvodým síranem hořečnatým. Po odfiltrování sušidla, bylo rozpouštědlo odpařeno za vakua a odparky uloženy k dalším analýzám.

Media byla po rozmrážení dvakrát extrahována ethyl-acetátem za varu. Množství ethyl-acetátu pro každou extrakci odpovídalo 25 % objemu výchozího extrahovaného media. Organické fáze byly spojeny, sušeny přes noc bezvodým síranem hořečnatým a po odstranění sušidla byl roztok zbaven rozpouštědla za vakua. Odparky byly uloženy k dalším analýzám.

5. Výsledky a diskuze

K experimentům byly zvoleny vodní rostliny se schopností přežívat v místních klimatických podmínkách a zároveň takové rostliny, které vytvářejí dostatečné množství biomasy. Nejsou to sice druhy přináležející přirozeným rostlinným společenstvům v regionu ČR, nicméně některé z nich se vyskytují i volně v přírodě, tak jak byly zaneseny do ekosystému lidskou činností (vodní mor kanadský). Použití těchto rostlin plovoucích ve vodním prostředí by však mohlo být technologicky zajímavým, protože konstrukce bioreaktorů by byla mnohem jednodušší než v případě třeba často testovaného rákosu, který vyžaduje konstrukci umělého mokřadu, kde je komplikované zajistit dostatečnou průtočnost.

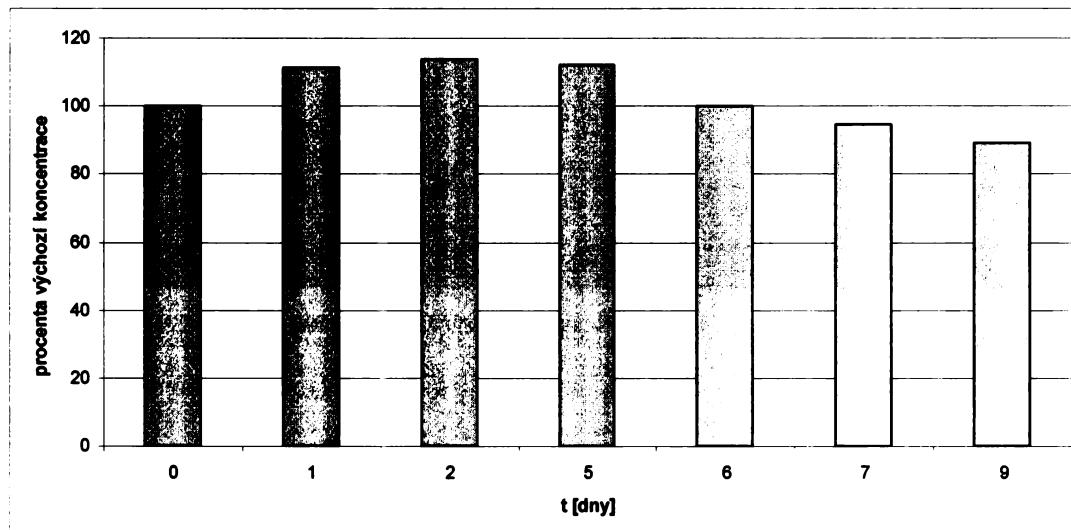
V případě vodního moru (*Elodea canadensis*) byly provedeny kultivace se vstupními koncentracemi kolem 10 mg/l polovičního MS media. Obdobné kultivace s využitím komerčního media (Plantamin) se neosvědčily, protože při HPLC analýzách media interferovala se stanovovanou látkou – diklofenakem nějaká ze složek Plantaminu. Průběh fytoextrakce je znázorněn na obr. 3.



Obr. 3 Fytoextrakce diklofenaku rostlinami vodního moru kanadského (*Elodea canadensis*) (průměr ze tří experimentů, koncentrace diklofenaku byly stanoveny HPLC, množství diklofenaku v mediu je znázorněno jako procenta výchozí koncentrace).

Z grafu je zřejmé, že během kultivace dochází k poklesu koncentrace testované substance během 17 dnů na 29 % výchozí hodnoty koncentrace při rychlosti 0,21 mg/l za den na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny.

