

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie životního prostředí



Kristýna Rychlovská

STUDIUM FYTOEXTRAKCE BENZODIAZEPINŮ

Phytoextraction of Benzodiazepines

Diplomová práce

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

Prohlášení

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

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 28. dubna 2016.

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., a zároveň paní Ing. Šárce Pšondrové za jejich odborné vedení, čas, ochotu a klidný přístup. Děkuji rodičům za umožnění studia a podporu při něm.

Abstrakt

Cílem této práce bylo provedení experimentů s kukuřicí setou (*Zea mays*) za účelem zjištění účinnosti fytoextrakce vybraných léčiv z živného média. Rostliny byly hydroponicky kultivovány ve sterilním prostředí po 3 týdny, poté k nim byly přidány roztoky médií obohacených o vybrané benzodiazepiny (diazepam, flunitrazepam, nitrazepam a bromazepam) v koncentracích 5-10 mg/l. Odběry z jednotlivých rostlin byly prováděny po 24 hodinách a vzorky byly následně analyzovány pomocí metody HPLC/UV.

Účinnost fytoextrakce byla hodnocena dvojím způsobem: jako procentuální úbytek koncentrace léčiva v médiu, a jako množství fytoextrahovaného léčiva v miligramech na gram biomasy rostliny. Z hlediska úbytku koncentrace léčiva byla jako neúčinnější vyhodnocena fytoextrakce nitrazepamu (74,7 %), méně účinná diazepam a bromazepam (55,2 %, resp. 53,9 %) a nejméně účinná fytoextrakce flunitrazepamu (38,0 %). Při přepočtu na 1 g biomasy rostlin byla zjištěna nejlepší fytoextrakce bromazepamu (0,08 mg léčiva na 1 g biomasy rostliny), nižší účinnost u bromazepamu a diazepamu (0,02 mg) a nejnižší účinnost byla shledána opět u flunitrazepamu (0,01 mg).

klíčová slova: fytoextrakce, benzodiazepiny, diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, bromazepam

Abstract

The aim of this study was to carry out experiments with maize (*Zea mays*) for the purpose of finding out the efficiency of phytoextraction of chosen pharmaceuticals from the nutrient solution. The plants were cultivated for three weeks in a sterile environment. Then was added a nutrient solution enriched with chosen benzodiazepines – diazepam, flunitrazepam, nitrazepam and bromazepam – in concentration 5-10 mg/L. The samples from each plant were taken every day (24 hours) and then were analyzed with HPLC/UV.

The efficiency of phytoextraction was evaluated in two ways. The first one as an percentage of a decrease of the concentration of the pharmaceuticals in the solution with time, the second one as an amount of phytoextracted pharmaceutical in milligrames per gram of the plant matter. From the standpoint of the decrease of the concentration was as the most efficient measured the phytoextraction of nitrazepam (74,7 %), less efficient diazepam and bromazepam (55,2 %, respectively 53,9 %) and the least efficient flunitrazepam (38,0 %). When converted to the mass of the plant matter the most efficient was found the phytoextraction of bromazepam (0,08 mg of drug to 1 gram of plant matter), lower efficiency by bromazepam and diazepam (both 0,02 mg) and the lowest again by flunitrazepam (0,01 mg).

key words: phytoextraction, benzodiazepines, diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, bromazepam

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1	Léčiva a jejich výskyt do ŽP	11
3.1.1	Léčiva a produkty osobní péče	11
3.1.2	Léčiva	11
3.1.3	Vstup farmak do ŽP.....	13
3.1.4	Benzodiazepiny v ŽP	15
3.2	Benzodiazepiny	16
3.2.1	Terapeutické použití	16
3.2.2	Vedlejší účinky a zneužívání.....	17
3.2.3	Mechanismus účinku na molekulární úrovni	18
3.2.4	Farmakokinetika	19
3.2.5	Použitá léčiva.....	20
3.2.5	Ekotoxikologické údaje	22
3.2.6	Množství benzodiazepinů na trhu.....	22
3.3	Fytoremediace	24
3.3.1	Přednosti a limity fytoremediace.....	24
3.3.2	Základní mechanismy metabolismu rostlin.....	25
3.3.3	Metody fytoremediace	25
3.3.4	Metody aplikace fytoremediace	27
3.3.5	Studie fytoremediace farmak.....	28
3.3.6	Umělé mokřady	29
3.3.7	Význam studia fytoremediačních procesů.....	30

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Chemikálie, přístrojové vybavení a biologický materiál.....	31
4.2	Standardy léčiv	33
4.3	Příprava <i>in vitro</i> kultur rostlin	33
4.4	Průběh fytoextrakce léčiv	35
4.5	Měření koncentrace léčiv pomocí HPLC/UV	36
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	39
5.1	Diazepam.....	39
5.2	Flunitrazepam	42
5.3	Nitrazepam.....	44
5.4	Bromazepam.....	46
5.5	Srovnání účinnosti fytoextrakce jednotlivých léčiv	49
6	ZÁVĚR.....	53
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	54
8	SEZNAM TABULEK.....	63
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
10	PŘÍLOHY	65

Seznam použitých zkratek a symbolů

ACN	acetonitril
CNS	centrální nervová soustava
C18	oktadecyl
ČOV	čistírna odpadních vod
DDD	definovaná denní dávka
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethynylestradiol
EPA	Environmental Protection Agency
GABA	kyselina γ -aminomáselná
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MS médium	médium podle Murashiga a Skooga
PPCPs	farmaka a produkty osobní péče
UV	ultrafialové záření
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TEA	triethylamin
WHO	World Health Organisation
ŽP	životní prostředí

1 ÚVOD

Dnešní doba je charakterizována rostoucí spotřebou, všudypřítomnou modernizací a technizací. Zejména v zemích, které vykazují rostoucí ekonomické ukazatele, se tak do životního prostředí dostávají látky, které před pár lety ještě ani neexistovaly. Charakteristické je uvědomění si následků kontaminace v momentě, kdy už je látka v prostředí v takovém množství, že si jejích efektů lze všimnout (nelze nevšimnout). U dalších a dalších látek se zjišťuje, že byly uváděny do životního prostředí bez odpovídajících testů a významně ovlivňují ekosystémy i zdraví člověka. Léčiva jsou navíc ze své podstaty bioaktivní látky, řada jejich metabolitů je také bioaktivní, a to zdaleka nejen vůči člověku. Základní fungování mnoha fyziologických procesů u člověka je minimálně analogické podobné s dalšími organismy (s klesající příbuzností samozřejmě klesá).

Dnešní legislativa již nařizuje před zavedením jakékoli látky, která se dostane do ŽP, provádět ekotoxikologické testy, které musí na různých úrovních ekosystému (za použití modelových organismů) prokázat, že zavedení dané látky nezpůsobí nepřiměřenou škodu životnímu prostředí. Z principu však není možné otestovat všechny úrovně a složky ekosystému. Jako nepředvídatelný se jeví koktejlový efekt, kdy látky samotné se chovají jinak než v přítomnosti dalších látek.

Jako perspektivní řešení, jak z životního prostředí odstraňovat nežádoucí látky a zabránit jejich dalšímu šíření, se v současné době jeví fytořemediace, které využívají schopnosti rostlin vázat do svých pletiv nebo na jejich povrch i látky kontaminující ŽP.

2 CÍLE PRÁCE

V současné době představují fytoremediace jednu z nejschůdnějších variant pro možnosti odstraňování kontaminantů ze životního prostředí. Náplní práce je provedení dílčích testů možností fytoextrakce vybraných léčiv ze skupiny benzodiazepinů na hydroponicky pěstované rostlinné kultuře.

Vlastní cíle práce:

- 1) Příprava rostlinné *in vitro* kultury kultivaru kukuřice seté *Zea mays*.
- 2) Příprava a kultivace v živných médiích podle Mushiga a Skooga obohacených o vybraná léčiva; benzodiazepiny diazepam, flunitrazepam, nitrazepam a bromazepam.
- 3) Provádění odběrů médií ve sterilním prostředí.
- 4) Analýza vzorků použitých léčiv v médiích pomocí metody HPLC/UV.
- 5) Vyhodnocení účinnosti fytoextrakce dané rostlinné kultury sledováním úbytku koncentrace v médiu.
- 6) Vyhodnocení účinnosti fytoextrakce na jednotku biomasy.
- 7) Porovnání léčiv z hlediska rozdělovacího koeficientu oktanol/voda a možné souvislosti s účinností jejich fytoextrakce.
- 8) Porovnání účinnosti fytoextrakce s daty o jiných léčivech v dostupných zdrojích.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Léčiva a jejich výskyt do ŽP

3.1.1 Léčiva a produkty osobní péče

Farmaka a produkty osobní péče – pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) – jsou chemicky velmi různorodou skupinou látek, které jsou využívány v lidské i veterinární medicíně, zemědělství, kosmetice, hygienické péči atd. Podle EPA (Environmental Protection Agency) figurují jako zdroje PPCPs domácnosti, nemocnice a jiná zdravotnická zařízení, zemědělství (vč. rybářství), průmyslové podniky, ilegální laboratoře, skládky. [1] Vzhledem k masové produkci těchto látek a jejich plošnému použití, je nutné nahlížet na PPCPs jako na významnou skupinu látek kontaminující životní prostředí (ŽP). Vzhledem k jejich kontinuálnímu přísunu lze tyto látky považovat za pseudo-perzistentní. [2] Dochází k rozšíření těchto látek do různých složek ŽP i do živých organismů, kde se mohou kumulovat. Například syntetické pižmo a jeho metabolity v prostředí perzistují a byly nalezeny jak ve venkovním vzduchu [3], ve vodách, sedimentech, tak i ve tkáních měkkýšů i ryb [4, 5]. Jiný test – na myších – ukázal, že osvěžovače vzduchu při koncentracích běžně dosažitelných v domácnostech mohou způsobit iritaci dýchací soustavy. [6]

Výzkum provedený U. S. Geological Survey v letech 1999 – 2000 ukázal přítomnost organických odpadních látek v 80 % z 139 zkoumaných toků, v nejvyšších koncentracích byly nalezeny metabolity detergentů a steroidy (z léčiv dále léky bez předpisu a antibiotika), 33 z 95 nalezených látek je označováno jako ED (endokrinní disruptory) nebo potenciální ED. [7]

3.1.2 Léčiva

Významnou skupinu PPCPs představují léčiva – látky sloužící k diagnostickým účelům, léčení onemocnění, zmírnění příznaků, k prevencím nemocí, zlepšení kondice. Do této skupiny látek jsou zahrnovány kromě humánních léčiv i veterinární přípravky a někdy také ilegální drogy. Fenomén znečišťování ŽP farmaky byl zaznamenán již v 70. letech, významněji se o tomto tématu začalo hovořit až v 90. letech, kdy již byly

k dispozici dostatečně přesné metody výzkumu, a v dnešní době je mu věnována velká pozornost.

Podle finální zprávy projektu EU KNAPPE bylo v roce 2008 v oběhu 4 000 aktivních látek léčiv (v různých přípravcích a lékových formách) a spotřeba aktivních látek léčiv byla více jak 100 000 tun ročně. [8] Podle údajů ze Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) byl celkový objem léčiv dodaných v ČR v roce 2015 do zdravotnické sítě 267,2 milionů balení léčiv. Od roku 2007 do roku 2015 se sice počet obchodovaných balení snížil o necelých 76 milionů balení, ale počet definovaných denních dávek (DDD) se za stejnou dobu zvýšil o 674,6 milionů. [9]

Podle WHO je ve světě 50 % léčiv předepisováno, vydáváno nebo prodáváno nesprávně a 50 % pacientů své léky neužívá podle předpisu. [10]

3.1.2.1 Diskutované skupiny léčiv

Největší pozornosti se z hlediska ŽP dostává riziku přítomnosti antibiotik a látek ovlivňujících hormonální prostředí organismů. V souvislosti s nesprávným používáním antibiotik je prokázána rezistence cílových organismů [11-13] diskutuje se o vzniku superorganismů [14] a nutnosti syntetizovat neustále nová léčiva. [15] Bakterie jsou v ekosystémech důležitými rozkladači, antibiotika mohou snižovat biodegradaci organického materiálu a tím znemožňovat uvolnění živin zpět do oběhu, což se projeví na vodní fauně a následně v celém ekosystému. [16, 17] Vzhledem k tomu, že rezistence patogenních organismů vůči antibiotikům představuje riziko úmrtí lidí a značné ekonomické ztráty, je uvážlivé použití antibiotik již několik let součástí politiky jak WHO, tak EU i ČR. [11, 12, 15, 18-20] Ačkoli v EU je použití antibiotik jako růstových stimulátorů zakázáno [18], i tak jejich spotřeba roste a v konvenčních velkochovech se často podávají již v krmných směsích – kromě znečištění odpadními vodami tak v případě nedodržení postupů a ochranných lhůt před porážkami dochází i k přímé kontaminaci potravinového řetězce. [11]

Látky narušující hormonální prostředí organismů, pochází mimo jiné z léčiv – hormonální antikoncepce, kterou ve světě užívá 100 milionů žen. [21] Na organismy působí již v řádech ng/l. [22, 23] 17 α -ethynylestradiol (EE2), látka pocházející

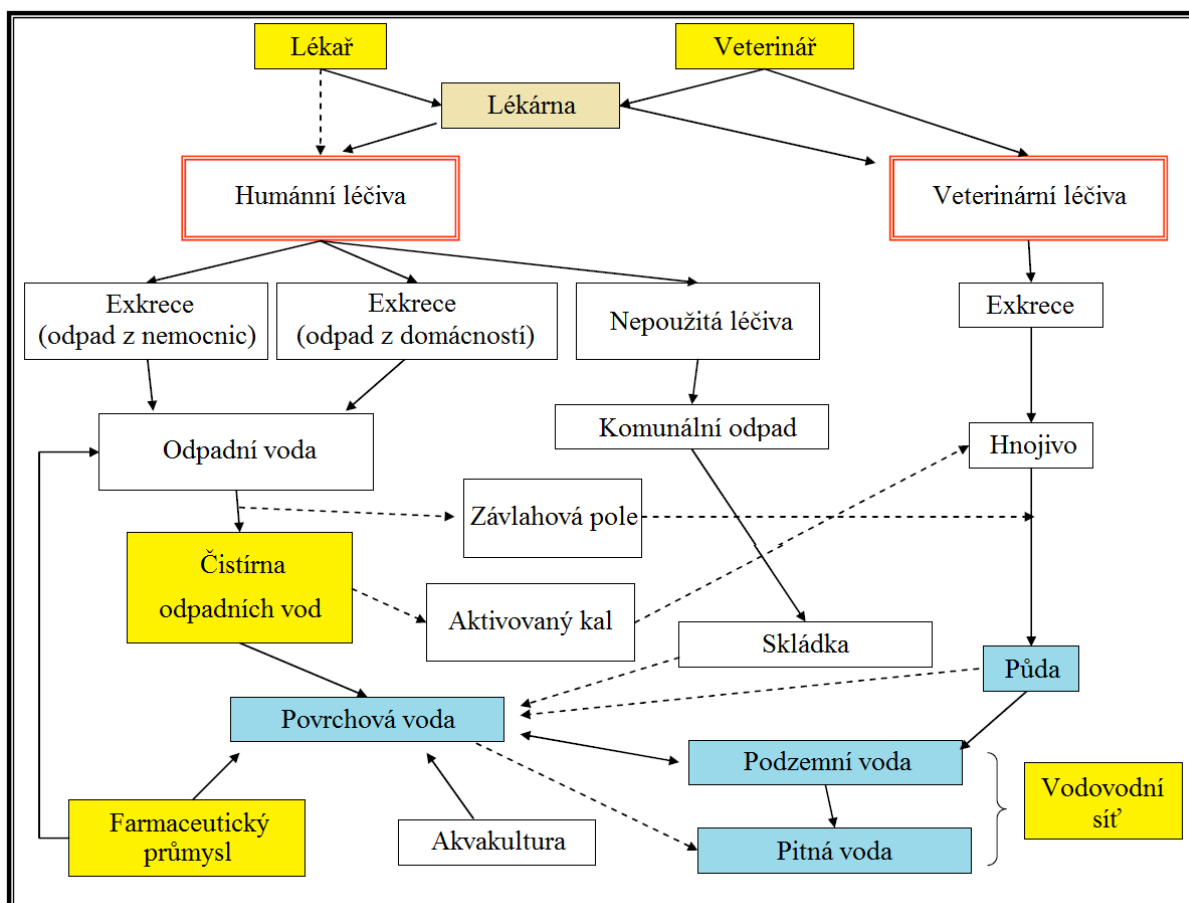
z antikoncepce, může narušovat rozmnožování a chování vodních bezobratlých [24], obojživelníků [21, 22, 25], či ryb [23, 24]. EE2 byl při testech povrchových vod v jižní Číně nalezena v 86 % vzorků nalezen v koncentracích do 3,4 ng/l [26], naproti tomu při jiných testech v evropských řekách prokázán nebyl. [27] Jak ale uvádí Bhandari a kol. [28] , testy nemusí být průkazné kvůli mezi detekce.

