

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jaroslav Jirák

REZIDUA FARMÁK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ  
INTERAKCE S VYŠŠÍMI ROSTLINAMI

RESIDUA OF DRUGS IN THE ENVIRONMENT  
INTERACTION WITH HIGHER PLANTS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom 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 10. května 2016

.....

podpis

## Abstrakt

Cílem této práce bylo provedení fytoextrakčních experimentů s kukuřicí setou (*Zea mays*) a stanovení fytoextrakční účinnosti u vybraných nesteroidních protizánětlivých léčiv a karbamazepinu a jejich vzájemných kombinací. K hydroponicky sterilně kultivovaným rostlinám bylo po 10 dnech růstu přidáno kultivační médium s obsahem ibuprofenu, diklofenaku, naproxenu a karbamazepinu v koncentracích 5 – 10 mg/L. Z kultivačního média byly s odstupem 24 hodin odebrány vzorky, které byly následně analyzovány pomocí metody HPLC/DAD. Po ukončení experimentu byla z rostlin a kořenů použitých při experimentu provedena analýza extrahovatelných reziduí pomocí metody HPLC/DAD + FLD.

Největší fytoextrakční účinnost byla nalezena u ibuprofenu. Druhou a třetí nejvyšší účinnost vykázal naproxen a diklofenak, v závislosti na kritériu vyhodnocení fytoextrakční účinnosti. Nejnižší fytoextrakční účinnost byla pozorována pro karbamazepin.

Ve vícekomponentním uspořádání pokusu bylo zjištěna snížená fytoextrakční účinnost pro všechny látky s výjimkou ibuprofenu v kombinaci s karbamazepinem a diklofenakem. Bylo rovněž prokázáno toxické působení ibuprofenu na transportní mechanismy rostliny.

Analýza extrahovatelných reziduí potvrdila koncept toxicity ibuprofenu pro transportní systémy rostliny a také možnost kontaminace potravního řetězce.

### Klíčová slova:

Fytoremediace, biotechnologie, znečištění životního prostředí, rezidua farmak, NSAID

## Abstract

The aim of this study was to carry out phytoextraction experiments using corn plants (*Zea mays*) and determine the phytoextraction efficiency for specific non-steroidal anti-inflammatory drugs and carbamazepine and their combinations. After 10 days of growth, a nutrient solution containing ibuprofene, naproxene, diclofenac and carbamazepine in concentrations ranging from 5 to 10 mg/L was added to hydrophonically cultivated plants. Nutrient solution samples were taken every 24 hours and the samples were then analysed using a HPLC/DAD system. At the end of the experiment, the experimental plants and roots were analysed for extractable residua using HPLC/DAD + FLD.

The greatest phytoextraction efficiency was found for ibuprofene. The second and third most effective extraction was observed for naproxene and diclofenac, depending on the evaluation criteria. The lowest phytoextraction efficiency was observed for carbamazepine.

With multi-component experiments, lower phytoextraction efficiency was found out for all substances with the exception of ibuprofene in combination with diclofenac and carbamazepine. The toxic impact of ibuprofene on plant transport mechanisms was also proven.

The extractable residua analysis confirmed the ibuprofene's toxicity on plant transport mechanisms and also the possibility of food chain contamination.

### Key words:

Phytoremediation, biotechnology, environmental pollution, drug residua, NSAID

## **Poděkování**

Rád bych na tomto místě vyjádřil svůj upřímný dík svému školiteli, doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., za jeho vedení, vědění, pomoc a za pevné nervy. Ing. Šárce Pšondrové patří můj dík za cenné rady a výpomoc s realizací práce. RNDr. Štěpánce Smrčkové, PhD. děkuji za technickou realizaci analýzy extrahovatelných reziduí.

Stejně tak děkuji své rodině a všem, kteří uvěřili, přestože už nevěřili.

# Obsah

Prohlášení .....	- 2 -
Abstrakt .....	- 3 -
Abstract.....	- 4 -
Poděkování .....	- 5 -
Obsah .....	- 6 -
Seznam použitých zkratk a symbolů .....	- 8 -
1 Úvod .....	- 9 -
2 Cíl práce.....	- 10 -
3 Teoretická část .....	- 11 -
3.1 Xenobiotika a jejich výskyt v životním prostředí .....	- 11 -
3.2 Nenarkotická analgetika .....	- 13 -
3.2.1 Ibuprofen (IBU) .....	- 15 -
3.2.2 Naproxen (NPX) .....	- 16 -
3.2.3 Diklofenak (DCF) .....	- 17 -
3.3 Karbamazepin (CBZ) .....	- 19 -
3.4 Fytoremediace .....	- 20 -
3.4.1 Fytoextrakce.....	- 22 -
3.4.2 Fytodegradace .....	- 23 -
3.4.3 Rhizofiltrace.....	- 24 -
4 Experimentální část .....	- 26 -
4.1 Chemikálie a přístroje .....	- 26 -
4.1.1 Analýza vzorků kultivačního média .....	- 26 -
4.1.2 Analýza extrahovatelných reziduí.....	- 28 -

4.2	Kultivace pokusných rostlin a odběr vzorků pro analýzu .....	- 28 -
4.3	Izolace extrahovatelných reziduí a jejich analýza .....	- 32 -
5	Výsledky a diskuze .....	- 33 -
5.1	Monokomponentní uspořádání .....	- 34 -
5.1.1	Ibuprofen .....	- 34 -
5.1.2	Diklofenak .....	- 35 -
5.1.3	Naproxen .....	- 37 -
5.1.4	Karbamazepin .....	- 38 -
5.2	Dikomponentní uspořádání .....	- 42 -
5.2.1	Ibuprofen + Diklofenak .....	- 42 -
5.2.2	Ibuprofen + Naproxen .....	- 44 -
5.2.3	Ibuprofen + Karbamazepin .....	- 45 -
5.3	Trikomponentní uspořádání .....	- 48 -
5.3.1	Ibuprofen + Diklofenak + Naproxen .....	- 48 -
5.4	Analýza extrahovatelných reziduí .....	- 49 -
6	Závěr .....	- 54 -
7	Seznam literatury .....	- 56 -

## Seznam použitých zkratek a symbolů

C18 - oktadecyl

CBZ - karbamazepin

ČOV- čistírna odpadních vod

DAD – diode-array detector – detektor s diodovým polem

DCF – diklofenak

DDT – dichlordifenyltrichlormethylmethan

DMSO – dimethylsulfoxid

EDC- endokrinní disruptory

FLD – fluorescenční detektor

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IBU - ibuprofen

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

MSBC – medium dle Murashiga a Skooga bez cukru

NPX – naproxen

NSA- nesteroidní antirevmatika

NSAID- nesteroidní protizánětlivé látky

PAH – polycyklické aromatické uhlovodíky

PCB – polychlorované bifenyly

PGH2 – prostaglandin H2

SÚKL – státní ústav pro kontrolu léčiv



# 1 Úvod

Lidská civilizace zažívá nebývalý rozvoj nejen po stránce vědeckého a technického pokroku, ale také po stránce možností kulturního, společenského a sportovního vyžití. Vzájemná komunikace nikdy v lidské historii nebyla snadnější, množství dostupného zboží a služeb převyšuje schopnost běžné lidské bytosti stihnout je za svůj život vůbec všechny vyzkoušet, a také kvalita lékařské péče a průměrná délka života rostou [1]. Na první pohled se zdá, že se lidstvo jen těžko může mít ještě lépe, alespoň v civilizovaných částech světa.

Některé ukazatele však poukazují na zajímavý rozpor mezi zdánlivým blahobytem a realitou. Jedním z takových ukazatelů je meziroční nárůst spotřeby léčivých přípravků, který je například v České republice za poslední roky dobře patrný [2-4]. Fakt, že už i malé děti mohou trpět poměrně závažnými depresemi, které vyžadují farmaceutický zásah, je značně neradostnou skutečností [5].

Neroste pouze spotřeba léčiv humánních, s rozvojem potravinářského průmyslu a agrikultury a jejich neduhů jsou také léčiva veterinární stále aktuálnější spotřební položkou.

Velká spotřeba léčiv s sebou nevyhnutelně nese také jejich vstup do životního prostředí, kde mohou napáchat značné škody na mnoha frontách. Jelikož podáním léčiva do organismu jeho osud ani zdaleka nekončí, je třeba věnovat zvýšenou pozornost následnému pohybu těchto látek v životním prostředí, jejich interakcím s ekosystémy a možnostem jejich včasné eliminace.

Civilizované oblasti planety sice budují často celou kaskádu čistíren odpadních vod (ČOV), jejich eliminační technologie se však obvykle nestíhají vyvíjet stejně rychle jako portfolio léčiv používaných na všechny možné nemoci a nepříznivé stavy lidské či zvířecí existence. Nehledě na skutečnost, že zdaleka ne všechny cesty vstupu léčiv do životního prostředí vedou skrz alespoň nějaké eliminační zařízení.

V důsledku tohoto vývoje roste potřeba účinných, levných a snadno implementovatelných opatření pro odstranění léčiv ze životního prostředí. Fytoremediační techniky, v případě jejich prokázané účinnosti pro konkrétní látky, by tyto požadavky mohly v určité míře uspokojit.

## 2 Cíl práce

Cílem této práce je stanovit schopnost fytoextrakce (a případně fytodegradace či rhizofiltrace) nesteroidních protizánětlivých léčiv (ibuprofen, diklofenak, naproxen) a antiepileptika karbamazepinu vybraným kultivarem *Zea mays*. Zkoumána je nejen schopnost fytoextrakce pro jednotlivá léčiva, ale rovněž pro jejich vzájemné kombinace, kdy je vyhodnocován vliv přítomnosti dalšího léčiva na míru fytoextrakce látky rostlinou. Dále jsou vyhodnocována extrahovatelná rezidua získaná z tkání rostlin (kořeny, stonky + listy) po ukončení odběrů vzorků média.

Práce sestává z:

- 1) *In vitro* přípravy sterilních kultur určeného hybridu kukuřice seté a jejich kultivaci
- 2) Realizace fytoextrakčních experimentů s jedno- a vícesložkovými roztoky vybraných farmak v kultivačním médiu
- 3) Stanovení časové závislosti poklesu koncentrace studovaných léčiv v kultivačním médiu metodou HPLC
- 4) Homogenizace rostlinných částí a analýzu extrahovatelných reziduí
- 5) Vyhodnocení účinnosti fytoextrakce pro jednotlivá léčiva a jejich kombinace

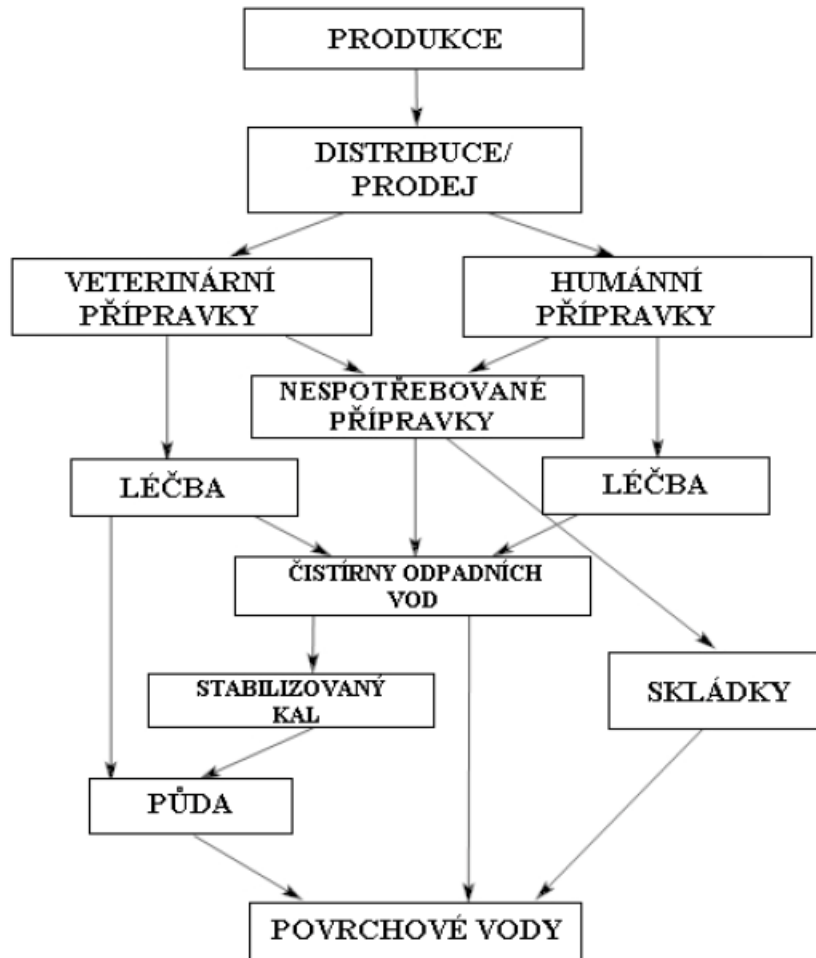
## 3 Teoretická část

### 3.1 Xenobiotika a jejich výskyt v životním prostředí

Chemické látky, ať již původu přírodního nebo syntetického, člověka provázejí již mnoho desítek, v některých případech dokonce stovek let jeho existence. Zároveň se jeho přičiněním nevyhnutelně dostávají také do životního prostředí. Monitorování přítomnosti a účinků xenobiotik v životním prostředí je však přístup historicky relativně nový. Zatímco některé události s sebou nesou punc „nechvalné proslulosti“ (používání DDT, chemické katastrofy jako například Bhópál, Seveso a jiné), povědomí veřejnosti o „každodenním chemickém znečišťování“ je poměrně nízké.

Kromě průmyslových havárií a cíleného vypouštění chemikálií, což jsou z podstaty věci spíše nárazové záležitosti, se do životního prostředí denně dostává řada chemických látek. Od polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a polychlorovaných bifenyly (PCB) přes pesticidy a zpomalovače hoření až po prostředky osobní hygieny a v neposlední řadě také léčiva [6].

Cesta léčiv do životního prostředí se poněkud liší od cest jiných xenobiotik, neboť vede především skrze odpadní vody. Léčiva, ať už užívaná lidmi nebo zvířaty, jsou organismem vylučována buď v podobě nezměněné, nebo v podobě metabolitů, které mohou mít pro životní prostředí často i závažnější dopad než původní látka. Schéma toku léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí ilustruje Obrázek 1.



Obr. 1 Schéma pohybu léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí [7].

V případě humánních přípravků jsou styčným bodem odpadních cest čistírny odpadních vod, které by teoreticky měly problém řešit, bohužel v praxi často nejsou vybaveny dostatečnými technologiemi pro záchyt a eliminaci těchto polutantů [8]. Výjimkou nejsou ani průsaky septiků či vypouštění neupravených splašků přímo do vodních toků [9].

Další částí řetězce výskytu xenobiotik v životním prostředí jsou pak povrchové a podzemní vody. Nejvyšší stupně kontaminace lze očekávat v oblastech s vysokou hustotou osídlení, ani odlehlé oblasti však nejsou výjimkou [10]. Přítomnost nejrůznějších léčiv byla zjištěna prakticky ve všech podobách vodních děl a toků, od pramenů a řek přes jezera a nádrže až po moře a oceány [11]. Pomyslným „uzavřením koloběhu“ je pak zjištěná přítomnost léčiv ve zdrojích pitné vody, například ve vodní nádrži Želivka [7]. Celou situaci navíc zhoršuje skutečnost, že pro řadu léčiv data

týkající se ekotoxicity úplně chybí [12].

Jednou z nejvíce skloňovaných kategorií léčiv poslední doby jsou látky narušující endokrinní systémy organismů, což může mít pro daný organismus i spřažený ekosystém velmi vážné následky [13]. „Zlatým standardem“ studií působení látek z této skupiny na vodní i jiné ekosystémy je 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, který je součástí velmi hojně užívaných hormonálních kontraceptiv. SÚKL eviduje ke dni vzniku této práce 246 obchodovaných léků s obsahem ethinylestradiolu [14]. Přítomnost této látky v ekosystémech však vede k jejich významné feminizaci a často i souvisejícímu vymírání druhů [15], [16].

Zdaleka však nejde o jediné aktéry závažného farmaceutického zatížení životního prostředí, přestože jejich projevy jsou velmi dobře pozorovatelné. Chronické vystavení organismů působení nejrůznějších léčiv může vést k závažnému poškození těchto organismů a souvisejících ekosystémů jak z hlediska cílových účinků daného léčiva, tak z hlediska účinků vedlejších či doposud neznámých, případně i z hlediska jevů jako například oxidativní stres [17].