V případě další rostlinné species *Egeria najas* byly prováděny kultivace v komerčním Plantaminu, což sice způsobilo lepší růst rostlin, nicméně následné vyhodnocení pomocí HPLC metody se ukázalo jako neschůdné. Interference signálu diklofenaku s nějakou složkou komerčního hnojiva produkovala chromatografický signál, který při integraci vedl k hodnotám koncentrace diklofenaku větším než 100 % výchozí koncentrace, což není možné. Pokusy o modifikaci separace se neukázaly úspěšnými, a proto byly kultivace v Plantaminu zastaveny. Další rostliny byly potom kultivovány pouze v polovičním MS mediu. V případě *Egerie* se však nepodařilo získat další rostlinný materiál pro následné kultivace. Na obr. 4 jsou tedy zobrazeny reálně naměřené koncentrace diklofenaku v časové závislosti. I přes zřejmou nelogičnost více než stoprocentních koncentrací je na grafu vidět určitý trend schopnosti rostliny extrahovat diklofenak z vodného roztoku, byť devítidenní kultivace vedla k poklesu pouze o 11 % výchozí koncentrace, která byla 18 mg/l.



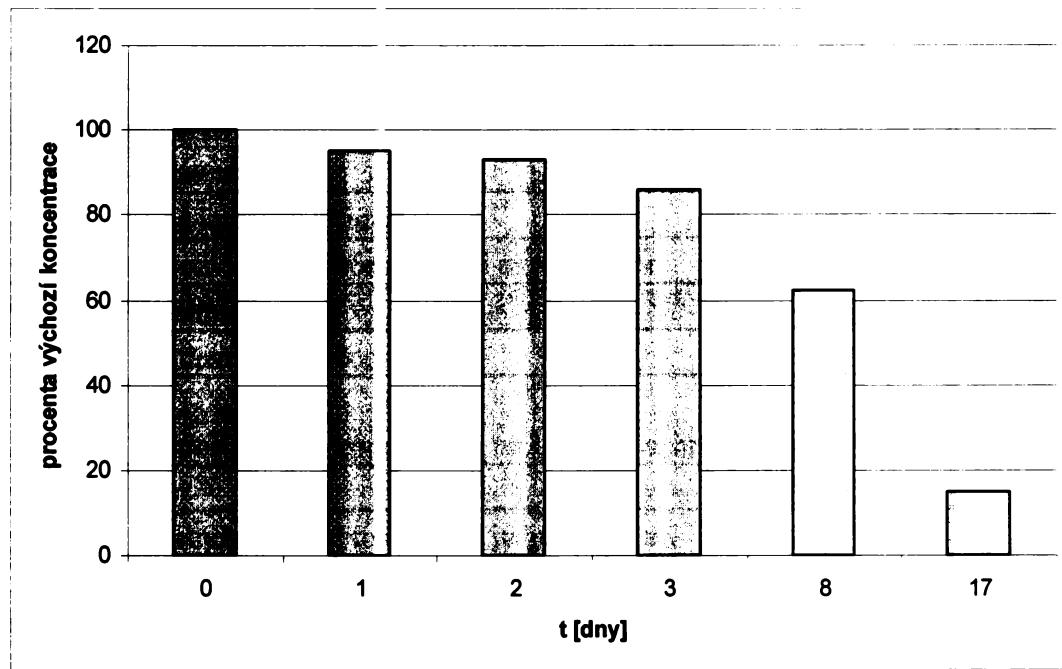
Obr. 4 Fytoextrakce diklofenaku rostlinami doušky dlouholisté (*Egeria najas*) (průměr ze čtyř experimentů, koncentrace diklofenaku byly stanoveny HPLC, množství diklofenaku v mediu je znázorněno jako procenta výchozí koncentrace).

V případě růžkatce ponořeného (*Ceratophyllum demersum*) byly provedeny tři fytoextrakční experimenty s výchozí koncentrací diklofenaku 6 – 7 mg/l (Obr. 5).

Kultivace byly provedeny v polovičním MS mediu a pokles koncentrace zkoumané látky byl sledován během 17 dnů. Výsledky jsou znázorněny na obr. 6 a okazují na vysokou extrakční účinnost použité rostliny. Po 17 dnech kultivace poklesla koncentrace diklofenaku v kultivačním mediu na 15 % výchozí hodnoty, přičemž pro tuto rostlinou species byla vypočtena průměrná hodnota poklesu koncentrace při fytoextrakci 0,14 mg/l za den na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny.