Česká studie se zabývala stanovením látek pocházejících z hormonální antikoncepce ve Vltavě a jejích přítocích v Praze. Na řadě míst byla koncentrace látek pod detekčním limitem, ale na některých místech, zejména ve výpustích ČOV, byla koncentrace v řádech desítek až stovek ng/l. Nejvyšší koncentrace na výpusti ČOV byla stanovena na 345 ng/l, ovšem dále po toku bylo změřeno již jen 3 ng/l a 2 ng/l – autoři předpokládají sorpci na jílovité částice a odbourávání testovaných látek. [29]

O dopadech látek pocházejících z hormonální antikoncepce na vyšší organismy včetně člověka se stále diskutuje, zejména v souvislosti s nízkou expozicí kontaminantů z ŽP vůči expozici např. fytoestrogenů z potravy.

3.1.3 Vstup farmak do ŽP

Léčiva mohou do ŽP vstupovat ve dvojí formě – metabolizovaná a v nezměněné formě. Farmaka se po požití pacientem a metabolizaci dostávají s exkrementy do odpadních vod – v závislosti na léčivu se jedná o směs látek metabolizovaného léčiva a nemetabolizované části léčiva. Takto se dostávají odpadními vodami z domácností, nemocnic a jiných zdravotnických zařízení. V nezměněné formě se farmaka mohou dostávat do povrchových vod průsaky ze skládek nebo spláchnutím do odpadu. Odpadní vody v rozvinutých zemích většinou prochází přes septiky a ČOV, mnohde je ale systém nedostatečný a do povrchových vod se dostává odpadní voda přímo. Podrobné cesty léčiv v ŽP jsou uvedeny na obr. 1.



Obrázek 1. Osud léčiv v životním prostředí. (převzato z KNAPPE Final Report).[8]

Zbavování se léčiv jinak, než vrácením do lékárny, je rovněž zdrojem léčiv v povrchových vodách. Průzkum v Británii ukázal, že až dvě třetiny nevyužitých léčiv končí v komunálním odpadu a více jak 10% je spláchnuto v toaletě. [30] V USA je do běžného odpadu vyhozeno 53 % nespotřebovaných léků a spláchnuto více než třetina léků. Řádné doužívání všech léčiv do expirace potvrdilo pouze 2 % respondentů. [31] Podle jiné studie provedené v USA 35 % respondentů nespotřebované léky spláchnuje do umyvadla a 54 % do toalety, doma je ukládá na neurčito 54 % lidí. [32]. Podle Medication disposal survey 23 % respondentů doma uchovává prošlé předepsané léky a 28,6 % prošlé léky dostupné bez předpisu. [33]

3.1.4 Benzodiazepiny v ŽP

V roce 2009 byly ve Španělsku testovány řeky v Madridu na přítomnost psychofarmak. Nordiazepam byl zjištěn na 90 % testovaných stanovišť, oxazepam v 80%, 7-aminoflunitrazepam v 10%. Nordiazepam a oxazepam jsou jak produkty metabolismu diazepam, tak samostatná komerčně dostupná farmaka, 7-aminoflunitrazepam je produkt metabolismu flunitrazepam. Nordiazepam byl nalezen v maximální koncentraci 76 ng/l (medián 26 ng/l), nejvyšší nalezená hodnota oxazepamu byla 129 ng/l (medián 30 ng/l), 7-aminoflunitrazepam byl nalezen v koncentraci 55 ng/l. [34]

Diazepam nebyl při testech v Itálii zaznamenán v říčních sedimentech, v řekách nejvyšší zjištěná koncentrace činila 1,2 ng/l, ale v pitné vodě v oblasti Lodi byl zjištěn v koncentraci 19,6-23,5 ng/l, což představovalo vůbec nejvyšší zjištěnou koncentraci reziduí farmak v pitné vodě v celém testu. [35]

Ve Švédsku byl 7-aminoflunitrazepam nalezen v přítoku ČOV v max. koncentraci 78 ng/l, v průsakové vodě pak max. 1000 ng/l. Nordiazepam byl nalezen v přítoku ČOV v koncentraci 28 ng/l, v odtoku až 30 ng/l, oxazepam v přítoku i odtoku ČOV až 1200 ng/l, v povrchové a pitné vodě až 24 ng/l a v průsakové vodě až 110 ng/l. Flunitrazepam byl identifikován také v sedimentu v koncentraci 3,3 ng/g sušiny a oxazepam v kalu v koncentraci max. 110 ng/g sušiny. [36]

V Aartselaaru v Belgii byl diazepam nalezen v přítoku do ČOV v množství 1,18 µg/l a 0,59 µg/l, ve výtoku z ČOV bylo nejvyšší množství diazepam 0,66 µg/l. [37]

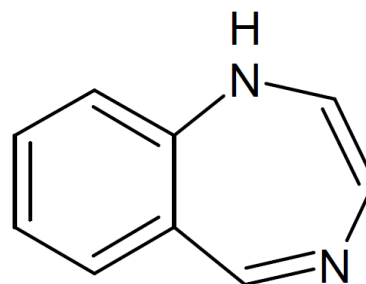
Diazepam má ve srovnání s jinými léčivy (př. paracetamol, ibuprofen) mnohem delší perzistenci v ŽP, DT50 (doba, za kterou je odstraněno 50% původního množství) je více než 300 dní, DT90 (doba, za kterou je odstraněno 90% původního množství) je delší než 1 rok. [38] Důležitými mechanismy chování diazepam (a dalších benzodiazepinů) ve vodě je sorpce na sedimentární částice (60 % částic diazepam) [38] a fotodegradace v povrchových vrstvách, při níž vzniká řada produktů. [38, 39] Produkt metabolismu diazepam, oxazepam, je v ŽP odstraňován rychleji, ale nepodléhá v takové míře sorpci na sediment. [38]

3.2 Benzodiazepiny

Benzodiazepiny jsou hojně využívaná psychofarmaka – léčiva, u nichž je očekáváním účinkem změna pacientova psychického stavu [40].

Benzodiazepiny jsou odvozeny ze základní struktury 1,4-benzodiazepinu (obr. 2 **Obrázek 7**).

Jejich farmakologické použití je velmi široké, jsou využívány jako anxiolytika ke zmírnění úzkosti, hypnotika při poruchách spánku, myorelaxancia ke snížení svalových křečí. Mohou být indikovány i při status epilepticus (opakované záchvaty tonicko-klonických křečí) a v některých případech doplňují terapii dalšími antiepileptiky. Pro navození celkové anestezie jsou využívány benzodiazepiny s rychlou eliminací. Při těžkých úrazech, infarktu nebo psychosomatických potížích jsou benzodiazepiny cenné díky „psychovegetativním odpražení (rozpojení)“ [41, 42], kdy pomáhají zmírnit dopad psychiky člověka na jeho somatické funkce.



Obrázek 2. 1,4-benzodiazepin.

3.2.1 Terapeutické použití

3.2.1.1 Anxiolytika

Benzodiazepiny jsou často používány ke zmírnění úzkosti, strachu, pocitu napětí. Utlumují elektrickou aktivitu retikulární formace a limbického systému, čímž ovlivňují duševní rozpoložení člověka. Dochází k oproštění vědomí od vnějších i vnitřních podnětů a prožitků a zklidnění. [42] Benzodiazepiny uvolňují a pomáhají zvládat krizové i dlouhodobě úzkostné stavy, ale neřeší příčinu úzkostí a depresivních nálad, podávané nevhodně a samostatně mohou naopak i urychlit suicidium.

3.2.1.2 Hypnotika

Hypnotika jsou používány při poruchách spánku, neboť působí utlumujícím efektem a navozují spánek. Je žádoucí, aby tento efekt setrval jen po omezenou dobu, aby nedocházelo k ospalosti i po probuzení. Zavedení čtvrtého kruhu do struktury benzodiazepinů zvyšuje metabolickou labilitu léčiva a rychlost eliminace tak, že je možné tyto látky použít jako hypnotika. Například krátce působící benzodiazepin brotizolam vykazuje eliminační poločas 4-7 hodin při terapeutické dávce 0,25 mg na

noc, triazolam dokonce jen 2-4 hodiny (jiné prameny udávají 1,5-3 hod [42], 4-5 hod [43]. Delší eliminační poločas, 10-20 hodin, má nitrazepam, podobně jako temazepam, lorazepam, lormetazepam a další. [41, 42]

3.2.1.3 Antiepileptika a antikonvulziva

Jako antiepileptikum první volby může být volen klonazepam, který se užívá při myoklonických záchvatech zejména u dětí; může být podáván i dlouhodobě, stejně jako diazepam. Při *status epilepticus*, záchvatech tonicko-klonických křečí bez nabytí vědomí mezi jednotlivými záchvaty, které mohou bezprostředně ohrozit život, je jako antikonvulzivum podáván intravenózně nebo rektálně diazepam (nástup účinku již za 1-3 minuty), dále lorazepam nebo klonazepam. [42]

3.2.1.4 Centrální myorelaxancia

Tato skupina látek snižuje tonus kosterního svalstva tlumením reflexů vedoucích z míchy. Z benzodiazepinů se pro tyto účely využívá diazepam a tetrazepam. [42]

3.2.1.5 Anestetika

Pro navození celkové anestezie jsou využívány benzodiazepiny s rychlou eliminací. Tetracyklický benzodiazepin midazolam se používá k úvodu do anestezie. Rychle se metabolizuje a má depresivní účinek na dýchání. [42]

3.2.2 Vedlejší účinky a zneužívání

Jako **nežádoucí účinky** se při podávání benzodiazepinů uvádějí lhostejnost, emoční oploštělost, snížení motorické koordinace, zhoršení vidění, halucinace, zmatenost. Pro tyto nežádoucí účinky by uživatelé benzodiazepinů (hypnotik i anxiolytik) neměli řídit vozidla, protože nebezpečí nehody významně vzrůstá, zejména u mladších lidí. [44-46] Benzodiazepiny při dlouhodobém užívání negativně ovlivňují paměť [43], může docházet k anterográdní ztrátě paměti [47], kdy starší poznatky jsou vybavovány, ale neukládají se nové informace. U části uživatelů se může vyskytovat i paradoxní reakce – excitace až hyperaktivita, zejména u starších pacientů. [42, 47]

Terapie benzodiazepiny se doporučuje používat po dobu nezbytně nutnou, aby nedocházelo k návyku, u některých vzniká již po několika týdnech psychická i fyzická

závislost. [47] Po vysazení benzodiazepinů, zejména náhlém po delším užívání, se mohou objevovat abstinenční příznaky jako neklid, podrážděnost, úzkostnost, nervozita, emoční nestabilita, nespavost, nevolnost, křeče a bolesti.

Při předávkování benzodiazepiny se jako antidotum využívá flumazenil, který účinkuje jako antagonist – váže se na stejné vazebné místo jako benzodiazepiny. Eliminační poločas flumazenilu je rychlý, zhruba 1 hodinu. [41, 42, 48]

Ačkoli jsou benzodiazepiny často používány při suicidálních pokusech [47, 49] nebezpečné jsou většinou až při vysokých dávkách. Intoxikace se projevuje sedací a spánkem, letargií, zhoršenou koordinací, zmateností, běžně ale nedochází k ovlivnění vegetativních center (dechové, regulace krevního tlaku). [41, 47] K život ohrožujícím stavům však často (a mnohdy nezáměrně) dochází v kombinaci s dalšími látkami působícími na nervovou soustavu – s jinými farmaky, drogami nebo alkoholem. [49] Synergistický účinek pak může mít sedativní/hypnotický efekt silnější než aditivní. [42]

Benzodiazepiny jsou také jedny z nejčastěji nadužívaných a zneužívaných léčiv v rozvinutých zemích. [50, 51] Často hrají roli v případech sexuálního napadení (obvykle ve spojení s alkoholem, případně dalšími látkami), kdy jsou benzodiazepiny podány oběti, která se pod jejich účinkem nebrání a mnohdy trpí ztrátou paměti. [52] Pod vlivem benzodiazepinů (a často i dalších látek) byly zaznamenány i četné případy jiné závažné trestné činnosti. [53, 54] Uživatelé jsou při těchto činech často odprázeni od citů a mají vyšší toleranci k násilí.

3.2.3 Mechanismus účinku na molekulární úrovni

Kyselina γ -aminomáselná (GABA) je významným inhibičním neurotransmiterem v centrální nervové soustavě (CNS) obratlovců. Podstatou účinku benzodiazepinů je působení na specifické membránové GABA-receptory, na synapsích nervů, které GABA využívají jako neurotransmiter. GABA ovlivňuje propustnost chloridových kanálů, které se v jeho přítomnosti častěji otevírají, a tak do buňky proniká více chloridových iontů Cl^- . [48] Zvyšuje se membránový potenciál buňky (dochází k hyperpolarizaci). [40, 55] Benzodiazepiny se váží na receptorový protein pro GABA, na část označovanou GABA_A . Navázané benzodiazepiny alostericky zvyšují účinnost

GABA, zesiluje se tak inhibice CNS vyvolaná GABAergním systémem – snižuje se dráždivost cílových buněk. [40, 41]

3.2.4 Farmakokinetika

Benzodiazepiny se po vstřebání váží z 80 % až 97 % na albumin v plazmě. [47] Degradace pro vedoucí látku diazepam je popsána jako inaktivace několika postupnými reakcemi. První reakcí je demethylace CH_3 - skupiny z dusíku v poloze 1, dále je hydroxylován uhlík v poloze 3 (nejpomalejší reakce), následuje konjugace OH- skupiny s kyselinou glukuronovou, ztrácí se biologická aktivita, vzrůstá hydrofilita a látka může být vyloučena. Podobný vícestupňový metabolismus je popsán i pro látky s NO_2 - skupinou na jádře a atomem F- (flunitrazepam). Tetracycklé benzodiazepiny se díky dalšímu N a CH_3 - skupině rychleji hydroxylojí, mají tedy kratší dobu účinku a eliminují se rychleji. [41] Látky jako midazolam, brotizolam nebo triazolam mají eliminační poločas v jednotkách hodin. Některé látky nemusí podléhat vícestupňovým reakcím, aby byly inaktivovány – jsou inaktivovány přímo. Takový metabolismus byl popsán např. u lorazepamu, který se rovnou konjuguje (OH- skupinu již ve své struktuře obsahuje), bromazepam ztrácí biologickou účinnost rozštěpením jádra. Nitrazepam a částečně flunitrazepam ztrácí na účinnosti redukci NO- skupiny na NH_2 - skupinu a následnou acetylací. [42, 48]

Benzodiazepiny lze rozdělit z terapeutického hlediska do tří skupin. První skupinou jsou látky samy o sobě neúčinné, které se až metabolicky přemění na látky bioaktivní, nástup je tedy pomalejší; takto funguje např. chlórdiazepoxid. Druhou skupinu představují látky, které jsou účinné samy o sobě, účinné jsou však i jejich metabolity, které se odbourávají pomaleji, kumulují se a významně ovlivňují charakter účinku – např. diazepam. Třetí skupinou jsou látky, které jsou samy o sobě účinné, ale dochází k metabolické inaktivaci jedinou nebo více rychle po sobě jdoucími reakcemi. Jejich inaktivace je rychlejší než u ostatních benzodiazepinů, účinek se díky chybějícím aktivním metabolitům nekumuluje; př. triazolam, bromazepam, brotizolam, oxazepam nebo midazolam. [42]

3.2.5 Použitá léčiva

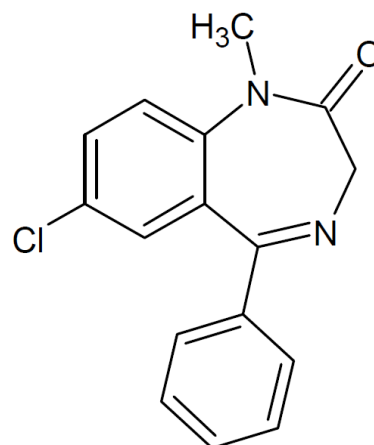
3.2.5.1 Diazepam

Název dle IUPAC: 7-chlor-1-methyl-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on

Diazepam (obr. 3) vykazuje rychlý nástup účinku, zejména při intravenózním podání téměř okamžitý, maximální koncentrace dosahuje za 1 hodinu, koncentrace metabolitů stoupá pomalu.