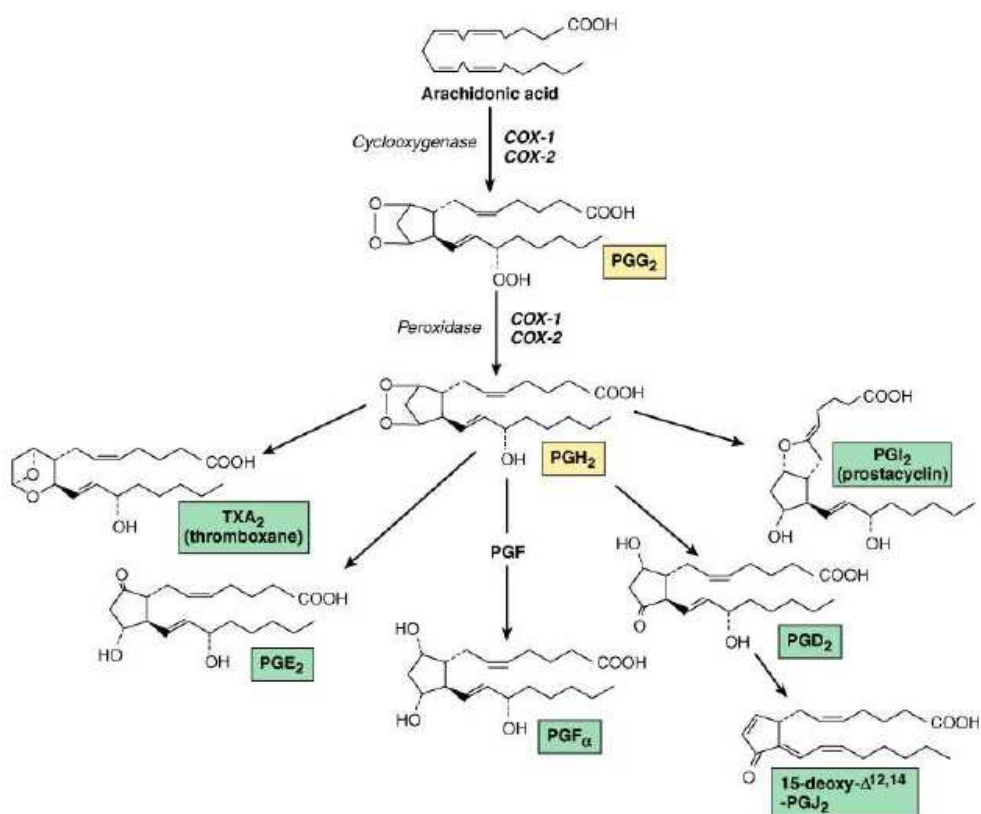
Obecně lze říci, že čím používanější nějaké léčivo je, tím větší je pravděpodobnost jeho přítomnosti v nejrůznějších kompartmentech životního prostředí a také riziko s jeho přítomností spojené. Z tohoto pohledu jsou pak velmi významnou skupinou nenarkotická analgetika, jedna z nejčastěji užívaných léčiv vůbec.

## **3.2 Nenarkotická analgetika**

Nenarkotická analgetika jsou velkou skupinou léčiv, jejichž účinek se neomezuje pouze na působení proti bolesti, ale zahrnuje také působení antiflogistické a antipyretické. Podíl těchto doprovodných účinků umožňuje skupinu dále rozdělit na analgetika-antipyretika, u nichž dochází kromě mírnění bolesti především ke snižování tělesné teploty, a nesteroidní protizánětlivé látky, které pomáhají eliminovat nebo snižovat negativní působení probíhajících zánětlivých procesů [18]. V případě této druhé skupiny se v literatuře někdy setkáváme se zkratkou NSA (non-steroidal anti-rheumatics – nesteroidní antirevmatika), častěji však NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs – nesteroidní protizánětlivé látky). Označení „nesteroidní“ bylo

zavedeno s cílem odlišit novou skupinu léčiv od steroidních přípravků, které rovněž vykazují protizánětlivý účinek působením na biochemické dráhy eikosanoidů. [19].

Mechanismus účinku NSAID spočívá v inhibici enzymů ze skupiny cyklooxygenas. Tyto enzymy jsou zodpovědné za přeměnu kyseliny arachidonové, poly-nenasycené omega-6 mastné kyseliny přítomné ve fosfolipidech buněčných membrán, na prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Působením dalších enzymů se pak z PGH<sub>2</sub> vytvářejí buď další prostaglandiny, nebo tromboxan A, jak je patrné z Obrázku 2. Zatímco prostaglandiny jsou mediátorovými molekulami signálních drah bolesti, horečky a zánětu, tromboxan A se podílí na agregaci krevních destiček. Inhibicí cyklooxygenas dochází ke snížené produkci prostaglandinů a tím k utlumení nežádoucích procesů v organismu. Účinek NSAID má podobu kompetitivně reversibilní reakce, na rozdíl například od účinku kyseliny acetylsalicylové, který je ireversibilní [20].



Obr. 2 Biochemické dráhy vzniku prostaglandinů a tromboxanu A [21].

Charakteristickým nežádoucím účinkem skupiny NSAID je negativní působení na trávicí trakt. Zatímco inhibice enzymu COX-2 je zodpovědná za protizánětlivé působení, inhibice COX-1 může vést k erozi žaludeční sliznice a vzniku žaludečních vředů. Prostaglandiny se také podílejí na řízení glomerulární filtrace a renální perfuze. Inhibice jejich syntézy může proto působit nefrotoxicky [22]. Nepříliš často uváděným jevem, kterému je však třeba rovněž věnovat pozornost, je skutečnost, že tato léčiva sice mírní projevy zánětlivých a bolestivých procesů, neodstraňují však jejich příčinu.

### 3.2.1 Ibuprofen (IBU)

Za léčivo ibuprofen svět vděčí chemiku Stewartu Adamsovi, který jej objevil v roce 1961 a údajně se jej mimo jiné pokusil použít na zmírnění své kocoviny [23]. Jedná se o nejprodávanější léčivo v České republice [2]. Jako generické léčivo s antipyretickým a analgetickým účinkem se běžně používá při horečkách, nachlazení, bolestech zubů, menstruačních bolestech, bolestech pooperačních a často také bolestech hlavy a jiných bolestivých stavech. Další využití nachází při léčení zánětlivých a/nebo degenerativních kloubních onemocněních, revmatismu, revmatoidní artritidy a osteoporózy [24]. Ibuprofen, syntetizovaný ve formě racemické směsi, je dobře vstřebáván v trávicím ústrojí, váže se na plazmatické bílkoviny (především albumin) a jeho biologický eliminační poločas je asi 2 hodiny [25].

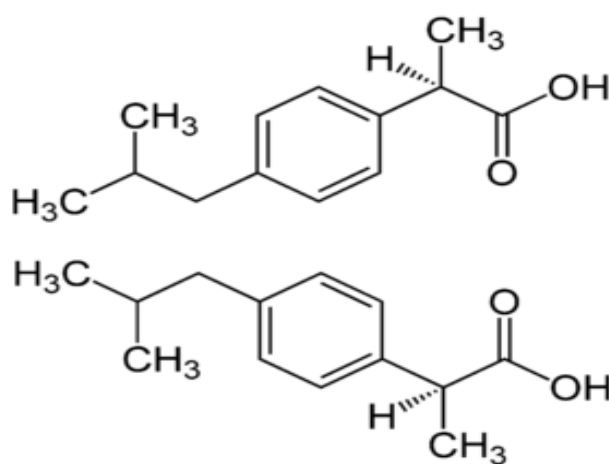
Nežádoucí účinky běžně zahrnují pálení žáhy a vyrážky. Běžné jsou také obecně poruchy trávicí soustavy, léčivo ovlivňuje také funkci jater a ledvin. Paradoxně může způsobovat také bolesti hlavy, dále závratě, zhoršené vidění, některé zdroje uvádějí také závratě a nespavost [26]. Vzhledem k jeho dostupnosti bez lékařského předpisu dochází poměrně často k předávkování tímto léčivem, i když studie uvádějí, že následky běžného předávkování nejsou příliš závažné [27].

Ibuprofen je neselektivním inhibitorem cyklooxygenas, nicméně jeho přesný mechanismus účinku není znám. S-izomer je považován za farmakologicky aktivnější než jeho R- protějšek [28].

Vzhledem k četnosti svého používání má ibuprofen vysoký potenciál pro environmentální kontaminaci. Jeho přítomnost byla zaznamenána v mnoha studiích, od

monitorovacích experimentů v relativně civilizaci méně pokročilých oblastech [29], až po evropské státy [30]. Jako u mnoha jiných léčiv z kategorie NSAID, i v případě ibuprofenu výzkum poukazuje na ovlivnění ekosystémů, potravního řetězce a resistance organismů vůči určitým skupinám látek [31]. Jsou vyvíjeny různé metody eliminace ibuprofenu z životního prostředí, ať již přímo v ČOV ve fázi aktivovaného kalu (s účinností až 99%) [32], nebo následně, například za využití fotokatalytické degradace na titanovém katalyzátoru [33].

Chemickou strukturu ibuprofenu a jeho název podle IUPAC uvádí Obrázek 3.



(*RS*)-2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina

Obr. 3 Chemický vzorec ibuprofenu a jeho název podle IUPAC.

### 3.2.2 Naproxen (NPX)

Naproxen byl vyvinut formou Syntex a jeho uvedení na trh se datuje do roku 1976 pod názvem Naprosyn [34]. Indikace naproxenu sahají od bolestivých stavů způsobených osteoporózou a různými záněty (šlachy, klouby), přes léčbu poúrazových stavů až po zmírnění bolestí vyvolávaných ledvinovými kameny a menstruací. V rámci dlouhodobého podávání je používán také pro léčbu chronické bolesti. Je často lékem první volby u pacientů se zvýšeným rizikem kardiovaskulární příhody, neboť pravděpodobnost vyvolání těchto komplikací je u naproxenu nižší. Eliminační poločas činí 12-15 hodin [35].

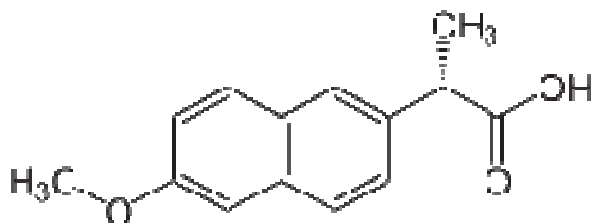


Nežádoucí účinky odpovídají nežádoucím účinkům skupiny inhibitorů cyklooxygenas, především riziko narušení žaludeční sliznice a vzniku žaludečních vředů. Naproxen patří v tomto ohledu ke středně rizikovým léčivům, ve srovnání s relativně nízkorizikovým ibuprofenem a velmi rizikovým indometacinem [36]. Méně časté jsou pak bolesti hlavy, nespavost, poruchy soustředění, případně kožní reakce [37].

Mechanismem účinku je inhibice enzymů třídy COX-1 a COX-2 [38].

Co se týče hlediska životního prostředí, studie publikovaná v roce 2007 uvádí, že riziko ohrožení životního prostředí je, alespoň v západní Evropě, nízké, a naměřené hodnoty koncentrací ve vodních tocích jsou nižší než předpokládané koncentrace vypočtené na základě matematických modelů [39]. Jiná studie, z roku 2013, však poukazuje na přítomnost tohoto léčiva ve žluči ryb žijících ve vodních tocích po proudu od čistíren odpadních vod [40]. Jsou vyvíjeny speciální metody odstraňování této látky z vody a životního prostředí [41].

Chemickou strukturu naproxenu a jeho název podle IUPAC uvádí Obrázek 4.



(2S)-2-(6-methoxy-2-naftyl)propanová kyselina

Obr. 4 Chemický vzorec naproxenu a jeho název podle IUPAC.

### 3.2.3 Diklofenak (DCF)

Diklofenak byl poprvé syntetizován dvojicí vědců Alfredem Sallmannem a Rudolfem Pfisterem a následně uveden na trh pod názvem Voltaren v roce 1973 [42]. Je indikován v případech akutních i chronických artritid, zejména revmatologických. Vykazuje analgetické, antipyretické a antiflogistické účinky. Dobře se resorbuje při

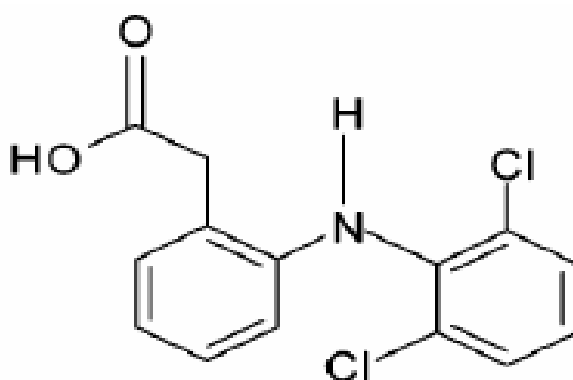
perorálním podání, nicméně téměř polovina podané dávky podléhá presystémové eliminaci. V případě intenzivnějších viscerálních bolestí se někdy používá i v injekční formě. Vazba na plasmatické bílkoviny přesahuje 99%. Eliminační poločas se uvádí jako 1-2 hodiny [43].

Vedlejší účinky zahrnují trávicí obtíže, bolesti hlavy, ospalost, nebo přecitlivělost. Srovnávací lékařské studie poukazují na významně zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění [44]. Inhibice cyklooxygenasy vede ke snížené syntéze renálních prostaglandinů, což nepříznivě ovlivňuje funkci ledvin [45].

Kromě primárního účinku inhibice cyklooxygenasy vykazuje také mírnou bakteriostatickou aktivitu díky inhibici syntézy bakteriální DNA [46]. Za zmínku stojí rovněž skutečnost, že účinek jedné dávky přetrvává podstatně déle, než odpovídá poločasu eliminace tohoto léčiva. Částečnou zodpovědnost za prodloužený účinek pravděpodobně nese ukládání do synoviální tekutiny [47].

Díky míře svého využití diklofenak často zanechává residua v životním prostředí. Byla studována například jeho toxicita pro půdní bezobratlé (závěr: diklofenak vykazuje toxicitu pro půdní organismy a dá se předpokládat jeho toxicita i pro organismy vodní) nebo jeho příjem a metabolismus určitými druhy rostlin [48],[49].

Chemickou strukturu diklofenaku a jeho název podle IUPAC uvádí Obrázek 5.



2-[(2,6-dichlorofenyl)amino]fenyloctová kyselina

Obr. 5 Chemický vzorec diklofenaku a jeho název podle IUPAC.

### 3.3 Karbamazepin (CBZ)

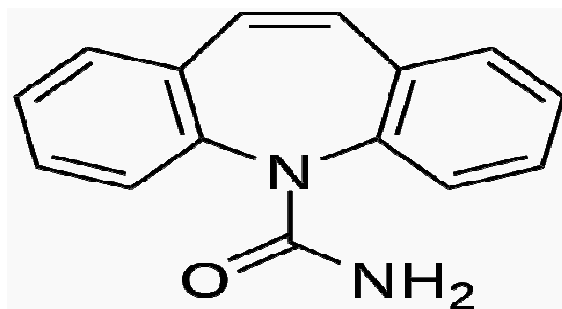
Toto léčivo, objevené v roce 1953 švýcarským chemikem Walterem Schindlerem, je v prodeji od roku 1962 [50]. Je využíván u parciálních epileptických záchvatů a některých záchvatů tonicko-klonických [51]. Relativně dobře, byť pomalu, je absorbován orální cestou, s biologickým poločasem kolem 30 hodin při jednorázovém podání. Tato hodnota je však proměnlivá, neboť karbamazepin patří mezi silné induktory jaterních enzymů, díky čemuž se tento poločas může v některých případech opakovaného podávání zkrátit až na 15 hodin [52]. Stejně tak je třeba pečlivě zvážit současné užívání s jinými léčivy, neboť aktivace CYP450 může vést ke zrychlené clearance a snížení plazmatické koncentrace některých léčiv pod terapeutickou hladinu.

Mezi další nežádoucí účinky patří například ataxie, poruchy vidění či zvýšená únava, u pacientů trpících více druhy záchvatů pak může jeho podávání vést k vyvolání těchto záchvatů [53].

Mechanismus účinku spočívá ve stabilizaci sodíkových iontových kanálů v jejich neaktivním stavu, čímž je do disociace léčiva excitabilita těchto kanálů snížena. Karbamazepin je také agonistou receptorů GABA [54]. Některé vědecké práce poukazují na jeho schopnost vyvolávat uvolňování serotoninu či inhibovat jeho zpětný záchyt [55].

Z hlediska farmaceutického znečištění životního prostředí je karbamazepin velmi významný, jedná se o jednu z nejčastěji detekovaných látek a je používán jako marker civilizačního znečištění [56]. Jeho přítomnost v životním prostředí mimo jiné výrazně ovlivňuje populace bezobratlých živočichů, a to jak cestou přímou (vystavení účinkům karbamazepinu), tak cestou nepřímou (změna složení vodních ekosystémů s dopadem na vztahy v potravním řetězci) [57].

Chemickou strukturu karbamazepinu a jeho název podle IUPAC uvádí Obrázek 6.



5H-dibenzo[b,f]azepine-5-carboxamid

Obr. 6 Chemický vzorec karbamazepinu a jeho název podle IUPAC.

### 3.4 Fytoremediace

Fytoremediace je souhrnné označení procesů využívajících rostlinné organismy k „ozdravení“, remediaci určité části životního prostředí, obvykle povrchové či podzemní vody, vodního díla, půdy nebo sedimentů. Rozsah kontaminantů, které lze těmito procesy z prostředí eliminovat, je značně široký, od iontů těžkých kovů přes radioaktivní izotopy až po nejrůznější organické látky včetně pesticidů a léčiv [58]. Oproti jiným, značně invazivním technikám odstraňování kontaminované půdy či vody, jsou tyto metody v zásadě velmi šetrné, a splňují i velmi kritickou podmínku dnešní doby: jsou poměrně finančně nenákladné [59]. Některé studie dokonce poukazují na možnost „těžby“ speciálních kovů za použití rostlin namísto těžební techniky („fytomining“), či využití dekontaminačních rostlin k výrobě biopaliv [60].