Obr. 5 Kultivace růžkatce ponořeného (*Ceratophyllum demersum*)



Obr. 6 Fytoextrakce diklofenaku rostlinami růžkatce ponořeného (*Ceratophyllum demersum*), (průměr ze čtyř experimentů, koncentrace diklofenaku byly stanoveny HPLC, množství diklofenaku v mediu je znázorněno jako procenta výchozí koncentrace).

Celkový přehled fytoextrakčních parametrů je uveden v tabulkách. 3, 4, 5.

Elodea canadensis

(vodní mor kanadský)

výchozí koncentrace	10,79 mg/l
koncentrace na konci experimentu	3,09 mg/l
procentská výchozí koncentrace na konci experimentu	29%
doba experimentu	17 dní
průměrná rychlosť úbytku koncentrace	0,45 mg/l.d
průměrná rychlosť úbytku koncentrace na 1 g čerstvé hmotnosti	0,21 mg/l.d.g
počet kultivací	3
průměrná hmotnost čerstvé rostliny na jednu kultivaci	2,13 g

Tabulka 3 Přehled fytoextrakčních parametrů použitými rostlinami (průměrné hodnoty z kultivací)

Ceratophyllum demersum

(růžkatec ponořený)

výchozí koncentrace	6,78 mg/l
koncentrace na konci experimentu	1,02 mg/l
procenta výchozí koncentrace na konci experimentu	15%
doba experimentu	17 dní
průměrná rychlosť úbytku koncentrace	0,34 mg/l.d
průměrná rychlosť úbytku koncentrace na 1 g čerstvé hmotnosti	0,11 mg/l.d.g
počet kultivací	3
průměrná hmotnosť čerstvé rostliny na jednu kultivaci	3,23 g

Tabulka 4 Přehled fytoextrakčních parametrů použitými rostlinami (průměrné hodnoty z kultivací)

Egeria najas

(douška dlouholistá)

výchozí koncentrace	22,22 mg/l
koncentrace na konci experimentu	19,88 mg/l
procenta výchozí koncentrace na konci experimentu	89%
doba experimentu	9 dní
průměrná rychlosť úbytku koncentrace	0,26 mg/l.d
průměrná rychlosť úbytku koncentrace na 1 g čerstvé hmotnosti	0,14 mg/l.d.g
počet kultivací	4
průměrná hmotnosť čerstvé rostliny na jednu kultivaci	1,83 g

Tabulka 5 Přehled fytoextrakčních parametrů použitými rostlinami (průměrné hodnoty z kultivací)

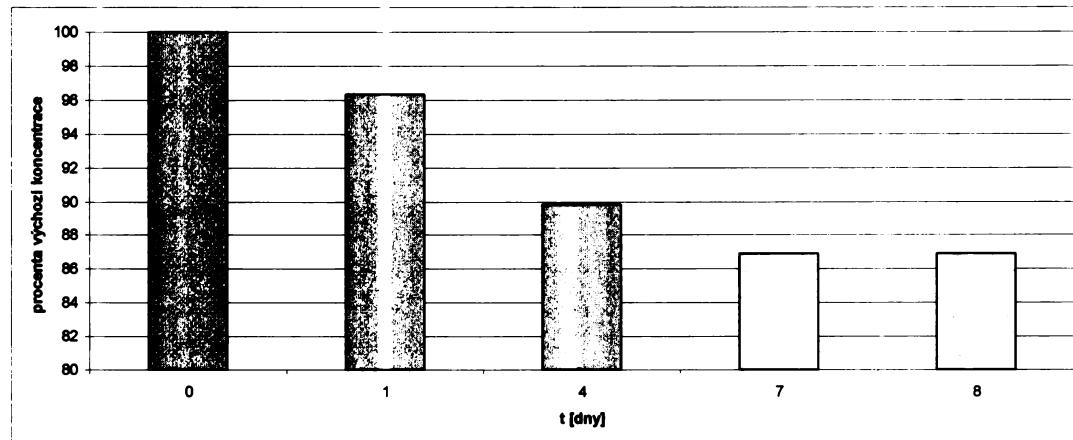
Ze srovnání jednotlivých rostlin je zřejmé, že nejvyšší fytoextrakční schopnost byla nalezena pro vodní mor kanadský, který se jeví jako optimálním i z hlediska praktické využitelnosti, neboť je rozšířen i ve vodách v ČR a s jeho kultivací by pravděpodobně nebyly větší problémy. Růžkatec ponořený je schopen nižších konečných koncentrací, procentuální úbytek výchozí koncentrace je větší, ale množství diklofenaku vztažené na množství biomasy je nižší než u vodního moru a navíc je růžkatec náročnější na kultivační podmínky. Robustní *Egeria sp.* Se původně zdála být optimální jak z hlediska kultivace, tedy nároků na živiny a teplotní podmínky, nicméně dosavadní výsledky ukazují na nereálnost jejího využití.