Hlavním produktem metabolismu diazepamu je desmethyldiazepam, známý také jako nordiazepam nebo nordazepam. Dalšími metabolity diazepamu jsou temazepam a oxazepam. Metabolity jsou konjugovány na glukuronidy a vylučovány zejména močí. [42]

V současné době je na českém trhu k dostání pod obchodním názvem Apaurin ve formě injekčního roztoku, a dále pod názvem Diazepam ve formě injekčního roztoku, k rektálnímu podání a v podobě tablet k perorálnímu podání.



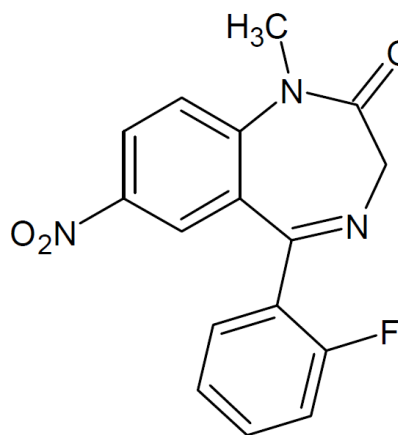
Obrázek 3. Struktura diazepam.

3.2.5.2 Flunitrazepam

Název dle IUPAC: 6-(2-fluorfenyl)-2-methyl-9-nitro-2,5-diazabicyclo[5.4.0]undeka-5,8,10,12-tetraen-3-on

Flunitrazepam (obr. 4) se primárně metabolizuje jako N-demethyl-flunitrazepam a 7-aminoflunitrazepam. Exkrece probíhá z větší části močí v podobě glukuronidů metabolitů, část (asi 10 %) je vylučována se stolicí. [36]

Podobně jako diazepam má rychlý nástup účinku a jeho metabolity se kumulují a odbourávají pomalu, doba účinku je tedy poměrně dlouhá. [48] Oproti diazepamu jsou účinky flunitrazepamu silnější, působí více hypnoticky a centrálně myorelaxačně, avšak



Obrázek 4. Struktura flunitrazepamu.

může se objevit paradoxní reakce – excitace. [56, 57] Při excitaci se uživatelé mohou stávat násilnými a bezcitnými, což může vést ke kriminální činnosti. [53, 57] Často je zneužíván jako rekreační droga, k vytvoření pocitu pohody a zvýšení sebevědomí, a mnohdy bývá kombinován uživateli drog s dalšími látkami. [49] Vzhledem k anterográdní amnézii a hypnotickým účinkům byl v mnoha případech flunitrazepam zneužit k sexuální kriminální činnosti – obtěžování a znásilnění. [48, 58] U flunitrazepamu hrozí relativně vysoké riziko vzniku závislosti. Tyto vedlejší efekty vedly v mnoha státech k zákazu flunitrazepamu.

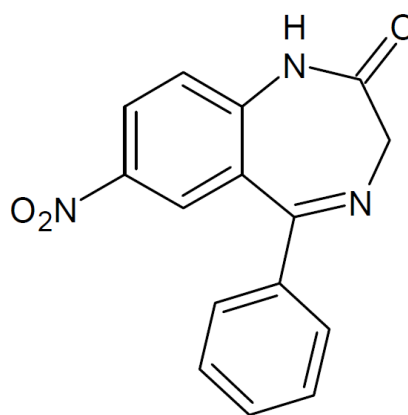
Na našem trhu byl k dostání ve formě tablet Rohypnolu, v současnosti není dostupný.

3.2.5.3 Nitrazepam

Název dle IUPAC: 9-nitro-6-fenyl-2,5-diazabicyklo[5.4.0]undeka-5,8,10,12-tetraen-3-on

Po příjmu nitrazepamu (obr. 5) dochází k rychlé resorpci a nástupu účinku, eliminace je ale pomalá a doba účinku poměrně dlouhá. [42]

Na českém trhu v současnosti není registrován přípravek, který by obsahoval účinnou látku nitrazepam, v minulosti byla tato látka k dostání pod obchodním názvem Nitrazepam ve formě tablet.



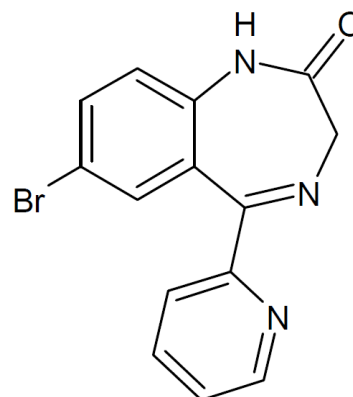
Obrázek 5. Struktura nitrazepamu.

3.2.5.4 Bromazepam

Název dle IUPAC: 7-bromo-5-(pyridin-2-yl)-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-on

Bromazepam (obr. 6) se resorbuje pomaleji, ale jeho metabolity nejsou bioaktivní, proto nedochází ke kumulaci. Je tedy vhodný pro dlouhodobou terapii anxiety. [42]

Bromazepam je v současnosti k dostání pod obchodním názvem Lexaurin ve formě tablet.



Obrázek 6. Struktura bromazepamu.

3.2.5 Ekotoxikologické údaje

Při provádění ekotoxikologických testů byl prokázán vliv diazepamů na nižší organismy. I při koncentracích 0,01 mg/l byl průměrně růst vířníků *Brachionus calyciflorus* inhibován o 58,2 % při použití diazepamů v tabletě, 34,3 % při expozici standardu diazepamů. Při testech s žábřonou *Thamnocephalus platyurus* byla při koncentraci diazepamů získaného z tablety 80 mg/l a vyšší mortalita 100 %, při 20 mg/l již nebyla mortalita zjištěna. V testu s řasou *Desmodesmus subspicatus* byla zjištěna inhibice rychlosti růstu, při nejnižší koncentraci diazepamů z tablety 1,56 mg/l byla rychlost růstu řasy zpomalena průměrně o 26,3 %, tvorba biomasy byla o 38,2 % nižší; při stejné koncentraci při použití diazepamů ze standardu se projevilo naopak urychlení růstu o 3,6 %, a to při snížené tvorbě biomasy o 1,1 %. [59]

U ryby *Danio* byly prokázány při koncentraci diazepamů 273 µg/l změny v cirkadiálním rytmu, pravděpodobně ovlivněním genové exprese, taktéž se projevily změny v plavání embryí této ryby. [60] Bylo prokázáno, že diazepam při koncentraci 10 µg/l snižuje schopnost nezmarů obecných regenerovat. [61]

3.2.6 Množství benzodiazepinů na trhu

V tab. 1 jsou uvedeny látky momentálně dostupné na našem trhu a objem, v jakém byly v 1. čtvrtletí roku 2010 dodány do zdravotnických zařízení a lékáren v ČR a vydávány z lékáren (1620 lékáren, které zaslaly hlášení). [62, 63] Z benzodiazepinů (kromě zopiclonu, který se někdy k benzodiazepinům přiřazuje) vykazovala tato léčiva po alprazolamu nejvyšší čísla. Údaje byly použity z r. 2010, neboť novější informace SÚKL nabízí po skupinách léčiv, ne účinných látkách.

Tabulka 1. Benzodiazepiny na trhu v ČR. (DDD = definovaná denní dávka)

účinná látka	způsob podání	počet distribuovaných balení	počet distribuovaných DDD	počet vydaných balení	počet vydaných balení
diazepam	injekce	18 531	185 310	2 655	26 554

diazepam	perorální podání	212 679	3 450 080	102 220	1 649 421
diazepam	rektální podání	5 006	19 325	1 995	8 005
diazepam celkem	-	236 216	3 654 715	106 870	1 683 980
bromazepam	perorální podání	340 482	2 507 418	171 750	1 276 218

Z přehledu za rok 2015 o dodávkách do zdravotnických zařízení vyplývá, že Lexaurin 3 (účinná látka bromazepam) se umístil jako 42. nejdodávanější léčivo co do počtu balení – bylo dodáno 553 826 balení, což odpovídá necelým 5 milionům DDD. [9]

Skupina léčiv N (dělení ACT), látky ovlivňující nervový systém, kam se řadí i benzodiazepiny, byla v roce 2015 se 46,9 miliony balení druhou nejdodávanější skupinou léčiv do zdravotnických zařízení, a zároveň i druhou nejvydávanější skupinou s 20,5 miliony vydaných balení. [64]

V roce 2006 bylo ve Švédsku prodáno 10,4 milionů DDD flunitrazepamu. Oxazepam je prodáván také jako samostatné léčivo, jen v roce 2006 ve Švédsku bylo prodáno 12,8 milionů DDD oxazepamu. V roce 2006 bylo ve Švédsku prodáno 17,3 milionů DDD diazepam. V USA byl diazepam letech 1969-1982 vůbec nejprodávanější léčivo. [36]

3.3 Fytoremediace

Fytoremediace představují sanační technologie, v níž je za pomoci zelených rostlin a jejich symbiotických organismů z životního prostředí odstraňována kontaminace. Fytoremediacemi mohou být sanovány substráty kontaminované organickými látkami – ropnými produkty, halogenovanými sloučeninami, surfaktanty, pesticidy, výbušninami; i anorganickými látkami jako těžkými kovy nebo radionuklidy. [65] Tuto technologii je možné využít k odstraňování kontaminantů z různých složek životního prostředí – půdy, sedimentu, povrchových vod, ale i ze vzduchu. [66]

Fytoremediace je závislá na mnoha faktorech – na charakteru kontaminantu (fyzikálně-chemické vlastnosti jako rozpustnost ve vodě, Henryho konstanta, molární hmotnosti i rozdělovacím koeficientu oktanol-voda), na charakteru rostliny (typ kořenového systému, enzymatický aparát), a i na charakteristice okolního prostředí, které může být v reálných podmínkách různých stanovišť velice odlišné (klima, pH vody a půdního roztoku, vlastnosti půdy). [67]

Velmi polární látky obtížně přecházejí přes membrány, a proto jsou špatně přijímány, naproti tomu velmi lipofilní látky přes membrány přechází rychle, ale rychle se ukládají v kořenech a jejich translokace do nadzemních částí je omezená. Z hlediska fytoremediací se jako nejvhodnější jeví látky střední lipofility. [68]

3.3.1 Přednosti a limity fytoremediace

Kromě samotného odstranění kontaminantu mají fytoremediace řadu výhod. Probíhají pasivně bez významnějších zásahů člověka, využívají solární energie. Při aplikaci *in situ* není třeba kontaminovanou složku převážet – šetří se zdroje i finance. Fytoremediace jsou kombinovatelné s dalšími metodami, účinné a ekonomicky výhodné, zejména v případě kontaminantů, které se vyskytují ve stopovém množství. Některé zdroje uvádějí jen 10-20% nákladů na mechanické čištění. [67] Veřejností jsou fytoremediační techniky vnímané jako „zelené“ technologie a jsou tedy dobře přijímané.

Naopak, při neuváženém použití může dojít i ke zvýšení škod na ŽP kvůli zvýšené migraci polutantů, zpřístupnění toxických látek může představovat riziko pro jiné

organismy. Pro bezpečné využití této technologie je tedy třeba znát metabolické pochody rostlin. Biologická podstata fytořemediace limituje možnost využít je vždy a všude kvůli klimatickým a sezónním podmínkám. Pokud kontaminant není v biologicky dostupné formě (a není znám bezpečný způsob, jak jej do ní převést), nebude probíhat ani jeho příjem. Ačkoli jsou fytořemediace oblastí, která vyvolává zájem, není zatím znám dostatek rostlin, které by byly schopné dostatečně efektivní fytoextrakce.

3.3.2 Základní mechanismy metabolismu rostlin

Metabolismus rostlin lze rozdělit do tří fází: transformace, konjugace, kompartmentace. V transformaci se zvyšuje polarita sloučeniny např. zaváděním funkčních skupin, v konjugaci je dále hydrofilita zvyšována konjugací s cukry, glukuronátem nebo glutathionem. Kompartmentace je typická pro rostlinné buňky a rozpustné kontaminanty se ukládají do vakuol, nerozpustné do buněčné stěny, těkavé jsou procesem fytovolatilizace vydýchány do okolního prostředí.

3.3.3 Metody fytořemediace

Rostliny musí být z hlediska možností využití ve fytořemediačních technikách posuzovány v několika faktorech: tvorba biomasy (ať už kořenového systému nebo nadzemní části) za relativně krátký čas, odolnost vůči stresu z podmínek prostředí i vůči vysokým koncentracím kontaminantu, nároky na údržbu, sklizeň atd.

Mechanismů, jimiž rostliny a jejich symbionti přispívají k remediaci kontaminovaného prostředí, je celá řada, a často nedochází k jedinému procesu.

3.3.3.1 Fytoextrakce, fytoakumulace

Fytoextrakce využívá potenciálu rostlin extrahovat kontaminant ze substrátu kořenovým systémem a případně jej transportovat i do nadzemních částí rostliny. [69] Fytoakumulace nastává, není-li látka rostlinou plně degradována, dochází k depozici kontaminantu v pletivech rostliny a tím nabohacení oproti okolnímu prostředí. Zejména je-li kontaminant translokován v nadzemních částech rostliny, je možné snadno kontaminované části sklízet a tak oblast sanovat.

Jako hyperakumulátory jsou označovány rostliny, které dokáží akumulovat více než 0,1 % kontaminantu hmotnosti své sušiny (pro některé prvky je tato hranice jiná – Cd 0,01%, Fe – 1%). [67] Nejvíce druhů hyperakumulujících kovů je známo pro nikl, měď, kobalt, olovo a zinek. Celkově je hyperakumulace schopno pouze 0,2 % krytosemenných rostlin. [70] Toleranci k vysokým koncentracím kovů u vyšších rostlin ovlivňuje jeden nebo jen několik málo genů [71], což je možné využít při designování transgenních organismů.

Yang rozděluje základní mechanismy hyperakumulace těžkých kovů do několika kroků. Nejprve je zvýšena biologická dostupnost kovů díky činnosti rhizosferních mikroorganismů. [70] Poté nastává zvýšený příjem kovů přenašeči kovů v plazmatických membránách. Následně je u kovů snížena toxicita vazbou na buněčné stěny a chelataci s různými ligandy v cytoplazmě (př. fytochelatiny, metalothioneiny). Následuje přenos přes tonoplast a depozice kovů ve vakuolách buněk, nebo hromadění v určitých tkáních, př. trichomech, mezofylu. Hyperakumulátory tvoří jen málo biomasy, proto jsou šlechtěny a geneticky modifikovány. [72]

Fytomining je technika, při níž je za pomoci rostlin „těžena“ látka, typicky kov. Využívá se bioakumulace látky v nadzemních pletivech rostliny, která se následně sklídí a řízeně spálí. Výhodou je, že oproti jiným rudám rostlinný materiál neobsahuje tolik sirných sloučenin [73] Fytomining je možné použít na dotěžování v momentě, kdy se jinými způsoby nevyplatí kov dobývat.