Mezi nevýhody fytoremediačních technik patří jejich omezený dosah – čištění je omezeno pouze na tu část prostředí, kam dosáhnou kořeny dané rostliny. Omezení vyplývá také z biologické dostupnosti odstraňovaných látek, která do značné míry závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí, jež mohou být navíc – například v případě půdy – značně nehomogenní. Některé kontaminanty mohou být pro rostliny natolik toxické, že je fytoremediace kvůli úhynům rostlin či inhibici klíčení semen z principu nemožná [61]. Použití fytoremediačních technik může paradoxně životnímu prostředí také uškodit – například přeměnou některých látek na aktivnější a/nebo toxičtější metabolity či zvýšením biologické dostupnosti látek z hlediska potravního řetězce (například požerem spadných listů a jiných částí rostlin) [62]. U některých rostlin je nevýhodou také velmi dlouhá doba kultivace.

Z hlediska metodiky lze fytoimediační postupy rozdělit do čtyř základních kategorií. První kategorií je fytoextrakce, tedy příjem určitého kontaminantu kořeny rostliny a jeho transport do jiných rostlinných částí. Podskupinou této techniky je pak fytoakumulace, kdy určitá část rostliny obsahuje výrazně vyšší koncentraci dané látky než část zbývající [63].

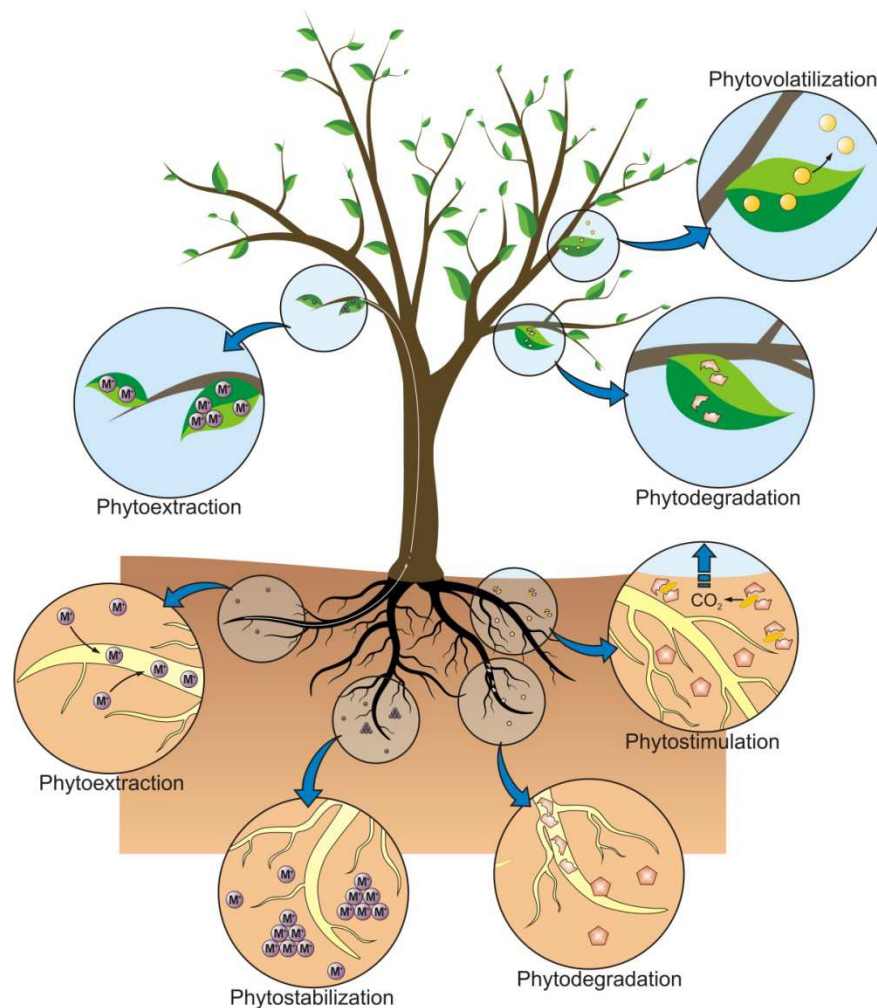
Druhou kategorií je fytovolatilizace, při níž dochází nikoli k eliminaci, nýbrž k transpiraci a uvolnění kontaminantu průduchy do ovzduší. Tato metoda byla studována především u zatížení půd rtuť a selenem, nicméně vzhledem k toxicitě uvolňovaných těkavých sloučenin je praktické využití této techniky spíše sporné [64].

Fytodegradace, coby třetí kategorie, využívá rostlinných metabolických procesů k přeměně původního kontaminantu buď na látky bez environmentálního rizika, nebo alespoň na látky méně toxické. Je využívána především u látek organických, neboť ionty kovů, radioaktivní izotopy a částečně také anorganické látky enzymaticky přeměnitelné nejsou. Pro tuto schopnost se někdy používá označení „zelená játra“ [65]

Fytostabilizace je čtvrtou kategorií fytoimediačních technik. Spočívá ve stabilizaci kontaminantů v rhizosféře, čímž je snížena jejich rozpustnost v půdní vodě a tím i možnost penetrace prostředí. Na rozdíl od ostatních technik tedy nedochází k příjmu xenobiotika do rostlinného organismu, ale o snížení biologické dostupnosti kontaminantu, obvykle působením rostlinných proteinů [66].

Grafický přehled fytoimediačních technik přináší Obrázek 7.

Tato diplomová práce zkoumá využití rostlin kukuřice seté z hlediska tří fytoimediačních technik, fytoextrakce, fytoodegradace a rhizofiltrace. Léčiva studovaná v rámci této diplomové práce již byla pro účely fytoimediačních experimentů použita, ovšem na jiných rostlinných druzích. Autoři studií využívali ředkvičky (*Raphanus sativus*) v případě ibuprofenu, rajčata (*Lycopersicon esculentum*) v případě naproxenu a květáku (*Brassica oleracea*) v případě karbamazepinu [67].



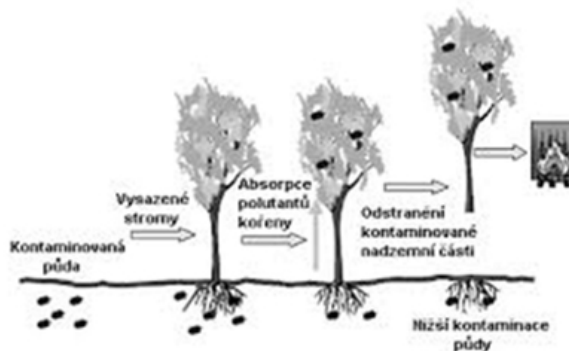
Obr. 7 Přehled fytořediačních technik [68].

### 3.4.1 Fytoextrakce

Tato fytořediační technika se používá pro polutanty nacházející se ve vodném prostředí nebo v nízkých koncentracích v půdě. V ideálním případě je výsledkem fytoextračního procesu co nejnižší koncentrace polutantu v prostředí ovlivněném rostlinou a co nejvyšší obsah polutantu v těle rostliny. Následným sklizením rostliny a jejím kompostováním, případně spálením je tak kontaminant z prostředí odstraněn.

Fytoextrační metody jsou popsány pro mnoho těžkých kovů a radioaktivních izotopů [69]. U organických látek je třeba brát v potaz možnost metabolizace polutantu na toxičtější produkty, na stranu druhou spálením fytoextrační rostliny při dostatečné teplotě je organický kontaminant obvykle zcela eliminován, což u řady anorganických

látek nelze docílit tak snadno. Schématické znázornění principu fytoextrakce představuje Obrázek 8.



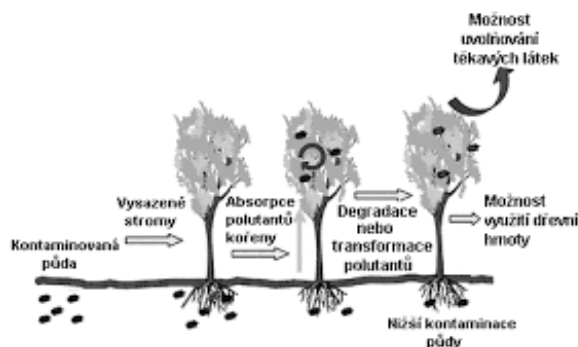
Obr. 8 Schématické znázornění fytoextrakce [70].

Pro fytoextrakci je výhodné využívat takové rostliny, které jsou jednak odolné vůči toxickému působení polutantu, jednak jsou schopny kumulovat co největší množství tohoto polutantu. Takové rostliny se označují jako hyperakumulátory [71].

Fytoextrakci lze podle provedení dělit na dva typy. Prvním typem je přirozená hyperakumulace, při které rostliny přijímají xenobiotika ze životního prostředí bez vnějších asistenčních zásahů. Naopak v případě asistované či indukované hyperakumulace je do prostředí přidáváno kondicionační činidlo, obsahující většinou určitý chelátor, která extrakci napomáhá [72]. Tato diplomová práce se zabývá prvním typem fytoextrakčních technik.

### 3.4.2 Fytodegradace

Fytodegradace je proces, při kterém je z prostředí zachycené xenobiotikum transformováno rostlinnými enzymy na látky méně toxické. Pokud je toxicita metabolitů naopak vyšší, označuje se takový postup jako fytoaktivace. Schématické znázornění fytodegradčního procesu a případného dalšího osudu transformovaných látek uvádí Obrázek 9.



Obr. 9 Schématické znázornění fytodegradace [70].

Rostlinné transformační procesy jsou obdobné biotransformačním procesům živočichů a mohou mít rozkladný charakter (štěpící enzymy), nebo charakter transformační, který je velice podobný biotransformačním drahám u živočichů. V první fázi je nejprve zvyšována polarita xenobiotika zaváděním polárních skupin díky rostlinným enzymům jako jsou peroxidasy, fenoloxidasy, esterasy a nitroreduktasy. Ve fázi druhé je pak polarita výsledné sloučeniny ještě zvýšena konjugací s rostlinnými biomolekulami jako například s glukózou či aminokyselinami. Z experimentů vyplývá, že fytodegradaci je možné využít u určitých organických pesticidů, PAH, PCB a mírně hydrofobních organických látek či alifatických uhlovodíků s krátkým řetězcem [73].

### 3.4.3 Rhizofiltrace

Rhizofiltrace je technika využívající absorpce a adsorpce polutantů kořenovým systémem použité rostliny. Na rozdíl od fytoextrakčních metod je tedy cílovou částí rostlin kořenový systém. Tato metoda je používána především k čištění vody, ať už ve formě čištění vody či výluhů zajištěných v jiné lokaci a přivedené k příslušným rostlinám, nebo ve formě výstavby umělých mokřad či kořenových čistíren [74].

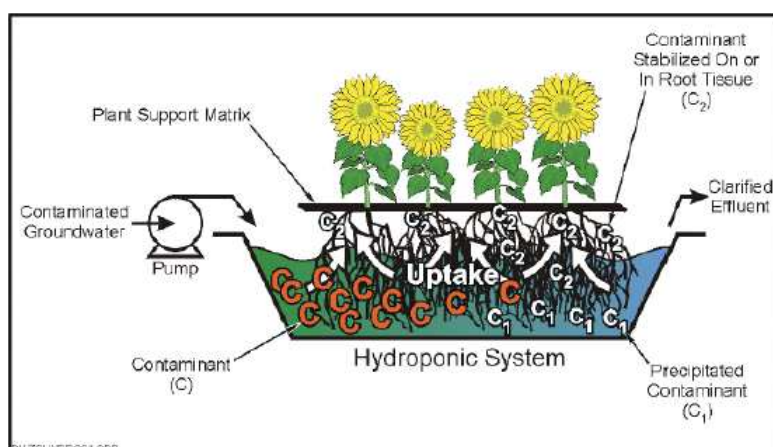
Ideálními rostlinami pro rhizofiltraci jsou takové, které disponují rozsáhlým kořenovým systémem, jsou odolné vůči působení cílových xenobiotik a mají vysokou adsorpční nebo absorpční schopnost v oblasti kořenů. S úspěchem jsou využívány hydroponicky pěstované suchozemské rostliny (například slunečnice, *Helianthus annuus*), které jsou nejprve pěstovány ve sklenicích s malou koncentrací cílového



polutantů a následně přesazovány do kontaminovaného vodního systému [75].

Rhizofiltrací jsou velmi účinné při odstraňování kovů jako Cd, Cr, Cu, Ni, Pb a Zn, zvláště účinný je tento proces u rostlin pěstovaných na provzdušňované vodě. Tímto procesem je také možné odstranit znečištění vodních toků a ploch radioaktivními nuklidy [76].

Princip rhizofiltracího procesu shrnuje Obrázek 10.



Obr. 10 Schéma rhizofiltracího procesu [77].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie a přístroje

Pro realizaci práce byla použita semena kukuřice seté (*Zea mays*), konkrétně hybridu s označením DKC4014 (dodavatel Monstanto ČR s.r.o.).

#### 4.1.1 Analýza vzorků kultivačního média

**Přehled použitých chemikálií:** Použité chemikálie a jejich výrobci/dodavatelé jsou uvedeni v Tabulce 1.

Tab. 1 Seznam použitých chemikálií.

Chemikálie	Čistota	Dodavatel
ibuprofen	98%	Zentiva
diklofenak	98%	Zentiva
naproxen	98%	Sigma-Aldrich
karbamazepin	98%	Zentiva
dichlormethan	p.a.	Lachner
DMSO	99%	Merck
ethanol	p.a.	Lachner
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	85%	Sigma-Aldrich
methanol	HPLC gradient grade	Fisher Chemical

Dále byl použit komerční produkt SAVO Original (Biochemie s.r.o., Bohumín) zakoupený v obchodním řetězci. Voda na přípravu médií a komponent mobilní fáze byla připravena na přístroji WATEK ROI (reversní osmóza, iontoměnič, uhlíkový filtr).

Mobilní fáze pro HPLC analýzu byla připravena z methanolu, destilované vody a kyseliny trihydrogenfosforečné v následujícím poměru:

CH<sub>3</sub>OH / H<sub>2</sub>O, 76/24 (v/v) + 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

**Přístroje:** Použitá elektronická zařízení a způsob jejich využití uvádí Tabulka 2.

Tab. 2 Seznam elektronických zařízení a jejich využití.

<b>Název a typ přístroje</b>	<b>Použití</b>
tlakový hrnec Morphy Richards Rapid Cook	sterilizace nástrojů a médií
laminární box Labox FBB 120	sterilní sadba rostlin a odběry vzorků
kahan Fuego PRO WLD-TEC	tepelná sterilizace nástrojů a povrchů
analytické váhy Adam AFA – 180LC	navážka léčiv pro zásobní roztoky
předvážky Adam AQT – 600	vážení rostlin před zamražením po ukončení kultivace
mrazicí box Liebherr	uchování vzorků při teplotě -22° C
lednice Liebherr	uchování vzorků při teplotě 3° C
ultrazvuková lázeň Fisherbrand® 15050	ultrasonikace mobilní fáze a homogenizovaných vzorků rostlin
centrifuga Labnet Spectrafuge 16M	centrifugace odebraných vzorků před analýzou
UV detektor Shimadzu SPD – M20A	UV detekce při HPLC analýze
komunikační modul Shimadzu CBM – 20A	komunikační modul HPLC sestavy
vysokotlaké čerpadlo Incos LCP 5020	čerpadlo HPLC sestavy
autosampler Incos LCS 5040	dávkování vzorků na kolonu

Pro HPLC analýzu všech vzorků byla použita kolona Eclipse XDB – C18 (Agilent) o rozměrech 4,6 x 250 mm a velikostí částic 5 µm. Před vlastní kolonu byla zařazena ještě předkolona Watrex C18. Objem vzorků dávkovaných na kolonu autosamplerem činil 20 µl.

Detekce všech čtyř látek byla prováděna při vlnové délce vhodných absorpčních maxim (230 nm IBU, 271 nm NPX, 271 nm DCF, 285 nm CBZ).

Sběr dat a jejich vyhodnocování byl prováděn počítačovým programem Clarity DataApex.

Kromě zmíněných přístrojů a zařízení bylo použito běžné laboratorní nádobí.

#### **4.1.2 Analýza extrahovatelných reziduí**

Pro kvantitativní stanovení analytů metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s detekcí diodovým polem a fluorescenční detekcí (HPLC-DAD/FLD) byl použit kapalinový chromatografický systém HPLC HP 1050 s DAD a FLD detektory (oba Agilent 1260). Podmínky analýzy byly následující: analytická kolona Zorbax Eclipse Plus C18, 3,5  $\mu\text{m}$  (4,6 x 150 mm), mobilní fáze: acetonitril (ACN)/0,1% kyselina octová, objem nástřiku 20  $\mu\text{L}$ , detekce-UV 197 nm, detekce FLD  $\lambda_{\text{emit}}$  224 nm/ $\lambda_{\text{excit}}$  320 nm.