Zajímavým námětem je použití řas pro fytoextrakci. Řasy jsou přirozeným obyvatelem vodního prostředí a záchyt xenobiotik by mohl probíhat přirozenou cestou, navíc při stanovení vhodných parametrů by vzorky řas z reálných vodních toků mohly sloužit jako bioindikátor jejich znečištění. Pro první experimenty byla použita kultura řas *Chlorella Kessleri*, jako kultivačně nenáročná řasa s vysokou variabilitou a relativně rychlým růstem. Pro experimenty byla použita čistá, definovaná kultura získaná jako kultivát z algologického ústavu BÚ AV ČR. Při prvních experimentech se ukázalo, že použití řasové kultury v klasické suspenzi není příliš výhodné, množství biomasy i ve zdánlivě bohaté suspenzi řas je velmi malé. Z technologického hlediska je rovněž vhodnější použít nějakou imobilizovanou formu, která kromě snadnější manipulace vykazuje i větší životaschopnost. Pro imobilizaci byla zvolena alginátová metoda, kdy suspenze řas v alginátu se kape do roztoku chloridu vápenatého a vznikají kuličky materiálu s imobilizovanou řasou. Přestože metoda je již delší dobu známá byla provedena řada experimentů s různými koncentracemi alginátu a chloridu vápenatého a experimentálním uspořádáním, aby byla získána imobilizovaná řasa s minimální rozpadavostí vzniklých kuliček a s co nejmenším uvolňováním materiálu do kultivačního media. Výsledkem byl imobilizát, který vykazoval požadované vlastnosti a je ukázán na obr. 7.



Obr. 7 Imobilizovaná řasa v kultivačním
mediu (*Chlorella Kessleri*/alginát)

Fytoextrakce diklofenaku z kultivačního media byla provedena jednak s imobilizovanou řasou, jednak s alginátovými kuličkami připravenými za stejných podmínek bez řasy protože byla obava, že samotný alginát by mohl vychytávat studované xenobiotikum z roztoku. Tento předpoklad se nepotvrdil a tak obrázek 7 vypovídá o skutečné interakci řasy se studovanou látkou.



Obr. 8 Fytoextrakce diklofenaku imobilizovanými řasami *Chlorella Kessleri*, (jeden experiment, koncentrace diklofenaku byly stanoveny HPLC, množství diklofenaku v mediu je znázorněno jako procenta výchozí koncentrace).

Časová závislost koncentrace diklofenaku v mediu odpovídá extrakci do buněk použité řasy a i když konečná koncentrace odpovídá 87 % koncentrace výchozí je extrakční mohutnost vysoká 0,65 mg/l za den na 1 g čerstvé hmotnosti což několikanásobně převyšuje hodnoty získané pro použité vodní rostliny. Celkový přehled fytoextrakčních parametrů je v tabulce č. 6.

Chlorella Kessleri FOTT et NOVAK LARG/1

výchozí koncentrace	5,42 mg/l
koncentrace na konci experimentu	4,71 mg/l
% výchozí koncentrace na konci experimentu	87%
doba experimentu	8 dní
průměrná rychlosť úbytku koncentrace	0,09 mg/l.d
průměrná rychlosť úbytku koncentrace na 1 g suché hmotnosti	0,53 mg/l.d.g
počet kultivací	1
průměrná hmotnost (usušené) rostliny na jednu kultivaci	0,17g

Tabulka č. 6 Fytoextrakční parametry pro řasu *Chlorella Kessleri* imobilizovanou v alginátu.