3.3.3.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace snižuje mobilitu kontaminantů a tak zabraňuje jejich další migraci v prostředí díky adsorpci, absorpci, komplexaci či precipitaci kontaminantu. [73] K tomuto účelu jsou používány rostliny se svazčnými kořeny jako například traviny. [65] Tato technika je užitečná v několika případech. Pomáhá udržet vegetační pokryv na místech, kde by jiné rostliny nedokázaly čelit kontaminantu, a zabránit tak erozi. Zabraňuje speciaci kovů v půdě a migraci kovů i dalších kontaminantů do povrchových a podzemních vod. Díky stabilizaci tato metoda redukuje možnost expozice půdních (a následně dalších) organismů. Je možné použít ji i pro dočišťování jinak ošetřených ploch. [70, 73]

3.3.3.3 Rhizodegradace

Rhizodegradační děje nastávají v interakci rostliny s jejími symbiotickými mikroorganismy (bakteriemi, houbami, prvoky) v rhizosféře. Rostlina ovlivňuje prostředí ve prospěch symbiontů jednak vypouštěním chemických látek (produkty metabolismu mohou sloužit pro symbionty jako zdroj dusíku a fosforu, alelopatické látky znemožňují růst jiných organismů), jednak symbionty podporuje provzdušňováním půdy. [67]

3.3.3.4 Fytodegradace

Při fytodegradaci (fytotransformaci) podléhají přijaté kontaminanty nejrůznějším metabolickým procesům a enzymatickým reakcím, např. za účasti nitroreductas, mono- a dioxygenas, peroxydas, peroxygenas, karboxylesteras nebo dehalogenas [65, 74] Takto mohou být kontaminanty degradovány až na základní sloučeniny jako oxidu uhličitý, amoniak nebo vodu.

3.3.3.5 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace jsou schopny těkavé látky, ať se jedná o kontaminant nebo jeho metabolit. Po přijetí a případné transformaci kontaminantu dochází k unášení těkavé látky s transpiračním proudem do atmosféry. Z toho důvodu fytovolatilizace není často používanou metodou, přesun do jiné složky ŽP nemusí představovat ideální řešení.

3.3.3.6 Rhizofiltrace

Tato technika využívá jako cíl kontaminantu kořeny rostlin, kontaminant na jejich povrchu precipituje nebo se absorbuje v kořenech. Tímto způsobem je možné čistit různé typy vod. [73]

3.3.4 Metody aplikace fytořemediace

Při fytořemediacích *in situ* se kontaminovaný materiál netransportuje, ale je čištěn přímo na místě, což přináší ekonomické výhody. [67, 70] Takto je možné čistit kontaminovanou povrchovou vodu, půdu nebo sediment, či podpovrchovou vodu, která je přes půdu dosažitelná kořeny rostlin. Přístup *in vivo* ve fytořemediacích se používá, pokud je kontaminant nedostupný pro rostliny. Kontaminovaný materiál je vytěžen,

transportován na vhodné místo, kde je podroben fytořemediaci a následně je vrácen na původní místo. Při *in vitro* fytořemediacích nejsou používány celé rostliny, pouze jejich produkty, př. enzymy. Velkou předností této aplikace je rychlost, s jakou může být kontaminant odstraněn. [67]

3.3.5 Studie fytořemediace farmak

Fytořemediace je možné použít k odstraňování nejrůznějších látek, tedy i léčiv. V posledních letech byla provedena řada experimentů, které zkoumaly potenciál různých druhů rostlin v příjmu mnoha odlišných farmak, a také efekty, které farmaka na tyto rostliny měla.

Allam a spol. testovali fytořemediační potenciál vodní rostliny okřehku. V testech byl použit acetaminofen (paracetamol), diklofenak a progesteron v počátečních koncentracích 1-1000 $\mu\text{g/l}$. Po 10 dnech bylo v závislosti na počáteční koncentraci rostlinami odebráno 66-92 % acetaminofenu, 48-84% diklofenaku, 67-98% progesteronu. [75]

V české studii byl studován vliv acetaminofenu, diklofenaku a ibuprofenu na len setý, křen selský v *in vitro* testech. Z počáteční koncentrace 0,6 mM a 1,2 mM byl acetaminofen křenem selským zcela extrahován, lnem setým pak méně než z 50 % z koncentrace 0,2 mM. Len setý se však ukázal mnohem účinnějším v extrakci ibuprofenu, kdy bylo veškeré léčivo extrahováno z 0,2 mM roztoku za jediný den, diklofenak byl zcela odstraněn během 6 dní. Účinnost extrakce ibuprofenu křenem se lišila dle výchozí koncentrace (40 % a 94 % pro 1,2 mM a 0,6 mM roztoky), diklofenak byl křenem extrahován při obou koncentracích stejně z 60-70 %. V experimentech s hydroponicky pěstovanými rostlinami byly testovány lupina žlutá, ječmen setý a rákos. Účinnost extrakce léčiv se lišila podle druhu rostlin, léčiva i podané koncentrace. Acetaminofen byl lupinou extrahován zcela, ječmenem z 42-83 %, rákosem jen z 16 %. Ibuprofen srovnatelně extrahovaly rákos i ječmen (60 %, resp. 58%), lupina se ukázala jako neperspektivní (max. 11 %). Lupinou nebyl prakticky vůbec extrahován ani diklofenak (max. 7%), nejúčinnější se v odstraňování diklofenaku z vybraných rostlin projevil ječmen (43%) [76]

V testech s orobincem byl potvrzen příjem diklofenaku, jeho přítomnost v kořenech i prýtu a jeho metabolizace rostlinou. [77]

V jiných testech s orobincem byl testován příjem karbamazepinu z roztoků o koncentraci 0,5-2 mg/l. Po 21 dnech dokázaly rostliny odstranit 82 % léčiva z roztoku o koncentraci 0,5 mg/l a 56 % z roztoku o koncentraci 2 mg/l. [78]

Fytoremediační potenciál orobince byl testován také vzhledem ke kyselině klofibrové. Za 21 dní testů rostliny odstranily z roztoku o koncentraci 20 µg/l maximálně 80 % kyseliny klofibrové, z čehož více než 50 % během prvních dvou dnů. [79]

Sedmidenní experimenty se skřípinou velkou ukázaly účinnost příjmu rostlinou téměř ze 100% při expozici kofeinu v koncentraci 0,5 mg/l, více než 80% bylo extrahováno v prvních třech dnech. Karbamazepin byl v těchto testech extrahován v 54-64 % a kyselina klofibrová v 41-73 %, naproxen více než 50% (zároveň podléhal fotodegradaci v 30-42 %). Diklofenak podlehl z větší části fotodegradaci (více než 70 %) a menší část byla extrahována rostlinami. [80]

Při *in vitro* testech s kulturou topolu černého byla zjištěna velká odolnost této rostliny i vůči vysokým koncentracím ibuprofenu v médiu. Léčivo bylo během testů kompletně odstraněno z média, při koncentracích 0,03 mg/l a 3 mg/l léčiva nedocházelo k inhibici růstu a při 30 mg/l došlo dokonce k iniciaci růstu buněk. [81]

V experimenty s květákem, brukví sítinovitou, řepou a rýží byla prokázána volatilizace sloučenin selenu (SeMeth, SeO₃, SeO₄). [82]

3.3.6 Umělé mokřady

Jednu z možností, jak uvést fytořediační techniky do praxe, představují umělé mokřady, člověkem zbudované systémy určené k sanaci odpadních vod, v nichž kromě rostlin hrají hlavní úlohu také substrát a mikroorganismy. Z rostlin jsou vysazovány orobinec, rákos, chrastice, ostřice či sítina a další. V mnoha případech byla účinnost odstranění farmak pomocí umělých mokřadů vyšší než v klasických čistírnách. [83] Například při testech v Dánsku byla zjištěna účinnost odstranění farmak až 84 % (průměrně 20 %), tento systém tedy představuje perspektivní řešení. [84]

3.3.7 Význam studia fytořediačních procesů

Je třeba mít na paměti, že stejné procesy probíhají v přírodě i bez zásahů a záměrů člověka. Poznání těchto dějů může přispět nejen k záměrnému efektivnímu použití při odstraňování kontaminantů z ŽP, ale i k vyhnutí se neuváženému ponechání přírodních procesům či jejich nevhodnému vyžití, které by v daném případě mohlo problém ještě zhoršit. Například při nevhodné sanaci, kdy je kontaminovaný materiál uložen do určité hloubky pod povrch a překryt zeminou, ale kořeny vysázených rostlin (stromů) zasahují až do kontaminované oblasti, „vytahují“ kontaminaci zpět na povrch. Dalším příkladem je použití čistírenských kalů jako zdroje živin při hnojení polí, kdy dochází ke zpětné kontaminaci potravního řetězce. Je nezbytné tedy poznat děje a procesy, které probíhají v rostlinách (a jiných úrovních ekosystému) a ovlivňují samotné kontaminanty, stejně tak jako poznání, jak kontaminanty ovlivňují organismy. V případě kulturních rostlin je výsledkem i zjištění, zda daný druh dokáže akumulovat kontaminanty a dává tak možnost posoudit reálnost pěstování na kontaminovaných plochách.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, přístrojové vybavení a biologický materiál

Chemikálie

Ke sterilizaci semen kukuřice bylo použito SAVO (chlornan sodný, Unilever), ke sterilizaci semen, nástrojů a laminárního boxu ethanol (Lach-Ner). Pro přípravu média MS (médium podle Murashigea a Skooga), byly použity chemikálie uvedené v tab. 2 (čistota p.a., Lach-Ner), média byla obohacena o sacharózu a myo-inositol (čistota >99%, Sigma-Aldrich). K úpravě pH médií byly použity roztoky KOH (Lach-Ner) a H₃PO₄ (Sigma-Aldrich).

Tabulka 2. Složení média podle Murashiga a Skooga. [85]

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

Pro přípravu mobilních fází byly použity následující chemikálie:
destilovaná voda, připravovaná na přístroji DEMIWA 3 roi (WATEK)
methanol (kvalita pro HPLC, J.T.Baker)
acetonitril (kvalita pro HPLC, Fisher Scientific)
kyselina trihydrogenfosforečná (Sigma-Aldrich)
triethylamin (Sigma-Aldrich)

Přístrojové vybavení

Pro udržení sterilních podmínek probíhala manipulace s rostlinami (sterilizace semen, sázení, obohacování média o léčiva, přidávání média rostlinám, provádění odběrů) v laminárním boxu s vertikálním prouděním vzduchu LABOX FBB120 (Labox ČR). Média, voda a nástroje byly sterilizovány v tlakovém hrnci (Morphy Richards). Pomocí pH metru ISFET IQ125 bylo nastavováno pH za míchání na magnetické míchače WiseStir MSH-20D (Wisd Laboratory Instruments). Vážení chemikálií a rostlin probíhalo na analytických vahách Adam AFA-180 LC a předvážkách Adam Aqt-600. Sonikace mobilních fází před napuštěním do HPLC a sonikace při rozpouštění tablet byla prováděna na ultrazvuku FB 15050 (Fisherbrand). Centrifugace zásobních roztoků léčiv a vzorků před analýzou probíhala na centrifuze EBA 21 (Hettich Zentrifugen) a Spectrafuge 16M (Labnet).

Chromatografické analýzy vzorků byly prováděny na přístroji firmy SHIMADZU, modelu CMB-20A – čerpadlo LC-20AD, detektor SPD-M20A. Separace byla prováděna na koloně Eclipse XDB C-18, 4,6 x 150 mm, 3,5 μm (Agilent) s předkolonou C-18 (Watrex).

Data byla zaznamenávána a vyhodnocována programem Clarity, verze 2.6.6.574.

Biologický materiál

K experimentům byl využit kultivar DKC 4014 kukuřice seté (*Zea mays*) od firmy Monsanto ČR. Tyto rostliny byly zvoleny z důvodu snadné kultivace celých rostlin v in vitro hydroponickém uspořádání. Kukuřice je zároveň kulturní plodinou, její použití je

tedy spojeno také s otázkami zpětné kontaminace potravního řetězce při zavlažování kontaminovanou vodou.

4.2 Standardy léčiv

Benzodiazepiny se řadí mezi kontrolovaná léčiva, jejich dostupnost tedy představovalo limitní faktor, zejména v případě flunitrazepamu a nitrazepamu, které v době experimentů nebyly na trhu dostupné. Účinné látky byly z tablet získány homogenizací tablety drcením, sonikací v rozpouštědle (vybraném s ohledem na specifickou rozpustnost léčiva) a odebráním supernatantu po centrifugaci. V tab. 3 je uveden původ léčiv a rozpouštědla, v nichž byla provedena extrakce účinné látky.

Tabulka 3. Původ získaných léčiv.

Účinná látka	Komerční název přípravku	Léková forma	Výrobce	Síla	Rozpouštědlo
diazepam	Apaurin	injekční roztok	KRKA	5 mg/ml	injekční roztok
flunitrazepam	Rohypnol	tableta	Léčiva, n.p. Praha	1 mg/tableta	EtOH:H ₂ O 1:1 (V/V)
nitrazepam	Nitrazepam	tableta	Slovakofarma n.p. Hlohovec	5 mg/tableta	MeOH
bromazepam	Lexaurin	tableta	KRKA	3 mg/tableta	MeOH

4.3 Příprava *in vitro* kultur rostlin

Příprava médií

K experimentům bylo připraveno médium dle Murashiga a Skooga (MS), jehož složení je uvedeno v tab. 2.

Toto médium bylo ještě doplněno o cukerné složky: myo-inositol (100 mg/l) a sacharózu (30g/l). Za stálého míchání bylo pH médií upraveno na hodnotu 5,8 pomocí roztoků KOH a H₃PO₄. Poté bylo médium rozděleno 1) do Erlenmeyerových 500 ml

baněk po 15 ml – tyto baňky sloužily k sázení a kultivaci rostlin po dobu celého experimentu, 2) do menších Erlenmeyerových baněk po 100 ml – médium z těchto baněk bylo použito k přidávání léčiv. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány po dobu 30 min v tlakovém hrnci.

Příprava rostlinných kultur

Semena kukuřice byla po dobu 30 s odmašťována v 70% ethanolu. Poté byla ponořena do roztoku chlornanu sodného (20% roztok SAVA) na 10 minut, dále do méně koncentrovaného roztoku chlornanu sodného (10% roztok SAVA) na 20 minut. Po trojnásobném promytí sterilní destilovanou vodou byla semena přenesena po 5 do sterilní 500 ml Erlenmeyerovy baňky s živným médiem MS a baňka byla uzavřena sterilní alobalovou fólií (obr. 7). Následně byly rostliny ponechány kultivaci v kultivační místnosti se stálou teplotou 24°C. Světelný režim (18 hodin světlo a 6 hodin tma) byl zajištěn zářivkovými trubnicemi ve vzdálenosti 40 cm (Cool White, 36 W/m²). Rostliny byly takto do přidání léčiva kultivovány 3 týdny. Za stejných podmínek byly rostliny kultivovány i mezi odběry až do ukončení experimentu.



Obrázek 7. Ukázka nasazených semen kukuřice seté (*Zea mays*) na sterilním médiu.

Veškerá manipulace s rostlinami od sázení po ukončení experimentu byla prováděna v laminárním boxu, ve kterém je udržováno sterilní prostředí. Pomůcky (jehly k odběru, pinzety pro manipulaci s rostlinami) byly před jednotlivými odběry sterilizovány v tlakovém hrnci a v průběhu práce ukládány do čistého



Obrázek 8. Ukázka rostliny vyřazené z experimentu (infekce plísněmi). →

ethanolu. Pinzety, jehly, alobal uzavírající hrdla baněk i samotná hrdla baněk byly při každé manipulaci s nimi opalovány nad kahanem. I přes tato opatření byly některé rostliny infikovány zejména různými druhy plísní (obr. 8) a nezařazeny do experimentů.