Použité chemikálie kyselina octová (MERCK) byly čistoty p.a., organická rozpouštědla methanol a acetonitril (oba J.T.Baker) kvality pro GC gradient. Roztoky ibuprofenu v metanolu byly připraveny z analytického standardu dodaného firmou Zentiva. K přípravě vodné složky mobilní fáze byla použita ultračistá voda (UHQ) připravovaná pomocí přístroje IWA 20ria (Watek s.r.o).

#### **4.2 Kultivace pokusných rostlin a odběr vzorků pro analýzu**

Všechna použitá semena byla nejprve podrobena sterilizačnímu procesu. Tento proces sestával z působení 70% ethanolu po dobu jedné minuty, následně působení 20% roztoku Sava s přídavkem smáčedla po dobu 10 minut a posléze 10% Sava bez přídavku smáčedla po dobu 20 minut. Takto ošetřená semena byla několikrát promyta sterilní destilovanou vodou a za sterilních podmínek přenesena do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml, jež obsahovaly sterilní kultivační medium podle Murashiga a Skooga bez cukru, jehož složení je uvedeno v Tabulce 3. Do každé baňky byla vložena 4 semena kukuřice. Celý postup byl realizován v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Tab. 3 Složení media podle Murashiga a Skooga bez cukru [78].

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

Kultivace probíhala při teplotě 26°C. Osvětlení bylo realizováno zářivkami Cool White 36 W/m<sup>2</sup> ve vzdálenosti 20 cm od kultivačních baněk. Světelný režim fungoval v nastavení 16 hodin světlo / 8 hodin tma. Průběh kultivace byl průběžně vizuálně kontrolován a při zjištění kontaminace nebo úhynu rostlin byly příslušné baňky z pokusu vyřazeny. Obrázek 11 představuje fotografii uspořádání kultivačního prostředí.



Obr. 11 Fotografie uspořádání kultivačního prostředí.

Po dosažení optimálního vzrůstu (10 dnů) bylo k rostlinám přidáno čerstvé sterilní medium o objemu 100 ml s přídavkem jednotlivých studovaných látek nebo jejich kombinací. Přídavek byl realizován smícháním sterilního média s odpovídajícím objemem zásobního roztoku farmaka v DMSO o koncentraci 5 mg/ml. Výsledné koncentrace látek v médiu a jejich kombinace jsou uvedeny v Tabulce 4. Po přidání média k rostlině byl ihned odebrán kontrolní vzorek (0,3 ml) pro stanovení skutečné výchozí koncentrace.

Tab. 4 Výsledné koncentrace látek v médiu v jednotlivých sériích experimentů.

Série	IBU	NPX	DCF	CBZ
	c [μg/L]	c [μg/L]	c [μg/L]	c [μg/L]
1	0	-	-	-
2	5	-	-	-
3	10	-	-	-
4	-	5	-	-

5	-	-	5	-
6	-	-	-	5
7	10	5	-	-
8	10	-	5	-
9	10	-	-	5
10	5	5	5	-

Následné odběry vzorků (0,3 ml) pro HPLC analýzu byly odebírány po dobu tří až pěti dnů v intervalu 24 h za sterilních podmínek. V případě bakteriální kontaminace nebo úhynu rostlin již vzorky z příslušných baněk nadále odebírány nebyly.

Po provedení posledního odběru byly rostliny vyňaty z baněk, omyty destilovanou vodou, osušeny, rozděleny na kořenovou část a listovou část se stonkem, zváženy a zamraženy při -22° C pro další zpracování a analýzu.

Před provedením HPLC analýzy byly rozmražené vzorky média centrifugovány po dobu 5 minut a následně vloženy do autosampleru pro dávkování na kolonu.

Koncentrace léčiv v kultivačním médiu byla stanovována automaticky programem Clarity na základě naměřené kalibrační závislosti s použitím koncentrací 1; 2,5; 5; 10 a 15 mg/L daného léčiva při vlnové délce absorpčního maxima.

Tabulka 5 uvádí vypočtené meze detekce (Limit of Detection – LOD) a meze stanovitelnosti (Limit of Quantification – LOQ) pro příslušná léčiva. Meze detekce byla vypočtena jako trojnásobek šumu základní linie, mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie.

Tab. 5 Mez detekce a mez stanovitelnosti stanovovaných látek.

Stanovovaná látka	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
karbamazepin	0,05	0,16
diklofenak	0,04	0,13
ibuprofen	0,07	0,23
naproxen	0,08	0,25

### 4.3 Izolace extrahovatelných reziduí a jejich analýza

Zmražené rostliny a kořeny z fytoextračních experimentů byly rozmrazeny ponecháním při laboratorní teplotě. Následně byly rostliny a kořeny zvlášť zhomogenizovány ve třecí misce s přidavkem půl lžičky praného mořského písku. Vzniklá suspenze byla přenesena do Erlenmeyerovy baňky s přidavkem 80 ml destilovaného dichlormethanu. Výsledná směs byla vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně a následně zfiltrována, aby došlo odstranění rostlinných částí. Do vzniklého roztoku byl přidán bezvodý síran sodný jako sušidlo a roztok byl ponechán při laboratorní teplotě přes noc. Následně byl roztok opět zfiltrován kvůli odstranění sušidla a na vakuové odparce odpařen do sucha. K vysušenému extraktu bylo přidáno 0,5 ml methanolu a vzorek byl ponechán přes noc v lednici.

Měření extrahovatelných reziduí bylo provedeno v Laboratoři analytiky vody Ústavu technologie vody a prostředí VŠCHT v Praze.

Meze detekce a meze stanovení pro příslušné detektory uvádí Tabulka 6.

Tab. 6 Meze detekce a meze stanovení detektorů použitých při analýze.

Detektor	LOD [mg/L]	LOQ[mg/L]
DAD	0,062	0,21
FLD	0,00376	0,012



## 5 Výsledky a diskuze

Úvodem této části je nejprve třeba poznamenat, že při práci s biologickým materiálem a tedy i rostlinami je nutné brát v potaz určité skutečnosti, které tento materiál odlišují od materiálu neživého.

Zaprvé, rostliny projevují velmi silné individuální rozdíly v rychlosti růstu, rozsahu kořenového systému, míře příjmu živin a zkoumaných látek. Výsledky této práce jsou proto nevyhnutelně projevem jakéhosi „průměrného výkonu“ pokusných rostlin při dekontaminaci kultivačního média, a je třeba si uvědomovat, že výkony individuální se mohou kvantitativně i kvalitativně velice lišit.

Za druhé, mnoho dějů uplatňujících se při fytořemediaci není nebo nemusí být detailně popsáno, a proto nám údaje získané v této práci poskytují zatím spíše orientační náhled na průběh dekontaminačních procesů. Změny koncentrací léčiva v médiu bezprostředně po jeho přidání a první den průběhu pokusu se ve většině případů značně lišily od dalšího průběhu experimentu, což může být způsobeno několika faktory, které se práce pokouší popsat, bez dalšího zkoumání zúčastněných procesů (například metodou radioaktivního značení) se však jedná pouze o kvalifikovaný odhad.

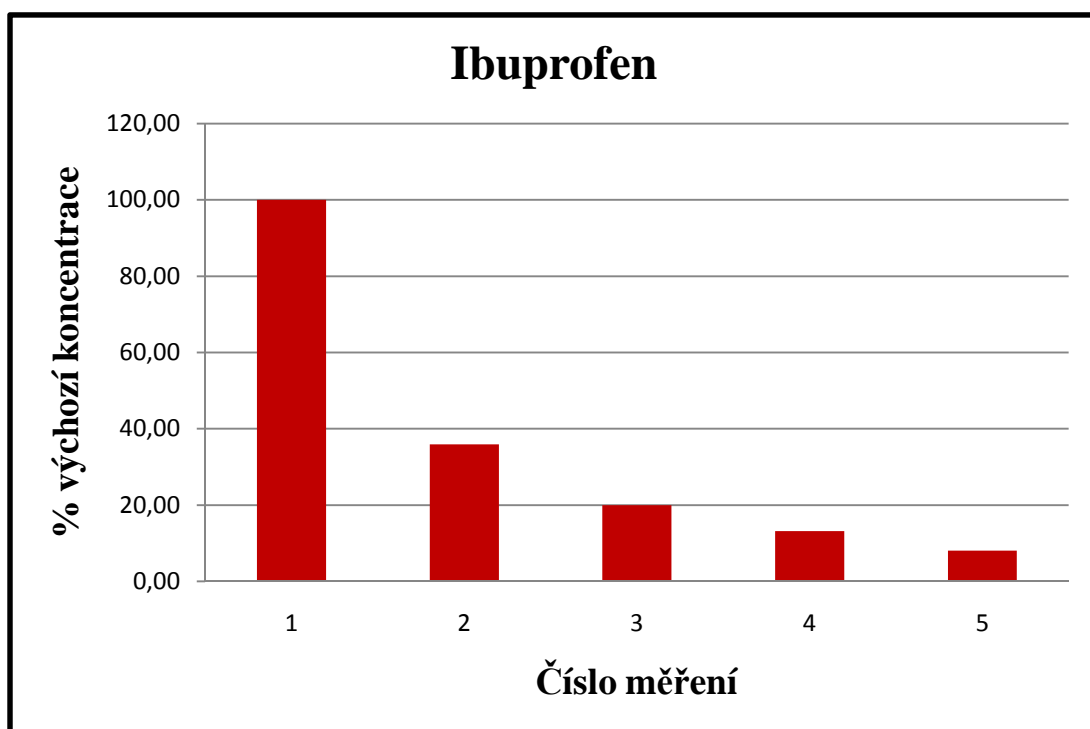
Za třetí, u rostlin je, na rozdíl od živočichů, mnohem obtížnější určit některé zlomové okamžiky pokusu, jako například úhyn rostliny, neboť tato skutečnost se může viditelně projevit až se značným zpožděním. Jelikož úhyn organismu logicky eliminuje dekontaminační schopnost rostliny a může navíc teoreticky způsobit i nárůst koncentrace léčiva v médiu jeho zpětným vyloučením z rozkládající se rostlinné tkáně, je třeba při vyhodnocování výsledků extrakčních experimentů brát zřetel i na tuto možnost.

Cílem práce a zpracování jejích výsledků bylo co možná nejvíce eliminovat tyto faktory, nicméně jejich úplné vyloučení je z principu téměř nemožné.

## 5.1 Monokomponentní uspořádání

### 5.1.1 Ibuprofen

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace ibuprofenu v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 12.



Obr. 12. Průměrný úbytek výchozí koncentrace ibuprofenu v kultivačním médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

Počáteční koncentrace ibuprofenu v kultivačním médiu byla stanovena na základě odběru provedeného ihned poté, co bylo do baňky s pokusnými rostlinami přidáno médium se studovanou látkou. Tato reálná koncentrace se lišila od teoretické koncentrace získané výpočtem, a to v obou směrech. Zvýšenou koncentraci oproti teoretické lze vysvětlit tak, že při sterilizaci média došlo k jeho částečnému úbytku, neboť baňky byly při sterilizaci v tlakovém hrnci uzavřeny pouze hliníkovou fólií, a mohlo tak dojít ke ztrátám. Naopak koncentraci sníženou oproti teoretické je možno

vysvětlit naředěním pozůstatkem původním médiem, které nelze při zachování sterility a vitality rostlin zcela odstranit, případně adsorpcí léčiva na kořenový systém rostliny a do jisté míry také započatým fytoimediačním procesem. Tyto odchylky reálné počáteční koncentrace od teoretické získané výpočtem bylo možné pozorovat u všech léčiv a všech pokusných uspořádání.

Průměr reálných zjištěných koncentrací byl stanoven jako počáteční koncentrace ibuprofenu v médiu, a následně byl sledován úbytek této koncentrace.

Po prvních 24 hodinách byl zaznamenán největší úbytek koncentrace, kdy tato poklesla na 35,9% koncentrace původní. Po dalších 24 hodinách koncentrace poklesla na 20% hodnoty z počátku experimentu, což představuje pokles 55,9% oproti koncentraci naměřené po 24 hodinách. Čtvrté stanovení koncentrace po 72 hodinách od počátku experimentu zaznamenalo 13,2% původní koncentrace ibuprofenu, tedy pokles jen o 34,4% koncentrace předchozího dne. Poslední měření, po 92 hodinách od počátku experimentu, vykazovalo 8% původní koncentrace, tedy 38,8% koncentrace zjištěné při čtvrtém měření.

Nedošlo tedy k úplné eliminaci léčiva z kultivačního média, přestože časový průběh fytoextrakce naznačuje, že při delším časovém úseku by k této eliminaci dojít mohlo.

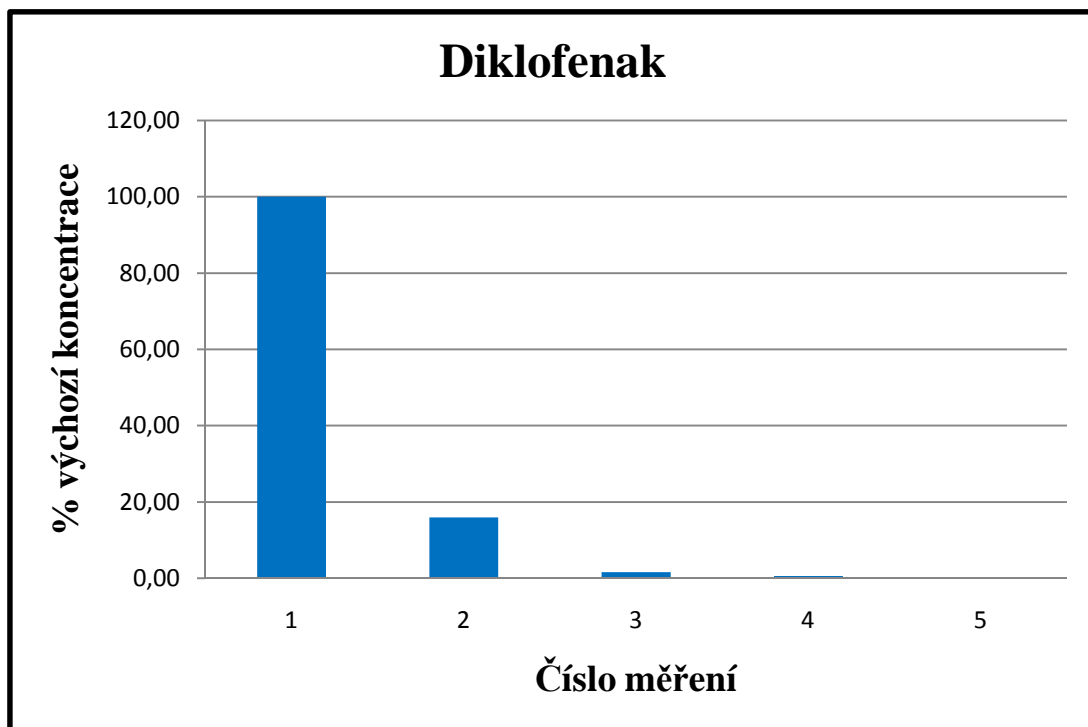
Z těchto výsledků lze vyzorovat dva důležité faktory.

Zprvu, největší úbytek koncentrace léčiva nastává v prvních 24 hodinách od zahájení experimentu. Tento jev lze vysvětlit třemi faktory: Další adsorpcí léčiva na kořeny rostlin, nepřítomností léčiva v rostlině na začátku experimentu (nulové nasycení), případně toxicitou léčiva pro rostlinu, která ve výsledku způsobí stres a nižší schopnost další dekontaminace média.

Druhým pozorovaným trendem je postupné snižování úbytku koncentrace z média oproti předchozímu dni (s výjimkou dne posledního, kdy byl tento úbytek procentuálně o něco větší). Tento jev lze teoreticky vysvětlit nasycením rostlinného systému léčivem a/nebo toxickým působením léčiva na fytoextrakční schopnost rostliny.

### **5.1.2 Diklofenak**

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace diklofenaku v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 13.



Obr. 13. Průměrný úbytek výchozí koncentrace diklofenaku v kultivačním médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

Po 24 hodinách od počátku experimentu poklesla koncentrace diklofenaku v kultivačním médiu na 16%. Po 48 hodinách bylo zjištěno už jen pouhých 1,6% původní koncentrace, tedy pokles 90,5% oproti koncentraci stanovené po 24 hodinách. Po 72 hodinách klesla koncentrace v průměru na 0,6% původní koncentrace diklofenaku, což představuje 50% pokles oproti třetímu měření. Při posledním měření, po 96 hodinách od počátku experimentu, již byla koncentrace ve všech pokusných médiích pod hodnotou meze stanovení.