Výsledky fytoextrakcí imobilizovanou řasou jsou velmi nadějné, množství extrahované na gram biomasy je poměrně velké a zdá se, že tento systém vykazuje značnou viabilitu. Reálným by bylo zřejmě i využití imobilizované řasy v kontinuálním průtokovém reaktoru.

6. Závěr

V práci byla testována možnost fytoextrakce antirevmatika diklofenaku třemi vodními rostlinami a kulturou imobilizovaných řas. Experimenty byly prováděny ve vsádkovém uspořádání jako kultivace vodného roztoku xenobiotika diklofenaku v přítomnosti biologického materiálu a stanovována byla časová závislost koncentrace testované substance v kultivačním mediu. Jako vodní rostliny byly zvoleny takové, které jsou schopny růst v místních klimatických podmínkách, resp. takové, které se vyskytují v našich biotopech, byť nejsou původní. Jako použitelným se ukázal vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*), růžkatec ponořený (*Ceratophyllum demersum*) sice vykazuje schopnost fytoextrakce nicméně z kultivačního hlediska je mnohem náročnější. Robustní douška dlouholistá (*Egeria najas*) má fytoextrakční schopnost velmi malou.

V kulturách řas *Chlorella Kessleri* je nevhodnější uspořádání s imobilizovanou řasou, kdy byla nalezena metoda imobilizace do alginátu, která produkuje materiál vhodný pro fytoextrakci a který vykázal vysokou schopnost extrahovat testované farmakon z vodních roztoků a vzhledem k získaným mechanickým vlastnostem by byl zřejmě vhodný k použití v průtočných reaktorech.

7. Seznam zkratek

NSA	nesteroidní antirevmatika
GIT	gastrointestinální trakt
TCE	trichlorethylen
EU	Evropská unie
DMSO	dimethylsulfoxid
MS	Murashige –Skoog medium
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

8. Použitá literatura

1. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_01_19-26.pdf, 17. 7. 2008.
2. Remedia Compendium, str. 523-524, 527, 3. vydání, Panax Co. s.r.o., 1999.
3. http://www.medicomint.cz/cz/vpois_info.aspx?id=8&srt=abc, 2. 8. 2008.
4. <http://www.zentiva.cz/default.aspx/cz/productwide?Kod=54539&DetailType=detail&Type=10>, 3. 8. 2008.
5. D.J. Naisbitt et al. Toxicol. Lett., *168*, 45-50 (2007).
6. Lincová D., Farghali M. et al: Základní a aplikovaná farmakologie, str. 271-279, Galén/ Karolinum 2002, 1.vydání, 2002.
7. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie, str. 324-340, Grada Publishing, 2002.
8. Cunningham D. S., Berti W. R., Juany W.J.: TIBTECH *13*, 393 (1995).
9. Vaněk T., Schwitzguebel J.-P.: Phytoremediation Inventory COST Action 837 View. 1-3 ÚOCHB AV ČR 2003, ISBN 80-86241-19-X..
10. Buser H. R., Poiger T., Müller M. D.: Environ. Sci. Technol. *32*, 3449 (1998).
11. Heberer T., Schmidt-Bäumler K. Stan H. J.: Acta Hydrochim. Hydrobiol. *26*, 272 (1998).
12. Andreozzi R., Rafaele M., Paxéus N.: Chemosphere *50*, 1319 (2003).
13. Ternes T. A.: Wat. Res. *32*, 3245 (1998).
14. Strenn B., Clara M., Gans O., Kreuzinger N.: Water Sci. Technol. *50*, 269 (2004).
15. Buser H. R., Poiger T., Müller M. D.: Environ. Sci. Technol. *32*, 3449 (1998).
16. Farré M., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barceló D.: J. Chromatogr. A *938*, 187 (2001).
17. Lukavský J., Komárek J., Košánová A., Ludvík J.: Autorské osvědčení vynálezu PV 9083-84 z 30. září 1988.