4.4 Průběh fytoextrakce léčiv

Po třech týdnech kultivace rostlin bylo za sterilních podmínek z kultivačních baněk odstraněno stávající médium použité při sázení a k rostlinám bylo přidáno 100 ml nového sterilního živného média (MS) s přidaným léčivem. Koncentrace roztoků jednotlivých léčiv v médiích a počet rostlin zařazených do experimentů je uveden v tab. 4. Současně byla pro každé léčivo provedena kontrola bez rostliny. Bezprostředně po přidání obohaceného média rostlinám byl proveden první odběr, další odběry byly prováděny po 24 hodinách. Vzorke byly do analýzy uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

Tabulka 4. Výchozí koncentrace jednotlivých léčiv v médiu a počet pokusných rostlin.

Přidávané léčivo	Výchozí koncentrace v médiu	Počet rostlin v experimentu
diazepam	5 mg/l	4
	10 mg/l	4

flunitrazepam	5 mg/l	2
nitrazepam	10 mg/l	6
bromazepam	10 mg/l	9

Experimenty byly ukončeny v závislosti na kondici rostlin. Po provedení posledního odběru byly rostliny vyjmuty z baněk, osušeny a zváženy, aby bylo možné porovnat účinnost fytoextrakce vzhledem k biomase rostliny.

4.5 Měření koncentrace léčiv pomocí HPLC/UV

Mobilní fáze

Pro jednotlivá léčiva se v dostupných zdrojích nepodařilo nalézt přesné složení mobilních fází, které by odpovídalo přístrojovému vybavení laboratoře, a zároveň na tomto v případě shody podávaly uspokojivé výsledky. Byly proto experimentálně nalezeny originální mobilní fáze, jejichž složení je ve vztahu k jednotlivým léčivům uvedeno v tab. 5:

Tabulka 5. Složení mobilních fází pro stanovované látky.

Stanovovaná látka	methanol [ml]	acetonitril [ml]	voda [ml]	H ₃ PO ₄ [ml]	TEA
diazepam	700	-	300	-	1
flunitrazepam	575	100	325	1	-
nitrazepam	150	200	650	1	-
bromazepam	575	100	325	1	-

Podmínky detekce

Podmínky pro stanovení jednotlivých léčiv se lišily v závislosti na testované látce, stručný přehled je uveden v tab. 6.

Tabulka 6. Podmínky stanovení jednotlivých léčiv pomocí HPLC/UV.

Stanovovaná látka	Průtok [ml/min]	Vlnová délka [nm]
diazepam	1	254
flunitrazepam	0,5	253
nitrazepam	1	253
bromazepam	0,5	253

Kalibrační roztoky

Ze zásobních roztoků byly připraveny roztoky o přesných koncentracích a byla změřena data pro konstrukci kalibrační závislosti. U jednotlivých léčiv bylo zvoleno toto rozpětí koncentrací kalibračních roztoků: diazepam 1-20 mg/l, flunitrazepam 1-10 mg/l, nitrazepam 1-15 mg/l, bromazepam 1-12,5 mg/l.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

V tab. 7 jsou uvedeny pro daná léčiva meze detekce (LOD – limit of detection), vypočítané jako trojnásobek šumu základní linie, a meze stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) vypočítané jako desetinásobek šumu základní linie.

Tabulka 7. Mez detekce a mez stanovitelnosti stanovovaných látek.

Stanovovaná látka	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
diazepam	0,01	0,04
flunitrazepam	0,01	0,02
nitrazepam	0,02	0,06
bromazepam	0,01	0,04

Ověření pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

Vzhledem k absencím komerčních standardů látek byla přítomnost léčiva extrahovaného z léku ověřena pomocí MS, viz Příloha 1. Testy pomocí MS byly provedeny také z reálných vzorků (Příloha 2).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Je zřejmé, že při práci s biologickým materiálem je třeba počítat s většími individuálními odchylkami než při práci s neživým materiálem. Rostliny i při stejných kultivačních podmínkách a stejném zacházení vzházejí různě a narostou i do různé biomasy; jsou v různé kondici – ke konci testování již některé začaly zahnívat, což indikovalo ukončení experimentů. Řada dějů odehrávajících se při fytoextrakci zatím není známa nebo existují jen předpoklady. V některých případech může být například při provedení prvního odběru po přidání média s léčivem koncentrace léčiva nižší, než je v následujícím odběru. Jako pravděpodobné se jeví vysvětlení, že dochází k sorpci léčiva na kořeny, a postupně se léčivo zpět uvolňuje do média a je ustavována sorpční rovnováha mezi povrchem kořenů rostlin a kontaminovaným médiem.

Jako žádoucí se tedy jeví sledovat trend, zda se koncentrace daného léčiva v médiu snižuje, je tedy vázána rostlinou (ať už sorpcí na kořeny či fytoakumulací uvnitř kořenů nebo translokací do nadzemních částí rostliny).

5.1 Diazepam

Pro experiment s diazepamem bylo použito 8 rostlin (4 rostliny pro koncentraci 5 mg/l, 4 rostliny pro koncentraci 10 mg/l), z jejichž média bylo odebráno celkem 7 odběrů v průběhu 7 dnů.

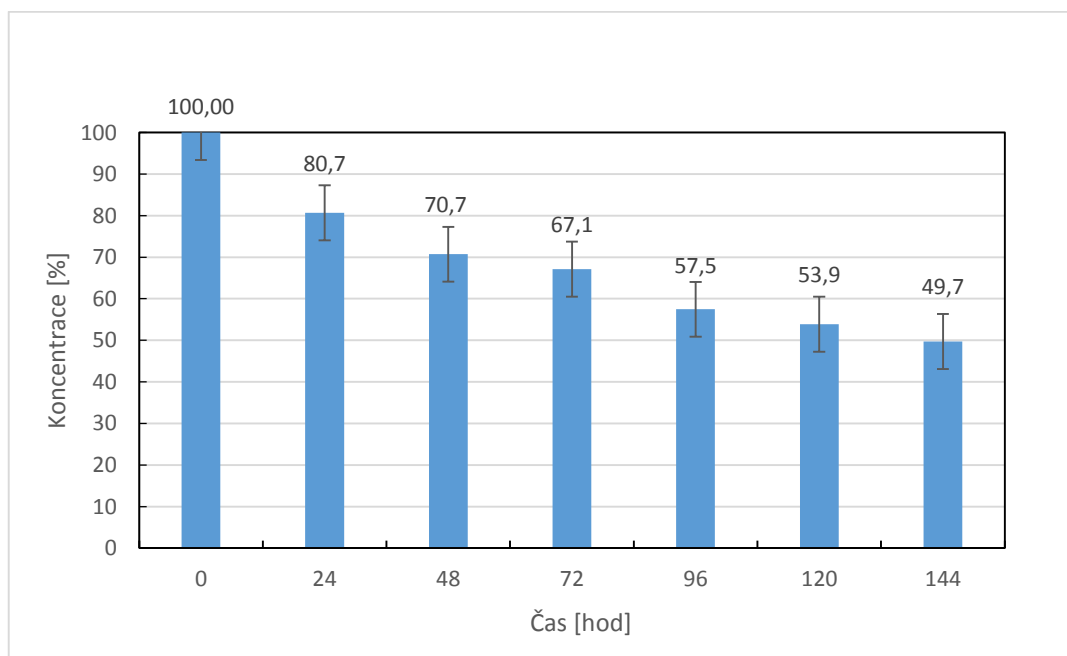
V tab. 8 je uvedena procentuální hodnota koncentrace diazepamu vzhledem k naměřené koncentraci při prvním odběru (c_1 je tedy 100%). Výsledky jsou uváděny v procentech, aby byly hodnoty mezi sebou porovnatelné. Sloupce představují koncentraci diazepamu v médiu při daném odběru (první odběr byl proveden po přidání média s diazepamem, další odběry byly prováděny po 24 hodinách). Skutečná koncentrace léčiva v médiu při prvním odběru byla nalezena do 5 mg/l pro první část experimentu se vstupní koncentrací 5 mg/l, do 10 mg/l v druhé části experimentu se vstupní koncentrací 10 mg/l. Vzhledem k metodice, kdy se první odběr provádí po přidání obohaceného média rostlině, nelze v prvním odběru očekávat stejné hodnoty

koncentrací pro všechny rostliny, protože dochází k částečné sorpci léčiva na povrch kořenů.

Tabulka 8. Koncentrace diazepamu v médiu při jednotlivých odběrech.

Rostlina	c ₁ [%] (0 hod)	c ₂ [%] (24 hod)	c ₃ [%] (48 hod)	c ₄ [%] (72 hod)	c ₅ [%] (96 hod)	c ₆ [%] (120 hod)	c ₇ [%] (144 hod)
1	100,0	57,6	55,3	54,8	50,0	45,6	37,8
2	100,0	80,7	70,7	67,1	57,5	53,9	49,7
3	100,0	54,6	51,7	47,7	44,6	41,4	38,5
4	100,0	71,2	55,6	56,0	50,2	46,5	40,7
5	100,0	68,8	60,4	60,0	54,1	60,3	52,8
6	100,0	46,7	34,1	56,5	44,8	61,0	37,6
7	100,0	46,9	81,7	73,9	57,0	48,5	49,3
8	100,0	30,9	79,9	65,0	49,8	43,2	52,0

Následující graf (obr. 9) znázorňuje nejpravidelnější pokles koncentrace diazepamu v médiu (vzhledem k počáteční koncentraci), který nastal u rostliny č. 2.

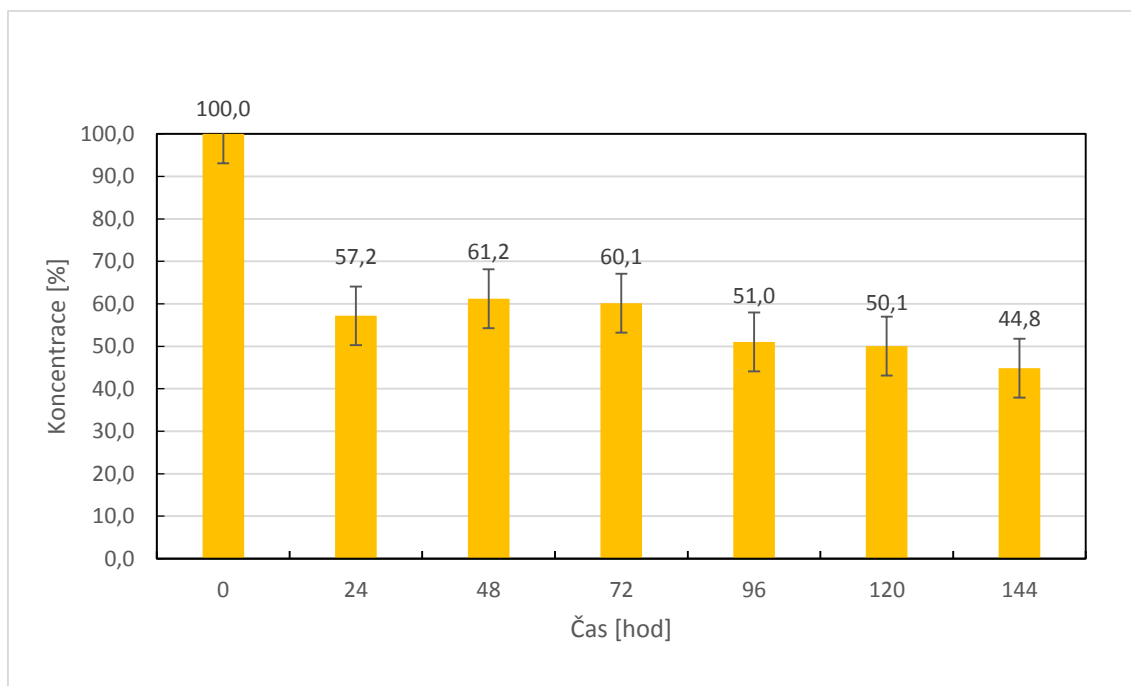


Obrázek 9. Koncentrace diazepamu v médiu rostliny 2 při jednotlivých odběrech.

Chybové úsečky představují standardní chybu.

Na obr. 10 je znázorněna průměrná koncentrace diazepamu v médiu vypočítaná jako aritmetický průměr z koncentrace diazepamu v médiu všech rostlin při daném odběru. Z grafu není možné odvodit lineární, exponenciální nebo jinou tendenci, je však patrné, že rostliny diazepam z média vychytávají a jeho koncentrace se v médiu snižuje. V klesající tendenci koncentrace představuje výjimku druhý odběr, kde mohla nastat významná sorpce na kořeny, která se často projevuje i u jiných látek. Látka rychle adsorbovaná na kořeny se v průběhu dalších hodin uvolňuje z povrchu kořenů a postupně se koncentrace na kořenech a v médiu dostávají do rovnováhy. Protože zároveň probíhají fytoextrakční děje, je výsledný charakter úbytku (a někdy i přírůstků koncentrace v médiu) superpozicí několika procesů a není jednoduše matematicky popsatelný. I přes tendenci rostlin diazepam vázat, po 7 dnech testů diazepam v médiu zůstal v řádu desítek procent, průměrně 44,8 % (rozpětí mezi jednotlivými rostlinami 37,8 % - 52,8 %, viz tab. 8).

Ve vzorku kontroly nebyl zaznamenán pokles léčiva v médiu.



Obrázek 10. Průměrná koncentrace diazepamu v médiu při jednotlivých odběrech. Chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

V Tabulka 9 je vyjádřen úbytek koncentrace vypočítaný jako rozdíl změřené koncentrace první a poslední den testů. Díky známé hmotnosti rostlin bylo vypočítáno množství léčiva, které jednotlivé rostliny odebraly na 1 g své hmotnosti.

Tabulka 9. Účinnost fytoextrakce diazepamu ve vztahu k biomase rostliny.

Rostlina	Úbytek koncentrace [mg/l]	Úbytek ve 100 ml média [mg]	Hmotnost rostliny [g]	Spotřebované léčivo na 1 gram rostliny [mg]
1	2,70	0,270	22,1	0,01
2	1,82	0,182	26,4	0,01
3	3,21	0,321	16,7	0,02
4	1,44	0,144	21,1	0,01
5	4,45	0,445	22,0	0,02
6	8,94	0,894	16,1	0,06
7	5,35	0,535	18,0	0,03
8	4,96	0,496	23,4	0,02

Průměrná hodnota (aritmetický průměr) extrahovaného diazepamu na 1 g rostliny činila 0,02 mg (viz též tab. 16 a obr. 15).

5.2 Flunitrazepam

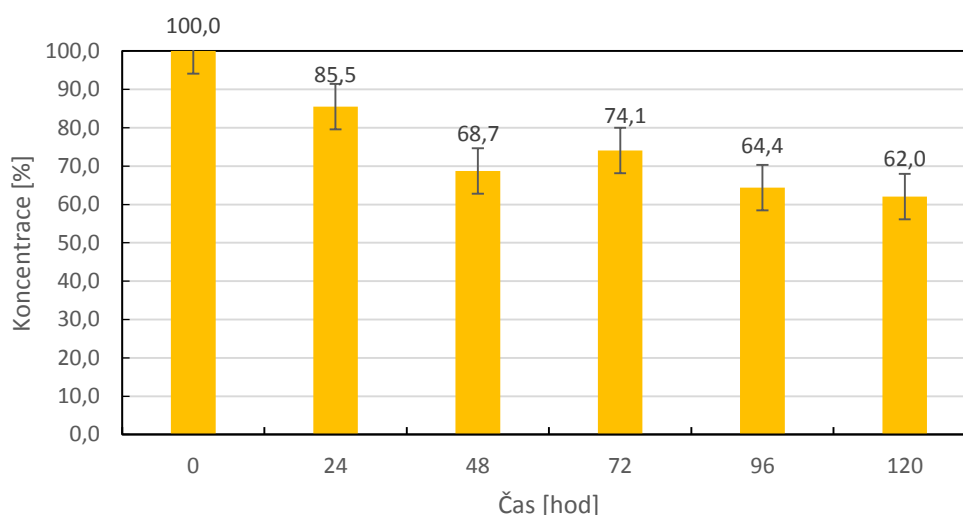
Z důvodu obtížné dostupnosti Rohypnolu jako léčivého přípravku obsahujícího flunitrazepam, byly k experimentu použity pouze 2 rostliny vsazené do média s výchozí koncentrací 5 mg/l léčiva, experiment probíhal 6 dní. 1. odběr (c_1) byl proveden bezprostředně po přidání média obohaceného o flunitrazepam, další odběry probíhaly po 24 hodinách.