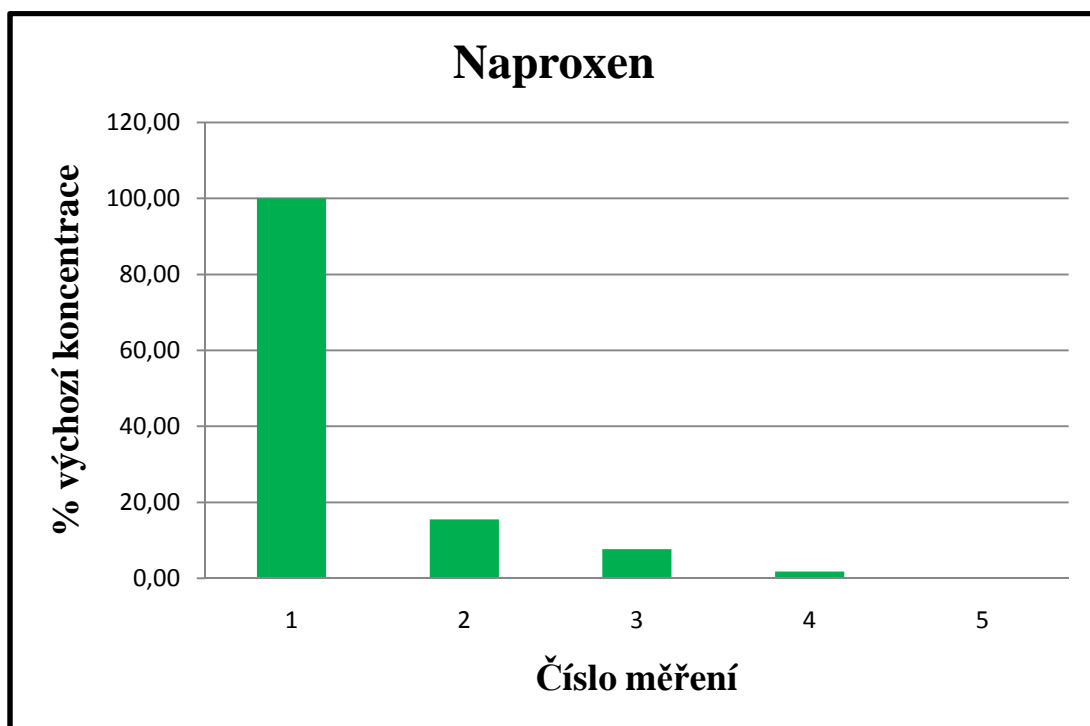
Oproti ibuprofenu zde došlo k ještě výraznějšímu poklesu koncentrace v prvních 24 hodinách od počátku experimentu (84% oproti 64,1% u ibuprofenu), nicméně je třeba vzít v potaz skutečnost, že počáteční koncentrace ibuprofenu (10 mg/L, teoretická) byla dvojnásobná oproti koncentraci diklofenaku (5 mg/L, teoretická). V přepočtu na

množství extrahované látky tedy byla účinnost větší v případě ibuprofenu než diklofenaku.

Na rozdíl od ibuprofenu zde ovšem došlo k úplné eliminaci léčiva z kultivačního média, a rovněž průměrný pokles ve vztahu k předchozím dnům byl vyšší, což poukazuje na větší přetrvávající fytoextrakční schopnosti rostliny. Tento jev lze teoreticky vysvětlit jako důsledek nižší počáteční koncentrace diklofenaku v médiu – mohlo tak dojít k menšímu nasycení rostlinného systému a také k menšímu toxickému zatížení rostliny.

### 5.1.3 Naproxen

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace naproxenu v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 14.



Obr. 14. Průměrný úbytek výchozí koncentrace naproxenu v kultivačním médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

V případě naproxenu byl po prvních 24 hodinách pokusu zaznamenán pokles výchozí koncentrace na 15,5%. Po 48 hodinách tato klesla na 7,7% koncentrace výchozí, tedy průměrný úbytek 50% oproti předchozímu měření. Ve čtvrtém měření po 72 hodinách byla koncentrace naproxenu stanovena jako 1,7% výchozí koncentrace této látky v kultivačním médiu, tedy pokles o 78% ve vztahu ke koncentraci zjištěné v měření předchozím. Po 96 hodinách od počátku experimentu, v měření číslo 5, již byla koncentrace ve všech pokusných médiích pod hladinou meze detekce.

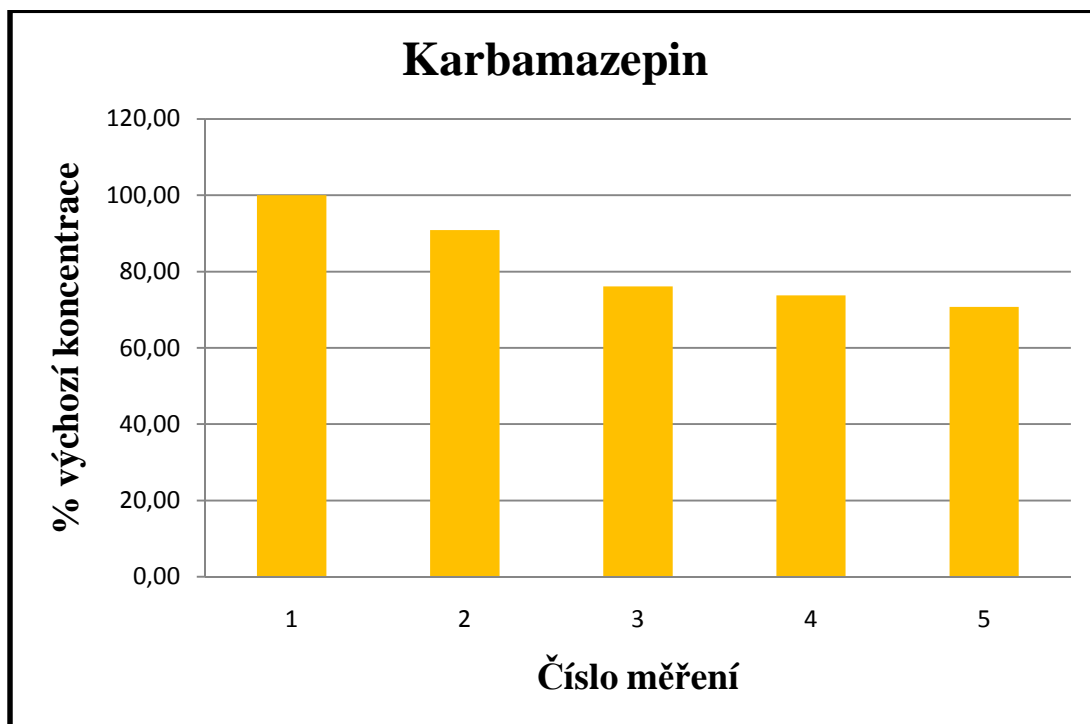
Časový průběh poklesu koncentrace naproxenu je velice podobný časovému průběhu poklesu koncentrace diklofenaku, jednak z hlediska procentuálních úbytků, jednak z hlediska úplné eliminace léčiva z kultivačního média. Z této skutečnosti lze teoreticky odvodit důležitý poznatek pro fytoextrakční účinnost.

Přestože mají obě látky odlišnou chemickou strukturu, v obou případech se jedná o slabé karboxylové kyseliny s totožnou hodnotou  $pK_a = 4,15$ . Jejich  $\log K_{ow}$  se však liší (3,18 v případě naproxenu a 4,51 v případě diklofenaku). Tato skutečnost by mohla poukazovat na fakt, že fytoextrakční schopnost rostliny je funkcí spíše  $pK_a$  než  $K_{ow}$ .

Stejně tak výsledky měření v případě naproxenu podporují teoretický závěr, že fytoextrakční schopnost je ovlivněna počáteční koncentrací sledované sloučeniny v kultivačním médiu. Jelikož reálné koncentrace léčiv zjištěné ve vodních dílech a systémech jsou výrazně řádově menší než koncentrace používané v této práci, jedná se o optimistické zjištění pro následné potenciální využití rostlin pro dekontaminaci.

#### **5.1.4 Karbamazepin**

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace karbamazepinu v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 15.



Obr. 15 Průměrný úbytek výchozí koncentrace karbamazepinu v kultivačním médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

Po prvních 24 hodinách klesla původní koncentrace karbamazepinu v kultivačním médiu na 91% této koncentrace. Třetí měření po 48 hodinách zaznamenalo průměrně 76,2% počáteční koncentrace této látky, což představuje úbytek 16,2% ve srovnání s koncentrací zjištěnou při předchozím měření. Po 72 hodinách při čtvrtém měření bylo v kultivačních médiích naměřeno průměrně 73,8 koncentrace karbamazepinu ze začátku pokusu, tedy úbytek pouhých 3,3% oproti koncentraci zaznamenané při třetím měření. Po 96 hodinách se koncentrace léčiva stále pohybovala průměrně na 70,7% výchozí koncentrace, došlo k úbytku 4% oproti koncentraci naměřené po 72 hodinách.

Ve srovnání s ostatními léčivy je na první pohled patrná výrazně nižší fytoextrakční účinnost kukuřice seté pro karbamazepin, než tomu bylo v případě NSAID léčiv. Oproti těmto látkám nejen že nedošlo k úplné eliminaci léčiva, ale ani po 96 hodinách experimentu se procento počáteční koncentrace ani zdaleka nepřiblížilo hodnotě 50%.

Oproti jiným léčivům studovaným v rámci této práce zde také chybí počáteční výrazný úbytek koncentrace charakteristický pro látky ze skupiny NSAID.

Oba tyto faktory lze teoreticky vysvětlit v souladu s dosavadními zjištěními této práce.

Karbamazepin, na rozdíl od nesteroidních analgetik, není slabou organickou kyselinou, obsahuje amidovou skupinu vázanou na heterocyklický dusík, což mu propůjčuje poměrně zásaditý charakter (pKa 13,90). V případě, že by fytoextrakční mechanismy zvýhodňovaly látky spíše kyselé povahy, byla by nízká dekontaminační schopnost ve světle této skutečnosti pochopitelná. Stejně tak lze teoreticky nízkou fytoextrakční účinnost vysvětlit mírou disociace daného léčiva. Zatímco NSAID léčiva s nízkými pKa budou při pH kultivačního média z větší části disociované v iontové podobě, karbamazepin se v něm bude vyskytovat především protonizovaný, což opět může mít výrazný vliv za předpokladu selektivních příjmových mechanismů rostliny.

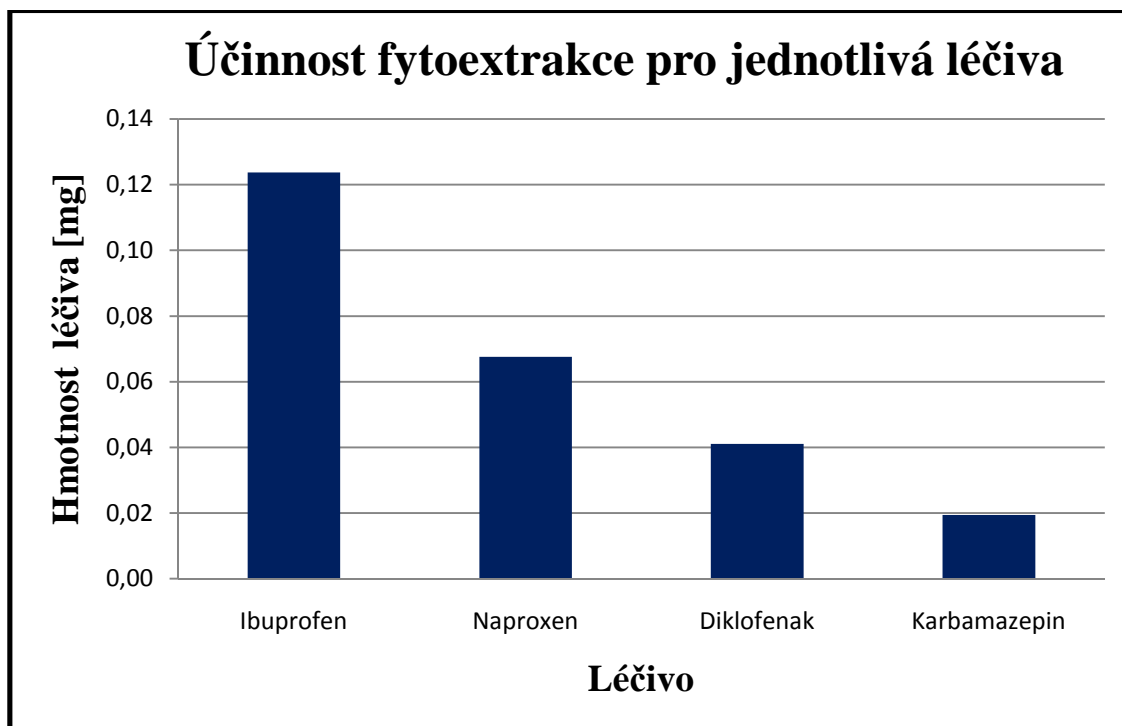
Druhou možností vysvětlení velmi nízké fytoextrakční schopnosti kukuřice seté pro karbamazepin je případné toxické působení na rostlinu. Pokud je karbamazepin pro rostlinu toxický již v nízkých koncentracích, jeho vstřebání už ve velmi nízké dávce v rámci prvních 24 hodin může způsobit dostatečné stresové zatížení na to, aby byl další příjem živin a tedy i léčiva výrazně zpomalen. Za zmínku stojí také skutečnost, že rostliny v pokusech s přítomností karbamazepinu v kultivačním médiu vykazovaly největší míru úhynu ze všech experimentálních uspořádání.

Karbamazepin je pro svou nízkou fytoextrahovatelnost poměrně známý a tato jeho vlastnost je hlavním důvodem, proč je stanovován coby marker farmaceutického zatížení vodních ekosystémů.

Na základě čtyř provedených monokomponentních experimentů lze sestavit graf účinnosti fytoextrakce pro jednotlivá léčiva přepočtené na jeden gram hmotnosti rostlinné biomasy (Obrázek 16). Stejně tak je možné vytvořit tabulku pořadí účinnosti fytoextrakce přepočtené na gram hmotnosti rostlinné biomasy a teoreticky souvisejících fyzikálně-chemických vlastností použitých léčiv (Tabulka 7).

Největší fytoextrakční účinnost kukuřice seté v monokomponentním uspořádání byla pozorována pro ibuprofen, dosahovala 0,12 mg léčiva na 1 gram biomasy. Druhou příčku obsadil naproxen s 0,07 mg léčiva na 1 gram biomasy, následován diklofenakem s 0,04 mg léčiva na 1 gram biomasy. Nejmenší fytoextrakční účinnost vykázal karbamazepin s 0,02 mg léčiva na 1 gram biomasy.





Obr. 16 Účinnost fytoextrakce pro jednotlivá léčiva v monokomponentním uspořádání vyjádřená jako úbytek hmotnosti léčiva z média vztažený na 1 g biomasy.

Tab. 7 Přehled účinnosti fytoextrakce a fyzikálně-chemických vlastností léčiv.

Léčivo	Pořadí účinnosti fytoextrakce	log $K_{ow}$	pKa
ibuprofen	1.	3,59	4,91
naproxen	2.	3,18	4,15
diklofenak	3.	4,51	4,15
karbamazepin	4.	2,45	13,90

Z Tabulky 7 nelze jednoznačně vypořádat pokles účinnosti fytoextrakce v odpovídajícím trendu se změnou log  $K_{ow}$  nebo pKa. Je patrné, že karbamazepin, coby léčivo s nejnižší pozorovatelnou extrahovatelností, se odlišuje od NSAID léčiv v obou hodnotách, a lze tedy předpokládat určitý vliv těchto fyzikálně-chemických vlastností na fytoextrakční schopnost.

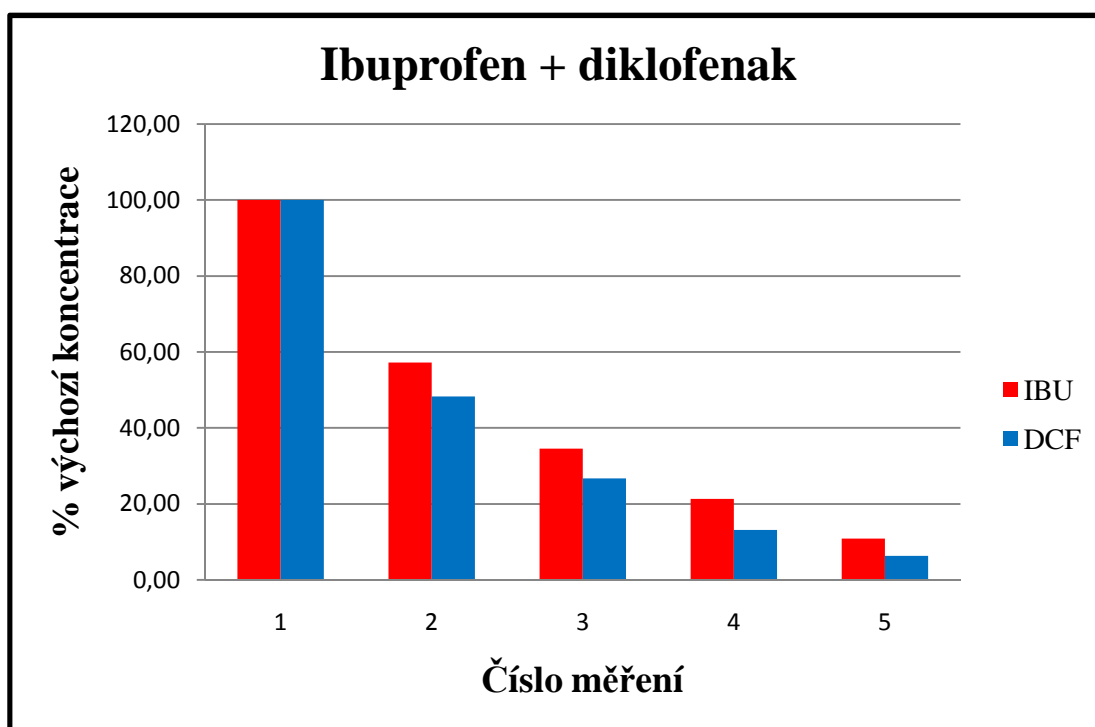
Je třeba také poukázat na skutečnost, že vyhodnocení fytoextrakční schopnosti poněkud ovlivňuje léčivo ibuprofen, které bylo oproti ostatním léčivům v dvojnásobně

vyšší koncentraci, což mohlo uměle navýšit pozorovanou účinnost fytoextrakce, neboť v případě naproxenu a diklofenaku již v závěrečné fázi experimentu rostliny neměly co extrahovat.