Koncentrace léčiva v médiu je v tab. 10 vyjádřena v procentech vůči hodnotě naměřené při prvním odběru (c_1). Skutečná koncentrace flunitrazepam v médiu při prvním odběru se pohybovala v rozpětí 3,49-3,77 mg/l.

Tabulka 10. Koncentrace flunitrazepamu v médiu při jednotlivých odběrech.

Rostlina	c ₁ [%] (0 hod)	c ₂ [%] (24 hod)	c ₃ [%] (48 hod)	c ₄ [%] (72 hod)	c ₅ [%] (96 hod)	c ₆ [%] (120 hod)
1	100,0	92,9	57,2	71,0	65,3	62,9
2	100,0	78,2	80,2	77,2	63,4	61,2

Na obr. 11 je graficky znázorněna průměrná koncentrace flunitrazepamu v médiu vypočítaná jako hodnota aritmetického průměru z koncentrace médií jednotlivých rostlin.



Obrázek 11. Průměrná koncentrace flunitrazepamu v médiu při jednotlivých odběrech.

Chybové úsečky představují standardní chybu.

Rostliny nejeví přílišné tendence flunitrazepam extrahovat, i po 6 dnech testování byla koncentrace v médiích obou rostlin vyšší než 61 %. Úbytek není možno označit za lineární, přesto je patrný trend extrakce léčiva z média (až na nepravidelnost trendu při 4. odběru). Ve vzorku kontroly zaznamenán pokles léčiva v médiu nebyl.

Tab. 11 uvádí zaznamenaný úbytek koncentrace flunitrazepamu v médiích (rozdíl v koncentracích mezi prvním a posledním odběrem). Ze známé hmotnosti rostlin bylo vypočítáno, jaké množství léčiva navázaly rostliny na 1 g své biomasy.

Tabulka 11. Účinnost fytoextrakce flunitrazepamu ve vztahu k biomase rostliny.

Rostlina	Úbytek koncentrace [mg/l]	Úbytek ve 100 ml média [mg]	Hmotnost rostliny [g]	Spotřebované léčivo na 1 gram rostliny [mg]
1	1,40	0,140	12,0	0,01
2	1,35	0,135	10,0	0,01

Aritmetický průměr extrahovaného flunitrazepamu na 1 g biomasy rostliny činil 0,01 mg (viz též tab. 16 a obr. 15).

Vzorový chromatogram dokumentující koncentrace flunitrazepamu v médiu při jednotlivých odběrech u rostliny 1 je v Příloze 3.

5.3 Nitrazepam

V experimentu s nitrazepamem bylo účastno 6 rostlin, u 3 z nich byly odběry ukončeny po čtvrtém dni experimentu, zbývající 3 rostliny byly bez známek kontaminace až do pátého dne. Výchozí koncentrace léčiva v médiu byla 10 mg/l.

V tab. 12 je uvedena koncentrace léčiva při jednotlivých odběrech, první odběr c_1 byl proveden hned po přidání léčiva, další odběry byly prováděny po 24 hod a představují procentuální hodnotu naměřené koncentrace vzhledem k c_1 . Skutečná koncentrace nitrazepamu v médiu při prvním odběru se pohybovala v rozpětí 6,64-7,62 mg/l.

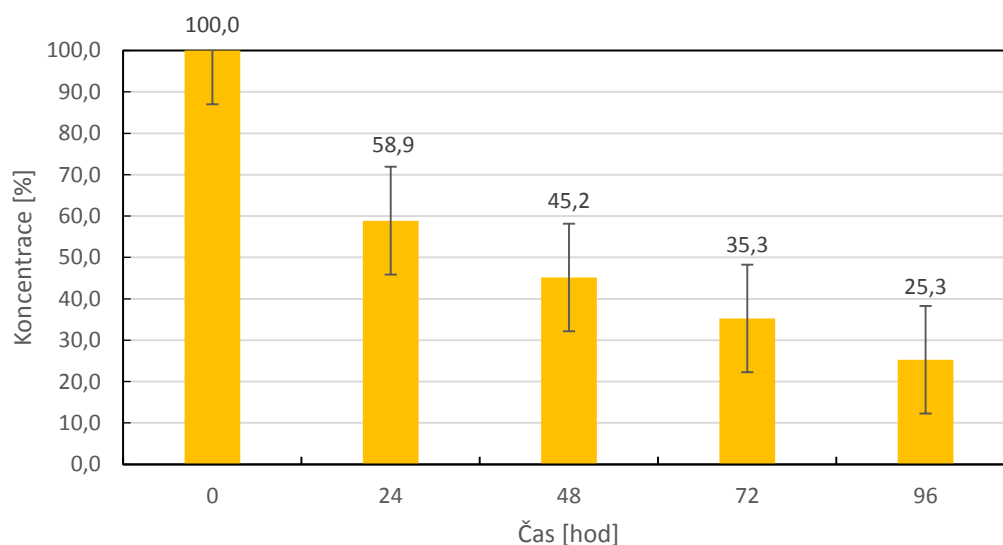
Tabulka 12. Koncentrace bromazepamu v médiu při jednotlivých odběrech.

Rostlina	c_1 [%] (0 hod)	c_2 [%] (24 hod)	c_3 [%] (48 hod)	c_4 [%] (72 hod)	c_5 [%] (96 hod)
1	100,0	54,6	45,2	31,5	26,5

2	100,0	55,4	40,2	29,1	-
3	100,0	61,0	48,2	39,7	21,6
4	100,0	51,5	43,7	34,7	27,8
5	100,0	52,5	42,2	36,1	-
6	100,0	78,3	51,6	40,6	-

Průměrná koncentrace nitrazepamu v médiu při jednotlivých odběrech (aritmetický průměr ze všech koncentrací léčiva v médiu daného odběru) je uvedena v grafu na obr. 12. K nejvýznamnějšímu průměrnému úbytku koncentrace léčiva v médiu došlo mezi prvním a druhým odběrem (pokles průměrně o 41,1 %). Experiment byl ukončen po pátém odběru, kdy v médiích zůstalo oproti původní koncentraci průměrně 25,3 % nitrazepamu (rozpětí 21,6 % - 27,8 %).

V kontrolním vzorku bez rostliny se koncentrace nitrazepamu v médiu s časem neměnila.



Obrázek 12. Průměrná koncentrace nitrazepamu v médiu při jednotlivých odběrech. Chybové úsečky znázorňují standardní chybu.

Rostliny nebyly při testech s nitrazepamem váženy jednotlivě, celková hmotnost všech šesti rostlin byla 117,6 g. Průměrná hmotnost (aritmetický průměr) spotřebovaného léčiva na 1 g biomasy rostlin činila 0,02 mg nitrazepamu, jak uvádí tab. 13 (a dále obr. 9 a tab. 16).

Tabulka 13. Účinnost fytoextrakce nitrazepamu ve vztahu k biomase rostliny.

Rostlina	Úbytek koncentrace [mg/l]	Úbytek ve 100 ml média [mg]	Celková hmotnost rostlin [g]	Spotřebované léčivo na 1 gram rostlin [mg]
1	5,32	0,532		
2	4,71	0,471		
3	5,31	0,531		
4	5,02	0,502	117,6	0,02
5	4,30	0,430		
6	4,53	0,453		

Průměrná hmotnost (aritmetický průměr) extrahovaného nitrazepamu na 1 g biomasy rostlin byla vypočítána na 0,02 mg (viz).

5.4 Bromazepam

K experimentům s bromazepamem bylo použito 9 rostlin, z jejichž médií obohacených o 10 mg/l léčiva bylo učiněno 9 odběrů v průběhu 9 dnů. První odběr proběhl po přidání média s bromazepamem rostlině, další odběry probíhaly v intervalech po 24 hodinách.

V tab. 14 je uvedena procentuální hodnota koncentrace bromazepamu vzhledem k naměřené koncentraci při prvním odběru (c_1 představuje 100%). Ve sloupcích jsou uvedeny koncentrace bromazepamu v médiu při daném odběru. Ostatním měřením se

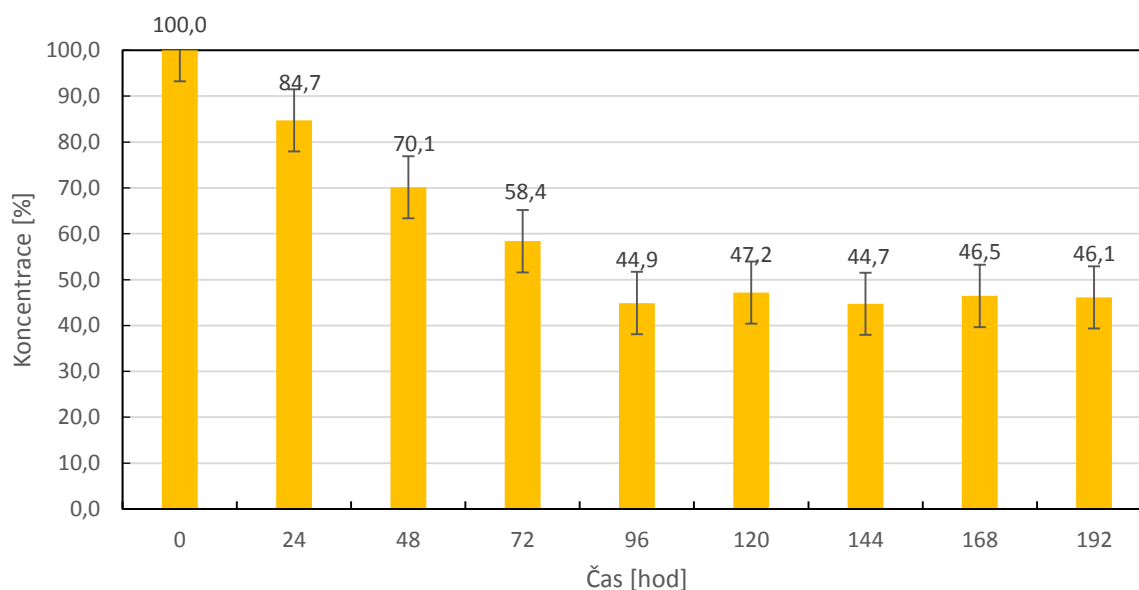
vymyká rostlina 1, u níž byla zaznamenána významně menší účinnost fytoextrakce než u rostlin ostatních. Skutečná koncentrace bromazepamu v médiu při prvním odběru byla naměřena v rozpětí 6,96-9,21 mg/l.

V kontrolním vzorku (médiu s přidaným bromazepamem bez rostliny) se změna koncentrace léčiva s časem neprojevila.

Tabulka 14. Koncentrace bromazepamu v médiu při jednotlivých odběrech.

Rostlina	c₁ [%] (0 hod)	c₂ [%] (24 hod)	c₃ [%] (48 hod)	c₄ [%] (72 hod)	c₅ [%] (96 hod)	c₆ [%] (120 hod)	c₇ [%] (144 hod)	c₈ [%] (168 hod)	c₉ [%] (192 hod)
1	100,0	96,9	91,6	73,4	78,3	86,1	74,4	82,0	82,5
2	100,0	78,8	70,9	50,5	39,5	42,1	41,1	44,9	44,6
3	100,0	74,8	49,0	46,8	31,5	34,3	33,8	34,1	34,0
4	100,0	83,2	57,5	48,0	33,9	32,0	30,5	30,8	30,1
5	100,0	84,9	70,7	57,5	41,1	39,1	38,1	38,2	39,4
6	100,0	96,2	82,4	71,9	48,9	52,7	51,1	57,0	52,6
7	100,0	85,0	78,1	69,4	59,0	62,0	56,7	54,6	53,7
8	100,0	79,4	65,6	53,6	39,5	41,5	41,9	41,6	40,0
9	100,0	83,1	65,2	54,4	32,4	34,7	35,1	35,0	38,2

V grafu na **Obrázek 7** obr. 13 je vyobrazena průměrná koncentrace bromazepamu v médiu při daném odběru (aritmetický průměr z hodnot koncentrace u všech rostlin).



Obrázek 13. Průměrná koncentrace bromazepamu v médiu při jednotlivých odběrech. Chybové úsečky představují standardní chybu.

V prvních pěti dnech byl zaznamenán relativně pravidelný pokles koncentrace léčiva v médiu. Poté začala koncentrace kolísat v řádu jednotek procent, rostliny již významně bromazepam neextrahovaly. Vzhledem k tomu, že se tento trend projevil u všech rostlin (viz tab. 14), dá se předpokládat, že by rostliny ani při delších experimentech již bromazepam neextrahovaly. Průměrná koncentrace diazepamu v médiu všech rostlin poslední den testů byla 46,1 %, kdy u rostliny 1 byla zaznamenána hodnota 82,5 % a koncentrace ostatních rostlin se pohybovaly v rozpětí 30,1-53,7 %.

Tab. 15 uvádí, jaké množství bromazepamu rostliny vyextrahovaly (vypočítáno jako rozdíl koncentrací při prvním a posledním odběru). Díky známé hmotnosti jednotlivých rostlin byla vypočítána účinnost fytoextrakce vztažené na 1 g biomasy rostlin.

Tabulka 15. Účinnost fytoextrakce bromazepamu ve vztahu k biomase rostliny.

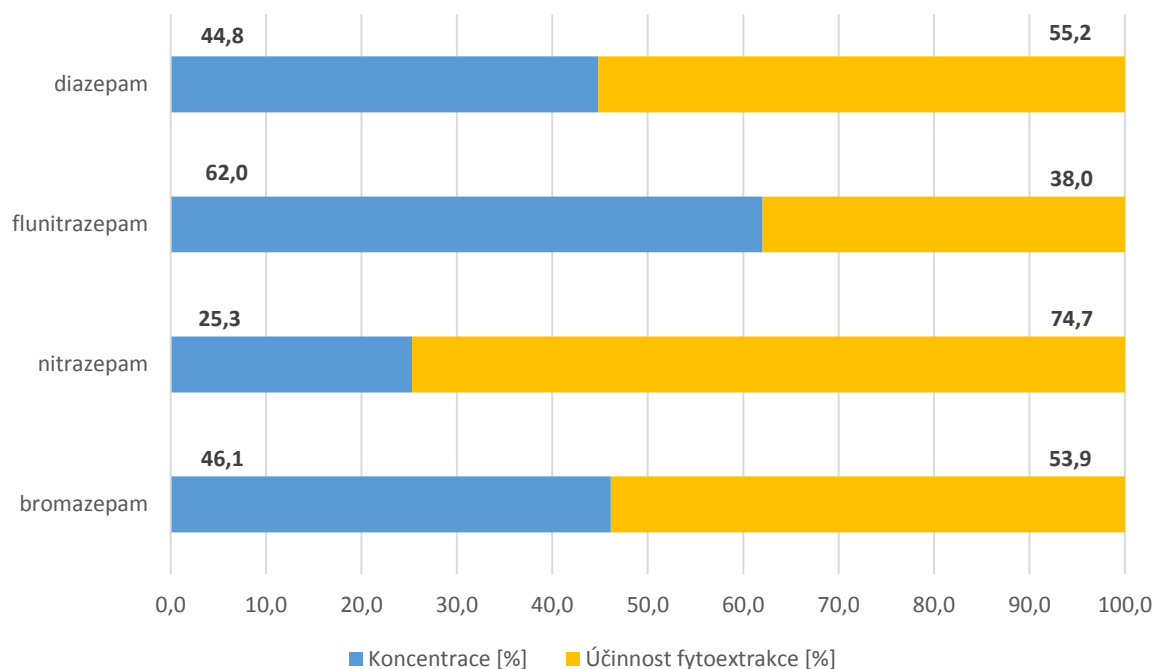
Rostlina	Úbytek koncentrace [mg/l]	Úbytek ve 100 ml média [mg]	Hmotnost rostliny [g]	Spotřebované léčivo na 1 gram rostliny
----------	---------------------------	-----------------------------	-----------------------	--

				[mg]
1	1,38	0,138	7,9	0,02
2	5,11	0,511	3,4	0,15
3	5,52	0,552	4,8	0,12
4	5,44	0,544	11,3	0,05
5	5,10	0,510	4,3	0,12
6	3,71	0,371	9,8	0,04
7	3,22	0,322	7,3	0,04
8	4,76	0,476	5,6	0,08
9	4,93	0,493	4,5	0,11

Mezi jednotlivými rostlinami byly zaznamenány velké rozdíly, nejnižší hmotnost fytoextrahovaného léčiva činila 0,02 mg/g rostliny, nejvyšší 0,15 mg/g rostliny. Průměrná hodnota (aritmetický průměr) extrahovaného bromazepamu na 1 g biomasy činila 0,08 mg (viz též tab. 16 a obr. 15).

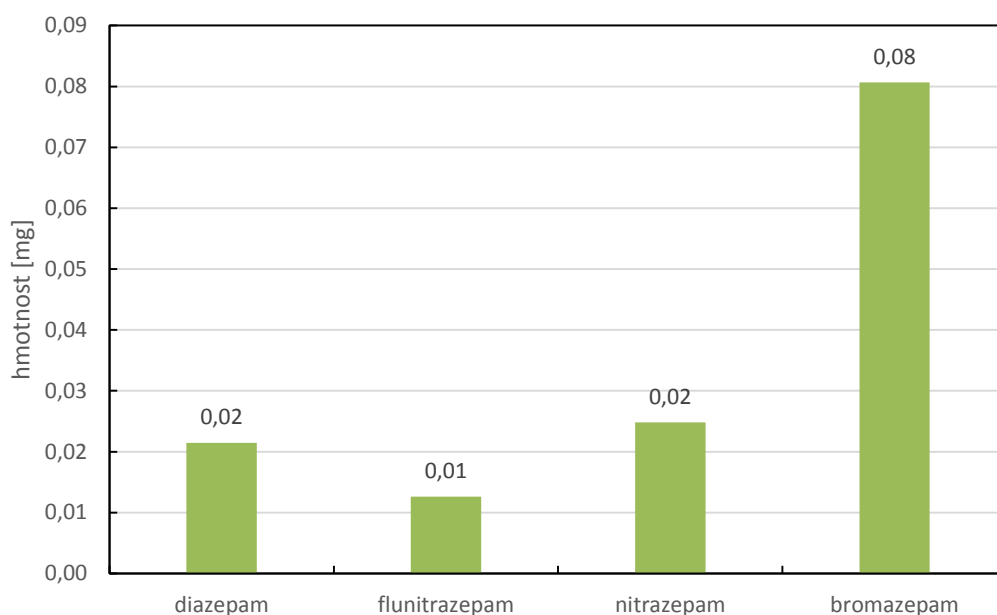
5.5 Srovnání účinnosti fytoextrakce jednotlivých léčiv

Na obr. 14 je v modrém sloupci vynesena průměrná koncentrace daného léčiva zbývajícího v médiu při posledním odběru. Vzhledem k tomu, že tato koncentrace je vyjádřena v procentech proti původní koncentraci léčiva, je možné zároveň odvodit účinnost fytoextrakce odečtením ze sta procent. Nejúčinnější fytoextrakce byla zaznamenána u nitrazepamu (74,7 %), prakticky srovnatelných hodnot dosáhla účinnost fytoextrakce u diazepamu (55,2 %) a bromazepamu (53,9 %), jako nejméně účinná se projevila fytoextrakce flunitrazepamu (38,0 %).



Obrázek 14. Porovnání zbytkové koncentrace léčiva v médiu při posledním odběru a účinnosti fytoextrakce.

Získané informace o účinnosti fytoextrakce lze posuzovat ještě dalším způsobem – díky známé hmotnosti rostlin i celkového množství odebraného léčiva bylo vypočítáno průměrné odebrané množství léčiva na 1 g biomasy rostlin (viz obr. 15). V tomto srovnání je patrné, že nejnižší hodnoty účinnosti dosáhl flunitrazepam s 0,01 mg léčiva/g biomasy rostliny, u diazepam a nitrazepamu byly zaznamenány hodnoty 0,02 mg/g biomasy rostliny (výška sloupce se v grafu liší, protože hodnota není zaokrouhlována). Několikanásobně vyšší účinnost vykazala fytoextrakce bromazepamu s 0,08 mg léčiva/g biomasy rostliny.



Obrázek 15. Porovnání účinnosti fytoextrakce vztahované na 1 g biomasy.

Zjištěné údaje byly dále v tab. 16 porovnány s údaji o rozdělovacím koeficientu oktanol/voda ($\log K_{ow}$). [86] Tento koeficient umožňuje srovnání látek z hlediska jejich lipofility – se vzrůstajícím koeficientem vzrůstá i lipofilita látek. V souvislosti s chováním látek v ŽP je $\log K_{ow}$ jeden z možných srovnávacích fyzikálně-chemických parametrů, jehož hodnota může korelovat (zejm. u živočišných buněk) s biokoncentrací. Předpokladem proto bylo, že nejlipofilnější látka bude nejvíce zachycována rostlinami.

Tabulka 16. Souhrnné srovnání účinnosti fytoextrakce v souvislosti s lipofilitou léčiv.

Léčivo	Účinnost fytoextrakce [%]	Pořadí v účinnosti fytoextrakce	Účinnost fytoextrakce [mg/g]	pořadí v účinnosti fytoextrakce	log K_{ow}	pořadí v lipofilitě
diazepam	55,2	2.-3.	0,02	2.-3.	2,70	1.
flunitrazepam	38,0	4.	0,01	4.	1,91	4.
nitrazepam	74,7	1.	0,02	2.-3.	2,45	2.
bromazepam	53,9	2.-3.	0,08	1.	1,93	3.

Byla nalezena shoda předpokládaného pořadí v případě flunitrazepamu, u něhož je nejnižší jak lipofilita dle $\log K_{ow}$, tak i účinnost fytoextrakce – a to v procentech zachycené látky, stejně jako množství zachycené látky na jednotku biomasy. Srovnání účinnosti fytoextrakce ostatních léčiv s předpokládaným pořadím podle $\log K_{ow}$ nenabízí jinou jasnou souvislost. $\log K_{ow}$ je jednou z charakteristik, které umožňují predikovat chování látek v prostředí, ve světě biologických interakcí to však není jediný faktor. Výsledek je ovlivněn celou řadou dalších charakteristik a procesů, z nichž řada je zatím neznámá.

6 ZÁVĚR

V rámci práce byly ve sterilním prostředí provedeny *in vitro* kultivace kukuřice (*Zea mays*), kterým byly po 3 týdnech kultivace v živném médiu přidány benzodiazepiny diazepam, flunitrazepam, nitrazepam a bromazepam v koncentracích 5-10 mg/l. Z obohaceného média rostlin byly odebírány vzorky po 24 hodinách.

Účinnost fytoextrakce byla hodnocena dvojitým způsobem – jako procentuální úbytek koncentrace léčiva (z rozdílu koncentrací léčiva v médiu při prvním a posledním odběru) a dále v miligramech fytoextrahovaného léčiva na 1 g biomasy rostliny. V účinnosti fytoextrakce jednotlivých léčiv byly zaznamenány velké rozdíly. Nejvyšší účinnost fytoextrakce byla pozorována u nitrazepamu (74,7 %), podobné hodnoty dosáhla účinnost fytoextrakce diazepamu a bromazepamu (55,2 % a 53,9 %), nejnižší účinnost vykazala fytoextrakce flunitrazepamu (38,0 %). Při přepočtu na 1 g biomasy rostlin se jako nejúčinnější ukázala fytoextrakce bromazepamu (0,08 mg léčiva/1g biomasy rostliny), srovnatelných hodnot dosáhla fytoextrakce nitrazepamu a diazepamu (0,02 mg) a nejnižší účinnost byla zaznamenána u flunitrazepamu (0,01 mg léčiva/1 g biomasy rostliny).

Možná souvislost s lipofilitou testovaných látek, jako jedním z možných parametrů ovlivňujících fytoextrakci, byla dle rozdělovacího koeficientu oktanol/voda $\log K_{ow}$ nalezena pouze v případě flunitrazepamu, jehož $\log K_{ow}$ dosahuje nejnižší hodnoty z vybraných léčiv a fytoextrakce se projevila jako nejméně účinná. U ostatních léčiv se tato souvislost při vzájemném porovnání neprojevila.

V dalších testech by bylo vhodné sledovat postup léčiva v těle rostliny (např. značením léčiva radioaktivními látkami a sledováním aktivity), a dále provést experimenty na různých substrátech, aby bylo možné výsledky experimentů převést do praxe a uplatnit prakticky ve fyto-remediačních technologiích.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Origins and Fate of PPCPs in the Environment*. U.S. Environmental Protection Agency, 2006. Dostupné z: <http://epa.gov/nerlesd1/chemistry/pharma/images/drawing.pdf>
- [2] BARCELÓ, Damià. Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, **22(10)**, 14-16. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)01106-3. ISSN 0165-9936.
- [3] KALLENBORN, Roland, Robert GATERMANN, Sissel PLANTING, Gerhard RIMKUS, Margrete LUND, Martin SCHLABACH a Ivan BURKOW. Gas chromatographic determination of synthetic musk compounds in Norwegian air samples. *Journal of Chromatography*. 1999, **846**, 295–306. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00259-9. ISSN 0021-9673.
- [4] FROMME, Hermann, Otto THOMAS a Konstanze PILZ. Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Research*. 2001, **35(1)**, 121-128. ISSN 0043-1354.
- [5] RIMKUS, Gerhard, Robert GATERMANN a H. HÜHNERFUSS. Musk xylene and musk ketone amino metabolites in the aquatic environment. *Toxicology Letters*. 1999, **111**, 5-15. ISSN 0378-4274.
- [6] ANDERSON, Rosalind a Julius ANDERSON. Toxic Effects of Air Freshener Emissions. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1997, **52(6)**, 443-441. DOI: 10.1080/00039899709602222. ISSN 0003-9896.
- [7] KOLPIN, Dana, Edward FURLONG, Michael MEYER, Michael THURMAN a Steven ZAUGG. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. 2002, **36(6)**, 1202-1211. DOI: 10.1021/es011055j. ISSN 0013-936X.
- [8] TOURAUD, Evelyne a Bernoit ROIG. *KNAPPE, Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters: KNAPPE FINAL REPORT*. European Commission, 2008. Dostupné z: http://environmentalhealthcollaborative.org/images/KNAPPE_REPORT_FINAL.pdf
- [9] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Hodnocení distribuovaných a vydaných léčivých přípravků za rok 2015: Roční dodávky léčivých přípravků do ČR*. 2015. Dostupné z: www.sukl.cz/file/82416_1_1

- [10] WHO POLICY PERSPECTIVES ON MEDICINES. *Promoting rational use of medicines: core components*. World Health Organisation, 2002. Dostupné z: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/h3011e/h3011e.pdf>
- [11] WORLD HEALTH ORGANISATION. *Rezistence vůči antibiotikům: přehled základních skutečností*. World Health Organisation, 2001. Dostupné z: www.who.cz/attachments/article/27/WHD_factsheet_every_CZE.pdf
- [12] HOLLOWAY, Kathleen a Liset VAN DIJK. *The world medicines situation 2011*. Ženeva: World Health Organisation, 2011. Dostupné z: apps.who.int/medicinedocs/documents/s18064en/s18064en.pdf
- [13] KUMAR, Ramasamy Rajesh, Jae Taek LEE a Jae Young CHO. Fate, Occurrence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment. *Applied Biological Chemistry*. 2012, **55**, 701-709. ISSN 2468-0842.
- [14] KUMAR, Ramasamy Rajesh, Jae Taek LEE a Jae Young CHO. Fate, Occurrence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment. *Applied Biological Chemistry*. **55**, 701-709. DOI: 10.1007/s13765-012-2220-4. ISSN 2468-0842.
- [15] *The bacterial challenge: time to react*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2009. ISBN 978-92-9193-193-4. Dostupné z: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf
- [16] RICHARDSON, Susan. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*. 2012, **84**, 747-778. DOI: 10.1021/ac202903d. ISSN 1520-6882.
- [17] FATTA-KASSINOS, D., I.K. KALAVROUZIS, P.H. KOUKOULAKIS a M.I. VAZQUEZ. The risk associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Science of Total Environment*. 2001, **409**, 3555-3563. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.03.036. ISSN 0048-9697.
- [18] EUROPEAN COMMISSION. *Communication from the Commission to the European Parliament and the Council; Action Plan against the rising Threats from Antimicrobial Resistance*. European Commission, 2011.
- [19] VLÁDA ČESKÉ REPUBLIKY. *Usnesení Vlády České republiky ze dne 4. května 2009 č. 595 o ustavení Národního antibiotického programu*. 2009. Dostupné z: [racek.vlada.cz/usneseni/usneseni_webtest.nsf/0/6DFE372AE0102BC7C12575A8004335A7/\\$FILE/595%20uv090504.0595.pdf](http://racek.vlada.cz/usneseni/usneseni_webtest.nsf/0/6DFE372AE0102BC7C12575A8004335A7/$FILE/595%20uv090504.0595.pdf)
- [20] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky*. Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2009. Dostupné z: <http://www.mzcr.cz/Legislativa/Soubor.ashx?souborID=9368&typ=application/pdf&nazev=MZ%2009-09.pdf>

- [21] HOFFMANN, Frauke a Werner KLOAS. The synthetic progestogen, Levonorgestrel, but not natural progesterone, affects male mate calling behavior of *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*. 2012, **176**, 385-390. DOI: 10.1016/j.ygcn.2012.02.009. ISSN 0016-6480.
- [22] GYLLENHAMMAR, I., R. HOLM, R. EKLUND a C. BERG. Reproductive toxicity in *Xenopus tropicalis* after developmental exposure to environmental concentrations of ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*. 2009, **91(2)**, 171-178. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.06.019. ISSN 0166-445X.
- [23] SEGNER, H., CAROLL, K., FENSKE, M., JANSSEN, C. R., MAACK, G., PASCOE, D., SCHÄFERS, C., VANDENBERGH, G. F., WATTS, M. a A. WENZEL. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, **54**, 302–314. ISSN 0147-6513.
- [24] JOBLING, S., CASEY, D., RODGERS-GRAY, T., OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., PAWLOWSKI, S., BRAUNBECK, T., TURNER, A.P. a C.R TYLER. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*. 2003, **65**, 205–220. DOI: 10.1016/S0166-445X(03)00134-6. ISSN 0166-445X.
- [25] PARK, Bradley a Karen KIDD. Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of mink frogs and green frogs in the wild and in situ. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005, **24(8)**, 2027–2036. DOI: 10.1897/04-227R.1. ISSN 1552-8618.
- [26] YANG, Juan, Haiyan LI, Yong RAN a Kingming CHAN. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere*. 2014, **107**, 439-446. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.048. ISSN 0045-6535.
- [27] LOOS, Robert, Bernd GAWLIK, Giovanni LOCORO, Erika RIMAVICIUTE, Serafino CONTINI a Bidoglio GIOVANNI. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*. 2009, **157**, 561-568. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.09.020. ISSN 0269-7491.
- [28] BHANDARI, Ramji, Sharon DEEM, Dawn HOLLIDAY, et al. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *General and Comparative Endocrinology*. 2014, **214**, 195-219. DOI: 10.1016/j.ygcn.2014.09.014. ISSN 0016-6480.
- [29] MORTEANI, Giulio, Peter MÖLLER, Andrea FUGANTI a Tomáš PAČES. Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants

in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). *Environmental Geochemistry and Health*. 2006, **28**, 257-264. DOI: 10.1007/s10653-006-9040-6. ISSN 1573-2983.