## 5.2 Dikomponentní uspořádání

### 5.2.1 Ibuprofen + Diklofenak

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace ibuprofenu a diklofenaku v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 17.



Obr. 17 Průměrný úbytek výchozí koncentrace ibuprofenu a diklofenaku v médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

Koncentrace ibuprofenu poklesla po prvních 24 hodinách na 57,2% původní koncentrace ze začátku experimentu. 48 hodin od zahájení experimentu činila průměrná

koncentrace 34,5% koncentrace původní, což představuje pokles o 39,8% oproti předchozí naměřené hodnotě. Po 72 hodinách v rámci čtvrtého měření bylo zjištěno 21,3% úvodní koncentrace ibuprofenu v kultivačním médiu, tedy úbytek 38,4% oproti třetímu měření. Při posledním měření, po 96 hodinách od zahájení experimentu, činila průměrná koncentrace ibuprofenu 10,8% koncentrace ze začátku experimentu, což činí 49,3% pokles vůči měření po 72 hodinách.

Z hlediska diklofenaku poklesla jeho úvodní koncentrace po 24 hodinách na hodnotu 48,3%. Po 48 hodinách tato hodnota činila 26,7%, což představuje úbytek 44,7% oproti předchozímu měření. Čtvrté měření po 72 hodinách vykazalo 13,7% úvodní koncentrace diklofenaku v kultivačním médiu, 50,8% koncentrace zjištěné při třetím měření. Poslední měření, po 96 hodinách, zaznamenalo 6,3% výchozí koncentrace diklofenaku, tedy 52% úbytek proti předposlednímu měření.

Z výsledků měření dikomponentního uspořádání vyplývá několik důsledků souběžné fytoextrakce dvou léčiv z kultivačního média.

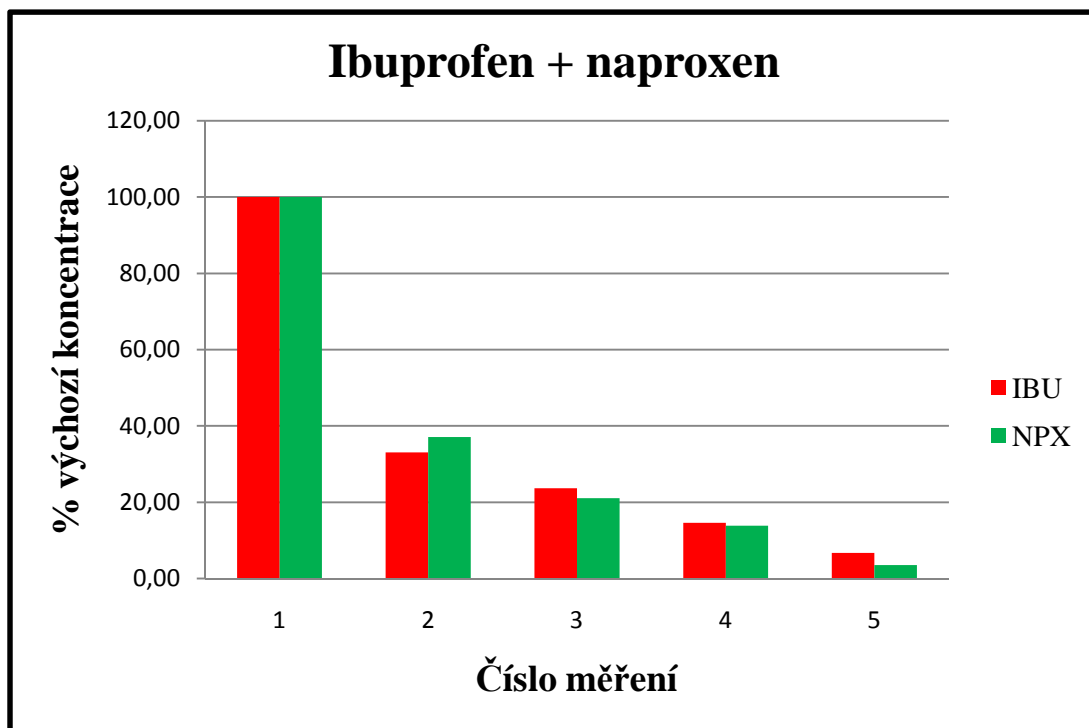
Při srovnání časového průběhu úbytku koncentrace léčiv je patrné, že v případě obou léčiv došlo ke zpomalení fytoextrakce z média oproti monokomponentnímu uspořádání. Rozdíl po prvních 24 hodinách průběhu experimentu činil více než 20% původní koncentrace ibuprofenu a více než 30% u diklofenaku. Zvláště patrný je tento jev u diklofenaku, který byl v monokomponentním uspořádání po 96 hodinách eliminován pod mez stanovitelnosti pro danou metodu, zatímco v dikomponentním uspořádání je jeho přítomnost stále měřitelná i po uplynutí této doby.

Dobře patrné je také omezení značného skokového úbytku v prvních 24 hodinách experimentu.

Tyto jevy je možné vysvětlit například soupeřením obou léčiv o dostupná místa v transportních mechanismech kořenového systému, což by odpovídalo menšímu rozdílu oproti monokomponentnímu uspořádání u ibuprofenu (jehož koncentrace byla vyšší) ve srovnání s diklofenakem. Dalším možným vysvětlením je synergické toxické působení obou léčiv, které již ve velmi rané fázi experimentu způsobí snížení fytoextrakčních schopností rostlin. Nabízí se také varianta rychlejšího nasycení rostlinného systému obecně.

## 5.2.2 Ibuprofen + Naproxen

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace ibuprofenu a naproxenu v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 18.



Obr. 18 Průměrný úbytek výchozí koncentrace ibuprofenu a naproxenu v médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3= 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

Koncentrace ibuprofenu poklesla po prvních 24 hodinách na 33% původní koncentrace ze začátku experimentu. 48 hodin od zahájení experimentu činila průměrná koncentrace 23,7% koncentrace původní, což představuje pokles o 28,5% oproti předchozí naměřené hodnotě. Po 72 hodinách v rámci čtvrtého měření bylo zjištěno 14,6% úvodní koncentrace ibuprofenu v kultivačním médiu, tedy úbytek 38,2% oproti třetímu měření. Při posledním měření, po 96 hodinách od zahájení experimentu, činila průměrná koncentrace ibuprofenu 6,7% koncentrace ze začátku experimentu, což činí 54,2% pokles vůči měření po 72 hodinách.

Z hlediska naproxenu poklesla jeho úvodní koncentrace po 24 hodinách na hodnotu

37%. Po 48 hodinách tato hodnota činila 21,1%, což představuje úbytek 43,2% oproti předchozímu měření. Čtvrté měření po 72 hodinách vykazovalo 13,9% úvodní koncentrace naproxenu v kultivačním médiu, 34,2% koncentrace zjištěné při třetím měření. Poslední měření, po 96 hodinách, zaznamenalo 3,5% výchozí koncentrace naproxenu, tedy 74,6% úbytek proti předposlednímu měření.

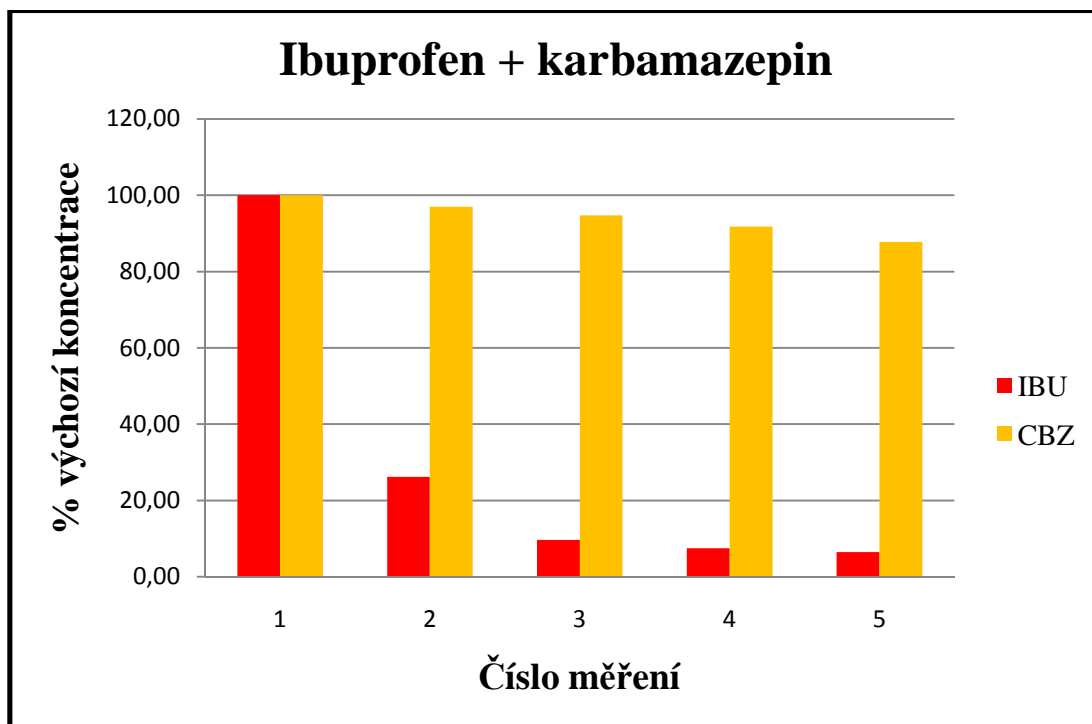
Kombinace ibuprofenu a naproxenu opět vykazuje snížení účinnosti fytoextrakce pro obě látky ve srovnání s monokomponentním uspořádáním, nicméně ve srovnání s kombinací IBU + DCF je patrné, že v tomto případě byla snížena o něco méně než u první dvojice. I zde je ovšem možné pozorovat, že naproxen není z média odstraněn pod mez stanovení, ale je i po 96 hodinách je jeho koncentrace stále měřitelná.

Jelikož soupeření o dostupné transportní systémy by mělo být velice podobné kombinaci IBU + DCF (s výjimkou malého rozdílu  $\log K_{ow}$  u diklofenaku a naproxenu), je možné tento jev teoreticky vysvětlit nižším synergickým toxickým účinkem na rostlinný systém, případně mírnou vzájemnou potenciací fytoextrakčního procesu oproti dvojici IBU + DCF.

### 5.2.3 Ibuprofen + Karbamazepin

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace ibuprofenu a karbamazepinu v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 19.

Koncentrace ibuprofenu poklesla po prvních 24 hodinách na 26,2% původní koncentrace ze začátku experimentu. 48 hodin od zahájení experimentu činila průměrná koncentrace 9,6% koncentrace původní, což představuje pokles o 73,3% oproti předchozí naměřené hodnotě. Po 72 hodinách v rámci čtvrtého měření bylo zjištěno 7,5% úvodní koncentrace ibuprofenu v kultivačním médiu, tedy úbytek 32,7% oproti třetímu měření. Při posledním měření, po 96 hodinách od zahájení experimentu, činila průměrná koncentrace ibuprofenu 6,5% koncentrace ze začátku experimentu, což činí 21,8% pokles vůči měření po 72 hodinách.



Obr. 19 Průměrný úbytek výchozí koncentrace ibuprofenu a karbamazepinu v médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

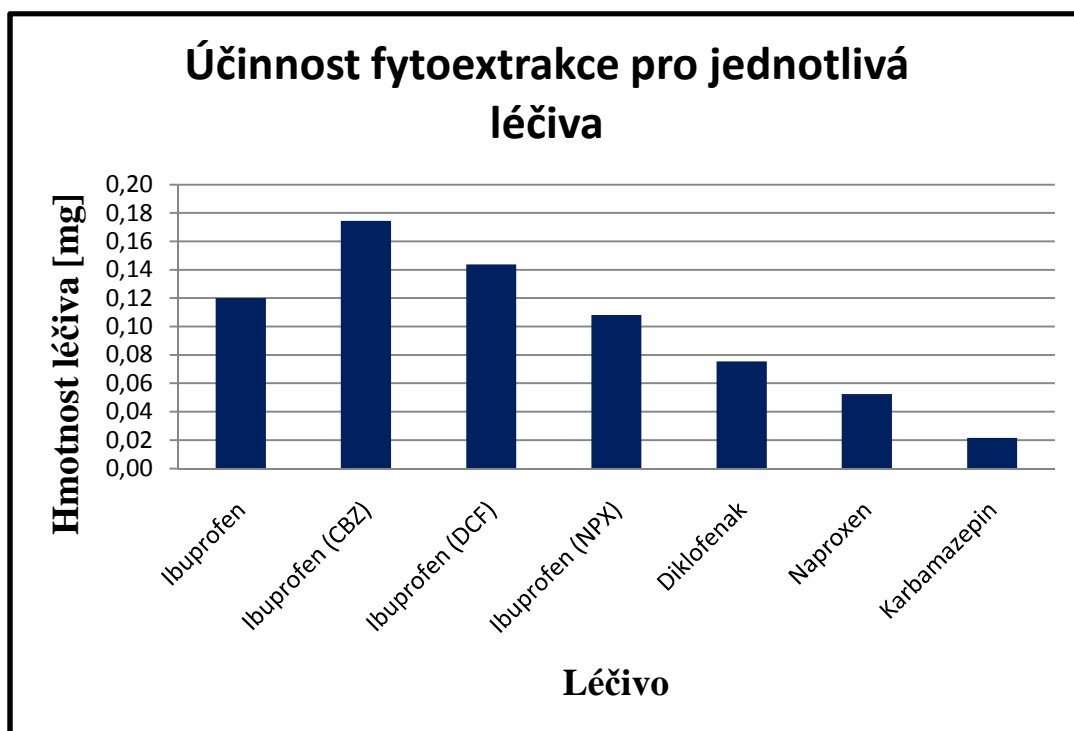
Z hlediska karbamazepinu poklesla jeho úvodní koncentrace po 24 hodinách na hodnotu 97%. Po 48 hodinách tato hodnota činila 94,8%, což představuje úbytek 2,3% oproti předchozímu měření. Čtvrté měření po 72 hodinách vykázalo 91,9% úvodní koncentrace karbamazepinu v kultivačním médiu, 3,1% koncentrace zjištěné při třetím měření. Poslední měření, po 96 hodinách, zaznamenalo 87,8% výchozí koncentrace karbamazepinu, tedy 4,4% úbytek proti předposlednímu měření.

Z výsledků měření vyplývá, že přítomnost ibuprofenu v kultivačním médiu snižuje už tak poměrně nízkou fytoextrakční účinnost rostlin pro karbamazepin. Tento jev lze teoreticky vysvětlit jednak soupeřením léčiv o transportní systém rostliny, jednak případným toxickým působením ibuprofenu na rostlinu, čímž by se teoreticky vysvětlovala snížená dekontaminace karbamazepinu.

Poněkud překvapivá je zvýšená fytoextrakční schopnost pro ibuprofen, která je vyšší jak oproti ostatním dikomponentním uspořádáním experimentu, tak oproti monokomponentnímu uspořádání pouze s obsahem ibuprofenu. Tento překvapivý

výsledek lze teoreticky vysvětlit tak, že karbamazepin svou přítomností v médiu změnil fyzikálně-chemické vlastnosti média, čímž usnadnil fytoextrakční proces ve prospěch ibuprofenu. Je také teoreticky možné, že karbamazepin ovlivňuje rostlinný transportní systém směrem k většímu příjmu ibuprofenu. Výraznější příjem ibuprofenu však bylo možno pozorovat pouze v prvních 48 hodinách od začátku experimentu, v následných měřeních se procento výchozí koncentrace ustálilo na téměř stejné hodnotě jako v případě ibuprofenu samotného. Tento jev lze opět teoreticky vysvětlit toxicitou ibuprofenu pro cílovou rostlinu.

Na základě tří provedených dikomponentních experimentů lze sestavit graf účinnosti fytoextrakce pro jednotlivá léčiva přepočtené na jeden gram hmotnosti rostlinné biomasy (Obrázek 20).



Obr. 20 Účinnost fytoextrakce pro jednotlivá léčiva v dikomponentním uspořádání a pro ibuprofen v monokomponentním uspořádání vyjádřená jako úbytek hmotnosti léčiva z média vztažený na 1 g biomasy.

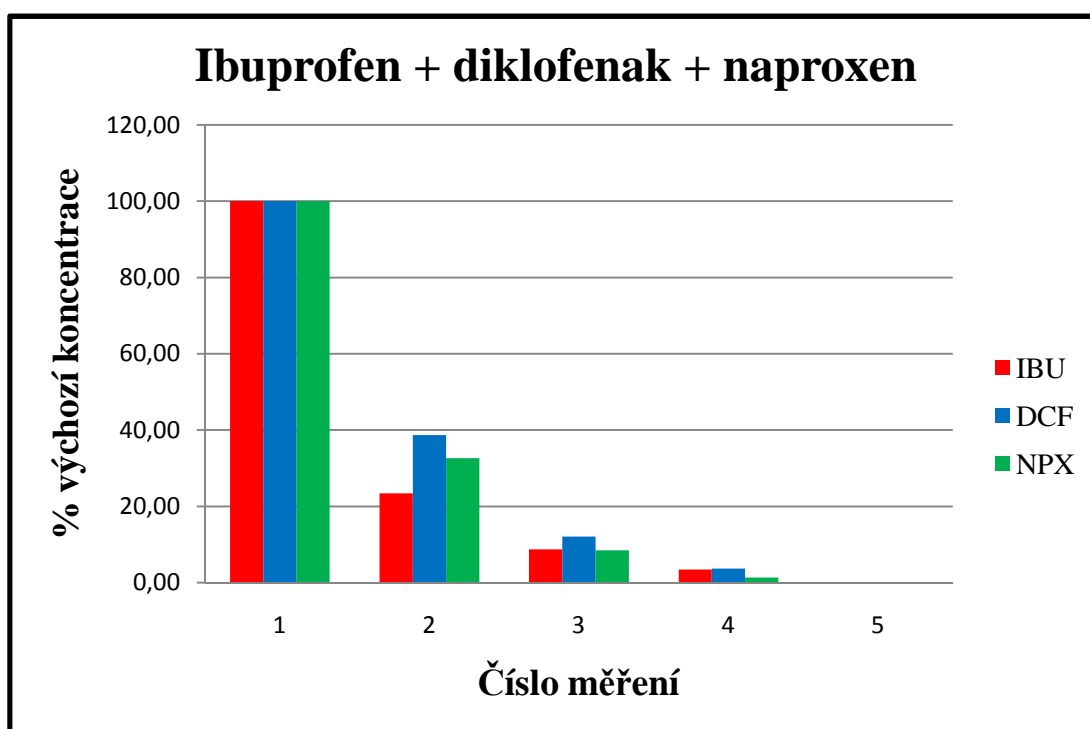
Z grafu je patrná zvýšená fytoextrakční účinnost pro ibuprofen nejen v kombinaci s karbamazepinem (0,17 mg na gram biomasy), ale také s diklofenakem (0,14 mg na

gram biomasy) – obě hodnoty dokonce převyšují účinnost pro ibuprofen v monokomponentním uspořádání. Naopak kombinace s naproxenem fytoextrakční účinnost snižuje (0,11 mg na gram biomasy). Z pohledu minoritních složek kultivačního média došlo k nominálnímu zvýšení účinnosti extrakce pro diklofenak (0,08 mg na gram biomasy), je však třeba pamatovat na skutečnost, že v tomto uspořádání, naproti uspořádání monokomponentnímu, nebylo léčivo z média zcela odstraněno. Na naproxen si oproti monokomponentnímu uspořádání pohoršil (0,05 mg na gram biomasy), účinnost pro karbamazepin zůstala nominálně stejná (0,02 mg na gram biomasy)

### 5.3 Trikomponentní uspořádání

#### 5.3.1 Ibuprofen + Diklofenak + Naproxen

Časový průběh průměrného úbytku koncentrace ibuprofenu, diklofenaku a naproxenu v kultivačním médiu zobrazuje graf na Obrázku 21.



Obr. 21 Průměrný úbytek výchozí koncentrace ibuprofenu, diklofenaku a naproxenu v médiu v závislosti na čase (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru: 1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).



Konkrétní hodnoty procent výchozí koncentrace jednotlivých léčiv v příslušných měřeních a procentuální změny oproti měření předchozímu uvádí Tabulka 8.

Tab. 8 Výsledky trikomponentního uspořádání experimentu (číslo měření odpovídá časovému úseku od přidání média s obsahem léčiva do odběru:

1 = 0 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h, 4 = 72 h, 5 = 96 h).

Číslo měření	IBU [%]	DCF [%]	NPX [%]
1	100	100	100
2	23,5	38,7	32,7
3	8,7	12,1	8,5
4	3,5	3,7	1,4
5	0	0	0

Z výsledků je patrné, že největší snížení koncentrace po prvních 24 hodinách od počátku experimentu zaznamenal ibuprofen (pokles o 76,54%). Jedná se o největší pokles koncentrace ibuprofenu ze všech uspořádání pokusů. Je třeba ovšem pamatovat na skutečnost, že v tomto uspořádání byla jeho koncentrace poloviční (5 mg/L) oproti ostatním uspořádáním. Byla tímto však prokázána poměrně vysoká fytoextrakční účinnost pro tuto látku.

Z hlediska extrakce diklofenaku a naproxenu je možné vysledovat, že účinnost je větší než v dikomponentním uspořádání s ibuprofenem v koncentraci 10 mg/L, nicméně menší než v monokomponentním uspořádání. První jev je možné teoreticky vysvětlit menším toxickým efektem ibuprofenu způsobeným jeho nižší koncentrací v kultivačním médiu. Druhý jev je možno vysvětlit soutěžením jednotlivých léčiv o transportní systémy rostlin. I přesto však došlo k úplné eliminaci všech tří léčiv z kultivačního média pod hodnotu meze stanovitelnosti.

## 5.4 Analýza extrahovatelných reziduí

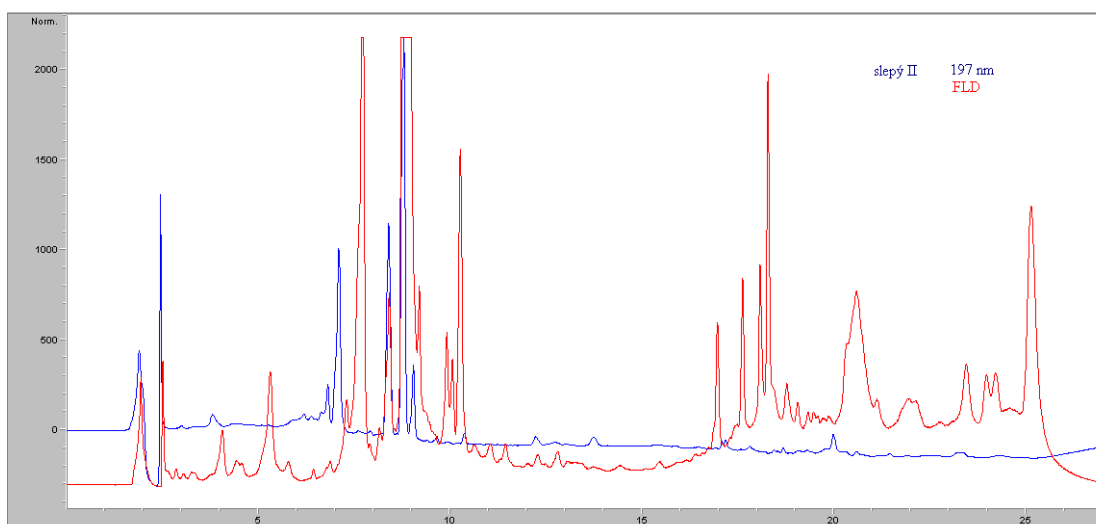
Extrahovatelná rezidua ibuprofenu byla testována z řady kultivací, kdy tyto byly provedeny s výchozí koncentrací 5 a 10 mg/L farmaka. Rezidua byla stanovována ze separátních extraktů homogenátů kořenů a rostlin, protože byl oprávněný předpoklad

vyšší koncentrace studované látky v kořenové části vlivem prosté adsorpce. Stanovení přítomnosti a koncentrace extrahovatelného ibuprofenu bylo provedeno pomocí DAD a fluorescenční detekce, kde se ukázala až překvapivá shoda získaných výsledků. Rovněž se potvrdil předpoklad výrazně vyšších koncentrací ibuprofenu z kořenových homogenátů. Vyhodnocení experimentů bylo provedeno s ohledem na slepý experiment bez přítomnosti kontaminantu. Z výsledků (Tabulka 9) je zřejmé, že ve všech extraktech bylo nalezeno určité množství studované látky, přičemž se prokázala sice malá, ale přesto existující možnost translokace kontaminantu do nadzemních částí a tedy i potenciální možnost kontaminace potravních řetězců.

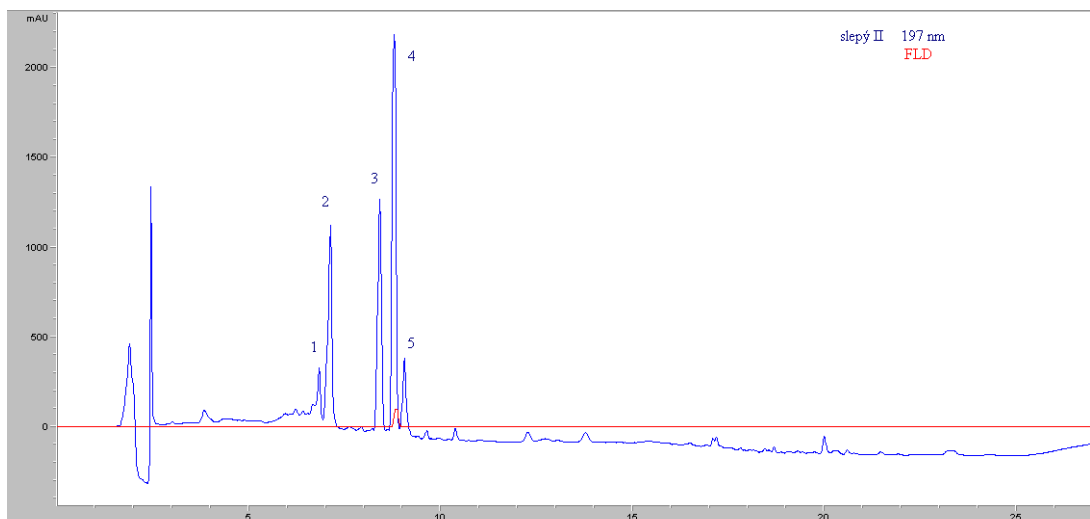
Tab. 9 Výsledky analýzy extrahovatelných reziduí 0,5 ml vzorků v methanolu.

Vzorek	Detegovaná koncentrace [mg/L]		Hmotnost IBU v 0,5 ml vzorku [mg]	Hmotnost biomasy [g]	Možností IBU na 1 g biomasy
	DAD	FLD			
3	0,26	0,20	$1,15 \times 10^{-4}$	4	$2,86 \times 10^{-5}$
4	2,50	2,30	$1,2 \times 10^{-3}$	5,5	$2,18 \times 10^{-4}$
5	0,15	0,14	$7,25 \times 10^{-5}$	2,2	$3,29 \times 10^{-5}$
6	6,20	6,20	$3,1 \times 10^{-3}$	1,5	$2,07 \times 10^{-3}$

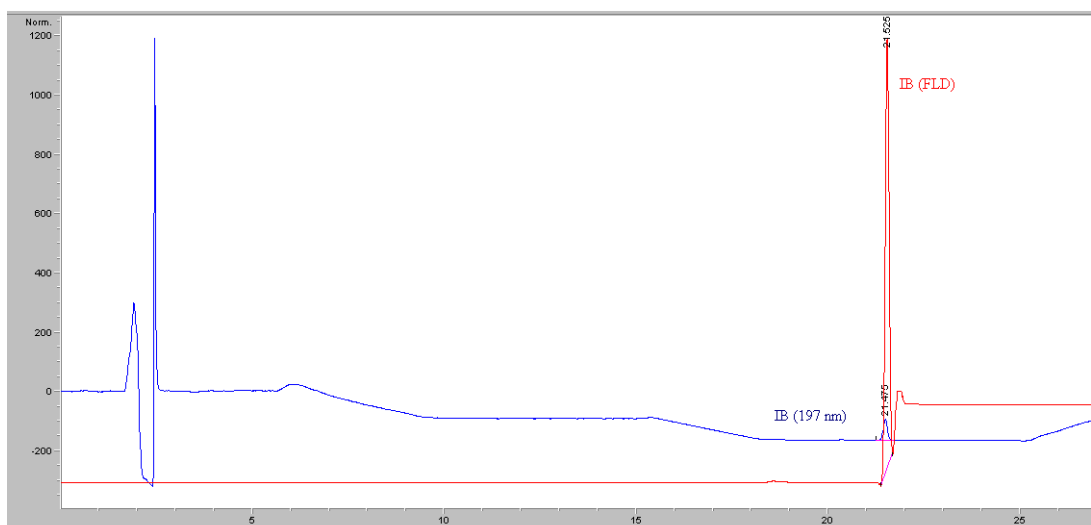
Na Obrázcích 22 – 25 jsou znázorněny příklady analýz extrahovatelných reziduí ve srovnání s kultivací bez přidavku xenobiotika.



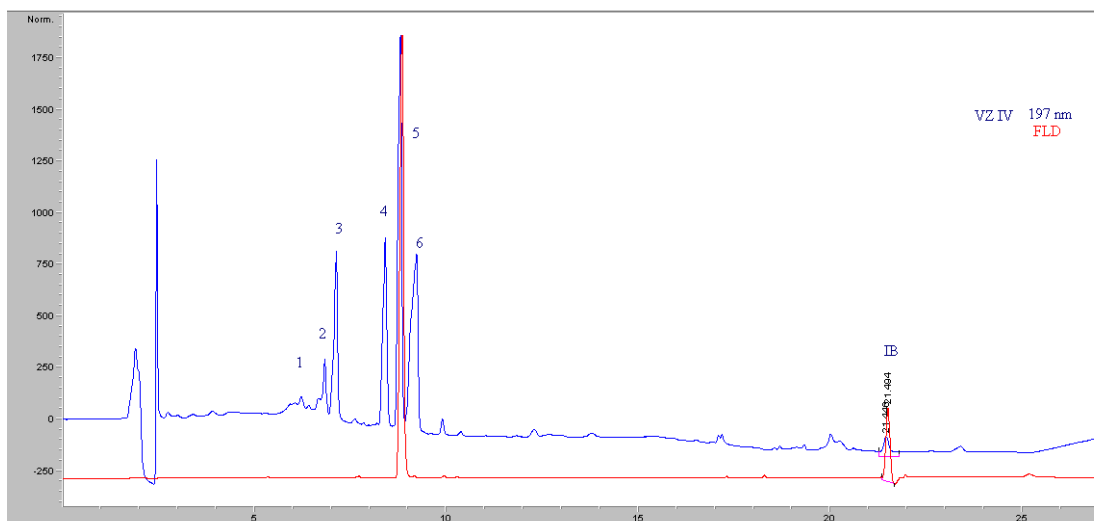
Obr. 22 Chromatogram extraktu z kořenů rostliny kultivované bez přidavku xenobiotika (modrá – DAD detektor, červená – fluorescenční detektor).



Obr. 23 Chromatogram extraktu z kořenů rostliny kultivované bez přídavku xenobiotika po úpravě fluorescenčního signálu (modrá – DAD detektor, červená – fluorescenční detektor).

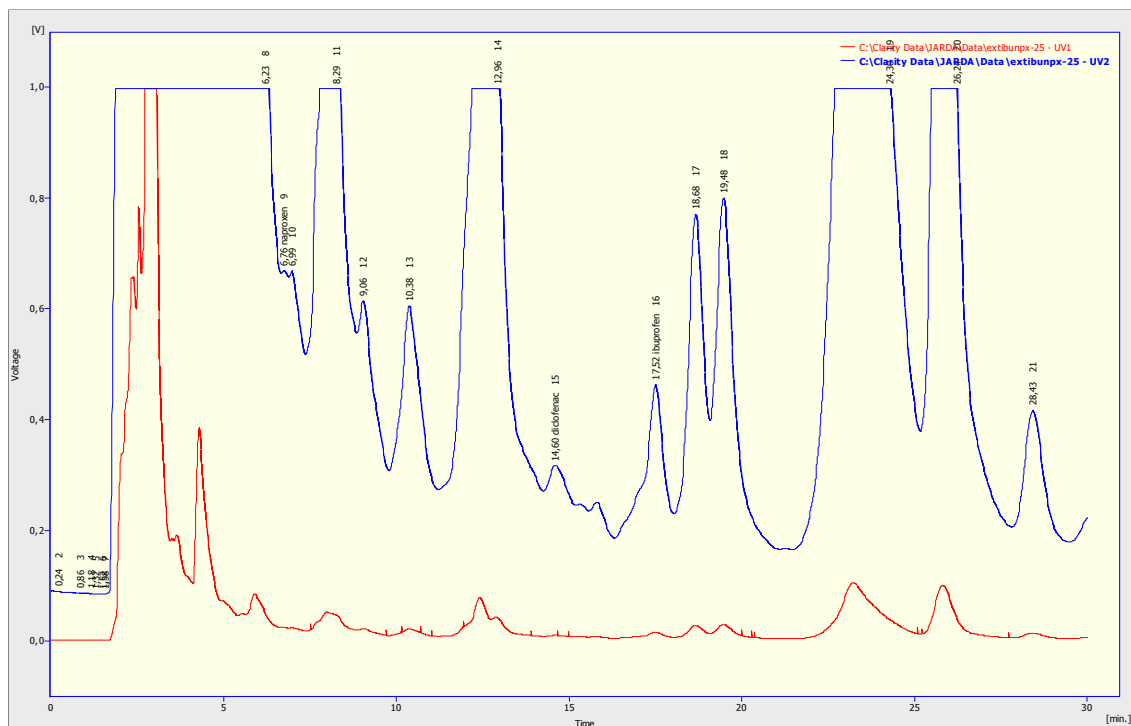


Obr. 24 Chromatogram standardu ibuprofenu (5 mg/l), (modrá – DAD detektor, červená – fluorescenční detektor).