[30] BOUND, Jonathan a Nikolaos VOULVOULIS. Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*. 2005, **113(12)**, 1705-1711. DOI: 10.1289/ehp.8315. ISSN 0091-6765.

[31] KUSPIS, D.A. a E.P. KRENZELOK. What happens to expired medications? A survey of community medication disposal. *Veterinary and Human Toxicology*. 1996, **38(1)**, 48-49. ISSN 0145-6296.

[32] SEEHUSEN, Dean a John EDWARDS. Patient Practices and Beliefs Concerning Disposal of Medications. *Journal of the American Board of Family Medicine*. 2006, **19(6)**, 543-547. DOI: 10.3122/jabfm.19.6.542. ISSN 1558-7118.

[33] OWENS, Linda a Sowmya ANAND. *Medication Disposal Survey: Final Report*. Chicago: Survey Research Laboratory, University of Illinois at Chicago, 2009. Dostupné z: debrashore.org/downloads/UIC_Med_Disposal_Survey.pdf

[34] GONZÁLEZ ALONSO, Silvia, Myriam CATALÁ, Raúl MAROTO, José Luis RODRÍGUEZ GIL, Ángel DE MIGUEL a Valcárcel YOLANDA. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International*. 2010, **36**, 195-201. DOI: 10.1016/j.envint.2009.11.004. ISSN 0160-4120.

[35] ZUCCATO, Ettore, Davide CALAMARI, Marco NATANGELO a Roberto FANELLI. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet*. 2000, **355**, 1789-1790. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02270-4. ISSN 0140-6736.

[36] WOLDEGIORGIS, Andreas, Jeanette GREEN, Mikael REMBERGER, Lennart KAJ a Eva BRORSTRÖM-LUNDÉN. *Results from the Swedish screening 2006, Sub report 4: Pharmaceuticals*. Swedish Environmental Research Institute, 2007. Dostupné z: www3.ivl.se/rapporter/pdf/B1751.pdf

[37] VAN DER VEN, Karlijn, Walter VAN DONGEN, Bert MAES, Eddy ESMANS, Ronny BLUST a Wim DE COEN. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere*. 2004, **57**, 967-973. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.062. ISSN 0045-6535.

[38] LÖFFLER, Dirk, Jörg RÖMBKE, Michael MELLER a Thomas TERNES. Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environmental Science and Technology*. 2005, **39**, 5209-5218. DOI: 10.1021/es0484146. ISSN 0013-936X.

- [39] WEST, Charles a Steven ROWLAND. Aqueous Phototransformation of Diazepam and Related Human Metabolites under Simulated Sunlight. *Environmental Science and Technology*. 2012, **46**, 4749-4756. DOI: 10.1021/es203529z. ISSN 0013-936X.
- [40] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [41] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Praha: GRADA Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [42] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: GRADA Publishing, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [43] MINTZER, Miriam a Ronald GRIFFITHS. Flunitrazepam and triazolam: a comparison of behavioral effects and abuse liability. *Drug and Alcohol Dependence*. 1998, **53**, 49-66. ISSN 0376-8716.
- [44] NEUTEL, Ineke. Risk of Traffic Accident Injury after a Prescription for a Benzodiazepine. *Annals of epidemiology*. 1995, **5(3)**, 239-244. ISSN 1047-2797
- [45] GUSTAVSEN, Ingebjørg, Jørgen BRAMNESS, Svetlana SKURTVEIT, Anders ENGELAND, Ineke NEUTEL a Jørg MØRLAND. Road traffic accident risk related to prescriptions of the hypnotics zopiclone, zolpidem, flunitrazepam and nitrazepam. *1389-9457*. 2008, **9(8)**, 818-822. DOI: 10.1016/j.sleep.2007.11.011.
- [46] BARBONE, F., A. D. MCMAHON, P. G. DAVEY, A. D. MORRIS, I. C. REID, D. G. MCDEVITT a T. M. MACDONALD. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. *The Lancet*. 1998, **352**, 1331-1336. ISSN 0140-6736.
- [47] BEČKOVÁ, Ilona a Peter VIŠŇOVSKÝ. *Farmakologie drogových závislostí*. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-864-6.
- [48] DOLEŽAL, Martin. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum Press, 2013. ISBN 978-80-246-2382-5.
- [49] DRUID, Henrik, Per HOLMGREN a Johan AHLNER. Flunitrazepam: an evaluation of use, abuse and toxicity. *Forensic Science International*. 2001, **122**, 136-141. ISSN 0379-0738.
- [50] AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE. *National Drug Strategy Household Survey detailed report: 2013*. Canberra: Australian Institute of Health and Welfare, 2014. ISBN 978-1-74249-665-8.
- [51] LOXLEY, Wendy. Benzodiazepine use and harms among police detainees in Australia. *Trends & issues in crime and criminal justice*. 2007, **336**, 1-6. ISSN 0817-8542.

- [52] MARC, B., F. BAUDRY, P. VAQUERO, L. ZERROUKI, S. HASSNAOUI a H. DOUCERON. Sexual assault under benzodiazepine submission in a Paris suburb. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2000, **263(4)**, 193-197. ISSN 0932-0067.
- [53] DÅDERMAN, Anna Maria, Björn FREDRIKSSON, Marianne KRISTIANSOON, Lars-Håkan NILSSON a Lars LIDBERG. Violent Behavior, Impulsive Decision-Making, and Anterograde Amnesia While Intoxicated With Flunitrazepam and Alcohol or Other Drugs: A Case Study in Forensic Psychiatric Patients. *The Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law*. 2002, **30**, 238-251. ISSN 1093-6793.
- [54] DÅDERMAN, Anna Maria a Lars LIDBERG. Flunitrazepam (Rohypnol) abuse in combination with alcohol causes premeditated, grievous violence in male juvenile offenders. *The Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law*. 1999, **27(1)**, 83-99. ISSN 1093-6793.
- [55] TROJAN, STANISLAV. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: GRADA Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [56] BRAMNESS, Jørgen, Svetlana SKURTVEIT a Jørg MØRLAND. Flunitrazepam: Psychomotor impairment, agitation and paradoxical reactions. *Forensic Science International*. 2006, **159**, 83-91. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.06.009. ISSN 0379-0738.
- [57] DÅDERMAN, Anna Maria a Gunnar EDMAN. Flunitrazepam abuse and personality characteristics in male forensic psychiatric patients. *Psychiatry Research*. 2001, **103**, 27-42. ISSN 0165-1781.
- [58] OHSHIMA, T. A case of drug-facilitated sexual assault by the use of flunitrazepam. *Journal of Clinical Forensic Medicine*. 2006, **13**, 44-45. DOI: 10.1016/j.jcfm.2005.05.006. ISSN 1353-1131.
- [59] ŠILHAVÁ, Tereza. *Ekotoxikologické hodnocení léčiva diazepamu*. Hradec Králové, 2015. Rigorózní práce.
- [60] OGGIER, Daniela, Christin WEISBROD, Andrea STOLLER, Armin ZENKER a Karl FENT. Effects of Diazepam on Gene Expression and Link to Physiological Effects in Different Life Stages in Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Technology*. 2010, **44(19)**, 7685-7691. DOI: 10.1021/es100980r. ISSN 0013-936X.
- [61] PASCOE, David, Wanchamai KARTANUT a Carsten MÜLLER. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*. 2003, **51**, 521-528. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00860-3. ISSN 0045-6535.
- [62] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Spotřeba léčiv - hlášení lékáren: spotřeba léčivých látek podle cesty podání*. 2010. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/spotreba-leciv-hlaseni-lekaren-1>

- [63] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Spotřeba léčivých látek podle cesty podání: 1Q 2010*. 2010. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/7-spotreba-lecivych-latek-podle-cesty-podani>
- [64] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Hodnocení distribuovaných a vydaných léčivých přípravků za rok 2015: Roční hodnocení výdejů LP*. 2015. Dostupné z: www.sukl.cz/file/82413_1_1
- [65] THE INTERSTATE TECHNOLOGY AND REGULATORY COUNCIL. *Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised*. The Interstate Technology and Regulatory Council, 2009. Dostupné z: <http://itrcweb.org/GuidanceDocuments/PHYTO-3.pdf>
- [66] SALT, D.E., R.D. SMITH a I. RASKIN. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1998, **49**, 643-668. ISSN 1040-2519.
- [67] SUSARLA, Sridhar, Victor MEDINA a Steven MCCUTCHEON. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological engineering*. 2002, 18, 647-658. ISSN 0925-8574.
- [68] BRIGGS, Geoffrey, Richard BROMILOW a Avis EVANS. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pest Management Science*. 1982, **13(5)**, 495-504. DOI: 10.1002/ps.2780130506. ISSN 1526-4998.
- [69] VANGRONSVELD, Jaco, Rolf HERZIG, Nele WEYENS, et al. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*. 2009, **16(7)**, 765-794. DOI: 10.1007/s11356-009-0213-6. ISSN 0944-1344.
- [70] TERRY, Norman a Gary BAÑUELOS. Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers, 2000. ISBN 1-56670-450-2.
- [71] MACNAIR, Mark. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist*. 1993, **124**, 541-559. ISSN 1469-8137.
- [72] YANG, Xiaoe, Ying FENG, Zhenli HE a Peter J. STOFFELLA. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2005, **18(4)**, 339-353. DOI: 10.1016/j.jtemb.2005.02.007. ISSN 0946672x.
- [73] SOUDEK, Petr, Šárka PETROVÁ, Dagmar BENEŠOVÁ, Jan KOTYZA a Tomáš VANĚK. Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy*. 2008, **102**, 346-352. ISSN 1213-7103.
- [74] PILON-SMITS, Elizabeth. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 2005, **56(1)**, 15-39. DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214. ISSN 1543-5008.

- [75] ALLAM, Ayman, Ahmed TAWFIK, Abdelazim NEGM, Chihiro YOSHIMURA a Amr FLEIFLE. Treatment of Drainage Water Containing Pharmaceuticals Using Duckweed (*Lemna gibba*). *Energy Procedia*. 2015, **74**, 973-980. DOI: 10.1016/j.egypro.2015.07.734. ISSN 18766102.
- [76] KOTYZA, Jan, Petr SOUDEK, Zdeněk KAFKA a Tomáš VANĚK. Phytoremediation of Pharmaceuticals—Preliminary Study. *International Journal of Phytoremediation*. 2010, **12(3)**, 306-316. DOI: 10.1080/15226510903563900. ISSN 1522-6514.
- [77] BARTHA, Bernadett, Christian HUBER a Peter SCHRÖDER. Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia* – How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Science*. 2014, **227**, 12-20. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.06.001. ISSN 01689452.
- [78] DORDIO, A.V., M. BELO, D. MARTINS TEIXEIRA, A.J. PALACE CARVALHO, C.M.B. DIAS, Yolanda PICÓ a A.P. PINTO. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology*. 2011, **102(17)**, 7827-7834. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.06.050. ISSN 09608524.
- [79] DORDIO, Ana V., Cátia DUARTE, Margarida BARREIROS, A.J. Palace CARVALHO, A.P. PINTO a Cristina Teixeira DA COSTA. Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid by *Typha* spp. – Potential use for phytoremediation? *Bioresource Technology*. 2009, **100(3)**, 1156-1161. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.08.034. ISSN 09608524.
- [80] ZHANG, Dong Qing, Richard M. GERSBERG, Tao HUA, Junfei ZHU, Manish Kumar GOYAL, Wun Jern NG a Soon Keat TAN. Fate of pharmaceutical compounds in hydroponic mesocosms planted with *Scirpus validus*. *Environmental Pollution*. 2013, **181**, 98-106. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.06.016. ISSN 02697491.
- [81] IORI, Valentina, Fabrizio PIETRINI a Massimo ZACCHINI. Assessment of ibuprofen tolerance and removal capability in *Populus nigra* L. by in vitro culture. *Journal of Hazardous Materials*. 2012, **229-230**, 217-223. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.05.097. ISSN 03043894.
- [82] ZAYED, Adel, Mel LYTLE a Norman TERRY. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta: An International Journal of Plant Biology*. 1998, **206**, 284-292. ISSN 1432-2048.
- [83] LI, Yifei, Guibing ZHU, Wun Jern NG a Soon Keat TAN. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of The Total Environment*. 2014, **468-469**, 908-932. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.018. ISSN 00489697.

[84] MATAMOROS, Víctor, Carlos A. ARIAS, Loc Xuan NGUYEN, Victòria SALVADÓ a Hans BRIX. Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland. *Chemosphere*. 2012, **88(9)**, 1083-1089. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.048. ISSN 00456535.

[85] MURASHIGE, Toshio a Folke SKOOG. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962, **15(3)**, 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x. ISSN 0031-9317.

[86] BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003, **22(10)**, xiv-xvi. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)01106-3. ISSN 01659936.

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Benzodiazepiny na trhu v ČR	22
Tabulka 2. Složení média podle Murashiga a Skooga	31
Tabulka 3. Původ získaných léčiv.....	33
Tabulka 4. Výchozí koncentrace jednotlivých léčiv v médiu a počet pokusných rostlin... 35	
Tabulka 5. Složení mobilních fází pro stanovované látky.	36
Tabulka 6. Podmínky stanovení jednotlivých léčiv pomocí HPLC/UV.	37
Tabulka 7. Mez detekce a mez stanovitelnosti stanovovaných látek.	37
Tabulka 8. Koncentrace diazepamu v médiu při jednotlivých odběrech.	40
Tabulka 9. Účinnost fytoextrakce diazepamu ve vztahu k biomase rostliny.	42
Tabulka 10. Koncentrace flunitrazepamů v médiu při jednotlivých odběrech.	43
Tabulka 11. Účinnost fytoextrakce flunitrazepamů ve vztahu k biomase rostliny.	44
Tabulka 12. Koncentrace bromazepamů v médiu při jednotlivých odběrech.....	44
Tabulka 13. Účinnost fytoextrakce nitrazepamů ve vztahu k biomase rostliny.	46
Tabulka 14. Koncentrace bromazepamů v médiu při jednotlivých odběrech.....	47
Tabulka 15. Účinnost fytoextrakce bromazepamů ve vztahu k biomase rostliny.....	48
Tabulka 16. Souhrnné srovnání účinnosti fytoextrakce v souvislosti s lipofilitou léčiv. ...	51

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Osud léčiv v životním prostředí.....	14
Obrázek 2. 1,4-benzodiazepin.....	16
Obrázek 3. Struktura diazepamu.....	20
Obrázek 4. Struktura flunitrazepam.....	20
Obrázek 5. Struktura nitrazepam.....	21
Obrázek 6. Struktura bromazepam.....	21
Obrázek 7. Ukázka nasazených semen kukuřice seté (<i>Zea mays</i>) na sterilním médiu.	34
Obrázek 8. Ukázka rostliny vyřazené z experimentu (infekce plísněmi).	35
Obrázek 9. Koncentrace diazepam v médiu rostliny 2 při jednotlivých odběrech.	40
Obrázek 10. Průměrná koncentrace diazepam v médiu při jednotlivých odběrech.....	41
Obrázek 11. Průměrná koncentrace flunitrazepam v médiu při jednotlivých odběrech. ...	43
Obrázek 12. Průměrná koncentrace nitrazepam v médiu při jednotlivých odběrech.....	45
Obrázek 13. Průměrná koncentrace bromazepam v médiu při jednotlivých odběrech.....	48
Obrázek 14. Porovnání zbytkové koncentrace léčiva v médiu při posledním odběru a účinnosti fytoextrakce.	50
Obrázek 15. Porovnání účinnosti fytoextrakce vztažené na 1 g biomasy.....	51