Obr. 25 Chromatogram extraktu z kořenů rostliny kultivované na médiu s 5 mg/l ibuprofenu (modrá – DAD detektor, červená – fluorescenční detektor).

V případě multikomponentních experimentů byly rovněž připraveny extrakty homogenity kořenových a prýtových částí do dichlormethanu s následnou extrakcí odparku do methanolu. Získané vzorky byly analyzovány na běžném UV detektoru. Na Obrázku 26 je znázorněn chromatogram extraktu z kořenů z rostliny kultivované na médiu obohaceném ibuprofenem, naproxenem a diklofenakem, z kterého zjevně vyplývá přítomnost všech použitých kontaminantů v extraktu. Separační podmínky nejsou natolik ideální, aby v použitém modu umožnily kvantifikaci, nicméně zpracování vzorků z multikomponentních kultivací bude náplní dalších experimentů nezahrnutých v diplomovém projektu.



Obr. 26 Chromatogram extraktů z kořenů při kultivaci na médiu s obsahem ibuprofenu, naproxenu a diklofenaku.

## 6 Závěr

V rámci práce byly ve sterilním *in vitro* prostředí vypěstovány rostliny kukuřice seté (*Zea mays*), ke kterým bylo po deseti dnech růstu přidáno kultivační médium s přidanými léčivy ibuprofenem, diklofenakem, naproxenem a karbamazepinem v koncentracích 5 – 10 mg/L. Bylo provedeno několik variant uspořádání pokusu, a sice monokomponentní, kdy kultivační médium obsahovalo pouze jedno léčivo, dikomponentní s obsahem dvou léčiv a trikomponentní se třemi léčivy. V průběhu pokusu byly z kultivačního média odebírány vzorky v intervalu 24 hodin a po ukončení experimentu byly rostliny zpracovány pro analýzu extrahovatelných reziduí.

Účinnost fytoextrakce byla stanovována na základě procentuálního úbytku výchozí koncentrace látek v kultivačním médiu a na základě stanovení extrahované hmotnosti léčiva vztahované na 1 g rostlinné biomasy.

Nejvyšší fytoextrakční účinnost z obou posuzovaných hledisek byla zjištěna u ibuprofenu, a to jak v mono, tak ve vícekomponentních uspořádáních. Bylo zjištěno, že výše počáteční koncentrace ibuprofenu významně ovlivňuje účinnost fytoextrakce tohoto i jiných léčiv, což pravděpodobně poukazuje na toxicitu ibuprofenu pro použitý rostlinný systém.

Naproxen vykázal druhou nejvyšší fytoextrahovatelnost z monokomponentních roztoků a třetí nejvyšší z roztoků vícekomponentních, opět z obou posuzovaných hledisek. Diklofenak obsadil třetí pozici v monokomponentním uspořádání a druhou v uspořádáních vícekomponentních.

Nejnižší fytoextrakční účinnost byla ve všech uspořádáních experimentu pozorována pro karbamazepin.

Přímá úměra vlivu fyzikálně-chemických vlastností jako  $pK_a$  nebo  $K_{ow}$  na účinnost fytoextrakce nebyla prokázána. Výrazný rozdíl v obou vlastnostech vykazuje pouze karbamazepin, pro který byla zároveň pozorována i nejnižší účinnost fytoextrakce. Souvislost mezi těmito vlastnostmi léčiv a účinností fytoextrakce je proto velmi pravděpodobná, byť zřejmě bez lineární závislosti.

Bylo pozorováno, že přítomnost dalšího léčiva v kultivačním médiu snižuje fytoextrakční účinnost léčiva. Dvěma výjimkami byla zvýšená účinnost fytoextrakce

ibuprofenu v dikomponentním uspořádání s karbamazepinem a diklofenakem. Toto pozorování lze teoreticky vysvětlit potenciací transportního rostlinného systému nebo úpravou vlastností média zjednodušující transport do rostlinných tkání.

Analýzou extrahovatelných reziduí bylo prokázáno, že ibuprofen je v extrahovatelné podobě přítomen ve výrazně vyšších koncentracích v kořenové části rostliny než v části nadzemní. Míra transportu do nadzemní části rostliny klesá s rostoucí koncentrací ibuprofenu, což podporuje závěr toxicity ibuprofenu pro rostlinu. Přítomnost ibuprofenu v extrahovatelné podobě v nadzemních částech rostlin poukazuje na možnost kontaminace potravního řetězce.

V dalších experimentech by bylo vhodné podrobněji sledovat postup léčiva rostlinným systémem (například pomocí radioaktivního značení) a pokusit se blíže objasnit princip transportních mechanismů rostliny a jejich ovlivnění fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiv.

## 7 Seznam literatury

1. The European health report 2015. Targets and beyond – Reaching new frontiers in evidence. Dostupné z URL: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/284750/EHR\\_High\\_EN\\_WEB.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/284750/EHR_High_EN_WEB.pdf?ua=1), 24.4.2016
2. Roční hodnocení dodávek LP 2015. Dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/hodnoceni-distribuvanych-a-vydanych-lecivych-pripravkuza>, 15.4.2016
3. Roční hodnocení dodávek LP 2014. Dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/rok-2014>, 24.4.2016
4. Roční hodnocení dodávek LP 2013. Dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/rok-2013>, 24.4.2016
5. Depression , a treatable disease. Dostupné z URL: <http://www.agingsociety.org/agingsociety/pdf/depression.pdf>, 24.4.2016
6. Agamuthu, P. and S.H. Fauziah: Pharmaceuticals in the environment, a prescription for disaster? Waste Manag Res. 29(4), 349-50 (2011)
7. Kotyza, J., et al.: LÉČIVA – „NOVÝ“ ENVIROMENTÁLNÍ POLUTANT. Chemické listy. 103, 540-547 (2009)
8. Santos, L.H., et al.: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. J Hazard Mater. 175(1-3), 45-95 (2010)
9. Origins and Fate of PPCPs in the Environment. Dostupné z URL: <https://uwphi.pophealth.wisc.edu/programs/health-policy/ebhpp/events/20140313/ppcps-in-the-environment.pdf>, 22.4.2016
10. Nebot, C., et al.: Introduction of human pharmaceuticals from wastewater treatment plants into the aquatic environment: a rural perspective. Environ Sci Pollut Res Int. 22(14), 10559-68 (2015)
11. Andreu, V., et al.: Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. Sci Total Environ. 540, 278-86 (2016)
12. Roos, V., et al.: Prioritising pharmaceuticals for environmental risk assessment: Towards adequate and feasible first-tier selection. Sci Total Environ. 421-422,



- 102-10 (2012)
13. Ankley, G.T., et al.: Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ Sci Technol.* 41(24), 8211-7 (2007)
  14. Výsledek vyhledávání "ethinylestradiol" v databázi SÚKL. Dostupné z URL: <http://www.sukl.cz>, 22.4.2016
  15. Perez, M.R., et al.: Feminization and altered gonadal gene expression profile by ethinylestradiol exposure to pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, a South American teleost fish. *Environ Toxicol Chem.* 31(5), 941-6 (2012)
  16. Örn, S., H. Holbech, and L. Norrgren: Sexual disruption in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to mixtures of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -trenbolone. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 41, 225-231 (2016)
  17. Fabbri, E.: Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Ann N Y Acad Sci.* 1340, 20-8 (2015)
  18. Hampl, F., S. Rádl, and J. Paleček; *Farmakochemie*. Praha, Grada Publishing 2007. s. 105-112
  19. Buer, J.K.: Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacology.* 22(5), 263-267 (2014)
  20. Knights, K.M., A.A. Mangoni, and J.O. Miners: Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 3(6), 769-76 (2010)
  21. The eicosanoids: Prostaglandines, Tromboxanes, Leukotrienes. Dostupné z URL: <http://www.slideshare.net/Mohammad-Hadi-Farjoo/the-eicosanoids>, 18.4.2016
  22. Rao, P. and E.E. Knaus: Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 11(2), 81s-110s (2008)
  23. Halford, G.M., M. Lordkipanidze, and S.P. Watson: 50th anniversary of the discovery of ibuprofen: an interview with Dr Stewart Adams. *Platelets.* 23(6), 415-22 (2012)
  24. Lüllmann, H., et al.; *Barevný atlas farmakologie*. Praha, Grada Publishing 2001. s. 198-201
  25. Šlechtová, M.; *Využití rostlinných biotechnologií k odstraňování farmak ze životního prostředí*, Diplomová práce. Praha, UK v Praze, PŘF 2010. s. 21

26. Ibuprofen Side-effects. Dostupné z URL: <http://www.drugs.com/sfx/ibuprofen-side-effects.html>, 15.4.2016
27. McElwee, N.E., et al.: A prospective, population-based study of acute ibuprofen overdose: complications are rare and routine serum levels not warranted. *Ann Emerg Med.* 19(6), 657-62 (1990)
28. Ibuprofen: Pharmacology: Mechanisms of Action. Dostupné z URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050#>, 15.4.2016
29. Gamarra, J.S., Jr., et al.: Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: a public health perspective. *Chemosphere.* 120, 462-9 (2015)
30. Luque-Espinar, J.A., et al.: Seasonal occurrence and distribution of a group of ECs in the water resources of Granada city metropolitan areas (South of Spain): Pollution of raw drinking water. *Journal of Hydrology.* 531(1), 612-625 (2015)
31. Corcoll, N., et al.: Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents. *Chemosphere.* 112, 185-93 (2014)
32. Kruglova, A., et al.: Biodegradation of ibuprofen, diclofenac and carbamazepine in nitrifying activated sludge under 12 degrees C temperature conditions. *Sci Total Environ.* 499, 394-401 (2014)
33. Choina, J., et al.: Photocatalytic decomposition of pharmaceutical ibuprofen pollutions in water over titania catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental.* 129(17), 589-598 (2013)
34. Naproxen. Dostupné z URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Naproxen>, 13.4.2016
35. Martínková, J.e.a.; *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů.* Praha, Grada Publishing 2007. s. 173
36. Richy, F., O. Bruyere, and O. Ethgen: Time dependent risk of gastrointestinal complications induced by non-steroidal anti-inflammatory drug use: a consensus statement using a meta-analytic approach. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 63, 759-766 (2004)
37. Lincová, D.; *Základní aplikovaná farmakologie.* Praha, Galén 2007. s. 303-304
38. Duggan, K.C., et al.: Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *J Biol Chem.* 285(45), 34950-9 (2010)

39. Straub, J.O. and K.M. Stewart: Deterministic and probabilistic acute-based environmental risk assessment for naproxen for western Europe. *Environ Toxicol Chem.* 26(4), 795-806 (2007)
40. Brozinski, J.-M., M. Lahti, and A. Meierjohann: The Anti-Inflammatory Drugs Diclofenac, Naproxen and Ibuprofen are found in the Bile of Wild Fish Caught Downstream of a Wastewater Treatment Plant. *Environmental Science & Technology.* 47(1), 342-348 (2013)
41. Domínguez-Vargas, J.R., T. Gonzalez, and P. Palo: Removal of Carbamazepine, Naproxen, and Trimethoprim from Water by Amberlite XAD-7: A Kinetic Study. *CLEAN: Soil, Air, Water.* 41(11), 1052-1061 (2013)
42. Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. Dostupné z URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445819/>, 10.4.2016
43. Lüllmann, H., K. Mohr, and M. Wehling; *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání Praha, Grada Publishing 2004. s. 334*
44. Bhala, N., et al.: Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 382(9894), 769-79 (2013)
45. Brater, C.: Renal Effects of Cyclooxygenase-2-Selective Inhibitors. *Journal of Pain and Symptom Management.* 23(4), 15-20 (2002)
46. Dastidar, S., et al.: The anti-bacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 14(3), 249-251 (2000)
47. Fowler, P.D., et al.: Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol.* 25(3), 389-94 (1983)
48. Chen, G., et al.: Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil. *Environ Pollut.* 199, 253-60 (2015)
49. Bartha, B., C. Huber, and P. Schroder: Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia*--how plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Sci.* 227, 12-20 (2014)
50. Smith, H.S.; *Current therapy in pain.* Philadelphia, Saunders/Elsevier 2009. s. 460

51. Carbamazepine. Dostupné z URL:  
<http://www.drugs.com/monograph/carbamazepine.html>, 10.4.2016
52. Carbamazepine toxicity. Dostupné z URL:  
<http://emedicine.medscape.com/article/813654-overview>, 10.4.2016
53. Liu, L., et al.: The mechanism of carbamazepine aggravation of absence seizures. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(2), 790-8 (2006)
54. Slíva, J. and M. Votava; *Farmakologie*. Praha, TRITON 2010. s. 134
55. Dailey, J.W., et al.: Carbamazepine increases extracellular serotonin concentration: lack of antagonism by tetrodotoxin or zero Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Pharmacol.* 328(2-3), 153-62 (1997)
56. Almeida, A., et al.: Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquat Toxicol.* 156, 74-87 (2014)
57. Jarvis, A.L., M.J. Bernot, and R.J. Bernot: The effects of the psychiatric drug carbamazepine on freshwater invertebrate communities and ecosystem dynamics. *Sci Total Environ.* 496, 461-70 (2014)
58. Salt, D.E., R.D. Smith, and I. Raskin: Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49, 643-668 (1998)
59. Introduction to phytoremediation. Dostupné z URL: <https://clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>, 24.4.2016
60. Van Ginneken, L., et al.: PHYTOREMEDIATION FOR HEAVY METAL-CONTAMINATED SOILS COMBINED WITH BIOENERGY PRODUCTION. *Journal of Environmental Engineering & Landscape Management.* 15(4), 227-236 (2007)
61. Kovářová, M.; Jak dokáží přežít rostliny na toxických výsypkových substrátech? Fyziologické a strukturální vlastnosti rostlin na substrátech s vysokým obsahem As a Hg, Bakalářská práce. Praha, UK V Praze, PřF 2010. s. 29
62. Rathouská, L.; Analýza a fytoextrakce fluoxetinu ve vodním ekosystému, Diplomová práce. Praha, UK v Praze, PřF 2012. s. 15
63. Dietz, A.C. and J.L. Schnoor: Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect.* 109 Suppl 1, 163-8 (2001)
64. Carvalho, P.N., et al.: A review of plant-pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands.

- Environ Sci Pollut Res Int. 21(20), 11729-63 (2014)
65. Sanderman, H.: Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics*. 4, 225-241 (1994)
  66. Mendez, M.O. and R.M. Maier: Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments--an emerging remediation technology. *Environ Health Perspect*. 116(3), 278-83 (2008)
  67. Matamoros, V., et al.: Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: a microcosm experiment. *Chemosphere*. 88(10), 1257-1264 (2012)
  68. Fytostabilizace. Dostupné z URL: <http://www.gate2biotech.cz/fytostabilizace-kdyz-rostliny-hasi-nase-prusvihy/>, 24.4.2016
  69. Botanical Cleanup Crews: Using plants to tackle polluted water and soil Dostupné z URL: <https://www.sciencenews.org/sites/default/files/15003-14.pdf>, 24.4.2016
  70. Sedlářová, K.; Expres transgenu bphC u ječmene, Diplomová práce. Brno, Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta 2015. s. 17
  71. Sharma, P. and P. Sonali: Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 2(4), 178-191 (2014)
  72. Schmidt, U.: Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J Environ Qual*. 32(6), 1939-54 (2003)
  73. Soudek, P., et al.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy*. 102, 346–352 (2008)
  74. A Citizen's Guide to Phytoremediation. Dostupné z URL: [https://clu-in.org/download/Citizens/a\\_citizens\\_guide\\_to\\_phytoremediation.pdf](https://clu-in.org/download/Citizens/a_citizens_guide_to_phytoremediation.pdf), 24.4.2016
  75. Dercová, K., et al.: Bioremediace toxických kovů kontamující vody a půdy. *Chemické listy*. 99, 682 – 693 (2005)
  76. Dushenkov, V., H. Motto, and I. Raskin: Rhizofiltration: the Use of Plants to Remove Heavy Metals From Aqueous Streams. *Environmental Science Technology*. 30, 1239-1245 (1995)
  77. Lábusová, j.; Fytoremediace: biochemické charakteristiky rostlin hyperakumulujících těžké kovy, Bakalářská práce. Praha, UK v Praze, PŘF 2010.

s. 13

78. Murashige Skoog – Plant Tissue Culture Protocol. Dostupné z URL:  
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/murashige-skoog.html>, 21.4.2016