

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Dominika Luptáková

PRÍPRAVA A FYTOEXTRAKCIA 125-I ZNAČENÝCH FARMÁK

Preparation and Phytoextraction of 125-I Labelled Pharmaceuticals

Diplomová práce

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

Praha 2013

Táto diplomová práca vznikla v súvislosti s riešením výskumného zámeru MSM0021620857.

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití těchto výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné jenom po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13.5.2013

.....

Podpis

Abstrakt

Liečivá patria prevažne do skupiny organických substancií a predstavujú látky významnej celosvetovej spotreby v humánnom aj veterinárnom lekárstve. V organizme môžu, ale nemusia, byť metabolizované a sú spravidla vylučované cestou renálnej exkrécie vo forme natívnych látok a/alebo ich metabolitov. Veľké množstvo týchto látok potom ďalej kontaminuje komunálne odpadové vody. Čistiarne odpadových vôd nie sú schopné bezo zvyšku odstrániť tieto substancie, a tak ďalej prechádzajú do povrchových a podzemných vôd či pôdy. Vzhľadom na biologickú aktivitu týchto látok hrozí pri dlhodobom pôsobení z hľadiska biologických štúdií možnosť vzniku bakteriálnej rezistencie, endokrinného pôsobenia, poškodenia DNA či obličiek u necieľových organizmov. V práci bola experimentálne študovaná možnosť fytoextrakcie a translokácie v rastline rádioaktívne značeného liečiva diklofenaku s ^{125}I v *in vitro* podmienkach s využitím rastlinných kultivarov kukurice siatej (*Zea mays*) a slnečnice ročnej (*Helianthus annuus*). Účinnosť fytoextrakcie bola vyhodnocovaná pomocou úbytku aktivity študovanej substancie [^{125}I]diklofenaku z kultivačného média podľa Murashiga a Skooga. Behom 8 – 10 dňovej kultivačnej periódy bola preukázaná extrakčná účinnosť $\approx 85\%$ v prípade použitia kukurice siatej a $\approx 79\%$ u slnečnice ročnej. Lepšiu akumuláciu schopnosť vykazovala slnečnica ročná a to 80 mg diklofenaku na kilogram suchej hmotnosti oproti 30 mg/kg u kukurice siatej. Translokácia [^{125}I]diklofenaku v rastline študovaná pomocou elektronickej autorádiografie preukázala maximálny výskyt v oblasti koreňov rastlín, kde pravdepodobne dochádza k primárnej adsorpcii. Prítomnosť značeného diklofenaku však bola preukázaná aj v stonkách a listoch, čo svedčí o prieniku skúmanej substancie do koreňov a translokácii do nadzemných častí.

Kľúčové slová

Farmaká, ibuprofén, naproxen, diklofenak, jedácia, fytoextrakcia, translokácia, odpadové vody

Abstrakt

Léčiva patří převážně do skupiny organických substancí a představují látky s významnou celosvětovou spotřebou v humánním i veterinárním lékařství. V organismu mohou, ale nemusí, být metabolizovány a jsou zpravidla vylučovány cestou renální exkrece ve formě původních látek nebo jejich metabolitů. Velké množství těchto látek potom dále kontaminuje komunální odpadní vody. Čistírný odpadních vod nejsou schopny odstranit tyto substance beze zbytku a tak tyto látky dále přecházejí do povrchových a podzemních vod a do půdy. Vzhledem k biologické aktivitě těchto látek hrozí při jejich dlouhodobém působení možnost vzniku bakteriální rezistence, endokrinního vlivu, poškození DNA či ledvin v necílových organismech. V práci byla experimentálně studována možnost fytoextrakce a translokace v rostlině u radioaktivně značeného léčiva diklofenaku s ^{125}I v *in vitro* podmínkách s využitím kultivarů kukuřice seté (*Zea mays*) a slunečnice roční (*Helianthus annuus*). Účinnost fytoextrakce byla vyhodnocována pomocí úbytku radioaktivity studované substance [^{125}I]diklofenaku z kultivačního média podle Murashiga a Skooga. Během 8 – 10-denní kultivace byla prokázána extrakční účinnost $\approx 85\%$ u kukuřice seté a $\approx 79\%$ u slunečnice roční. Lepší akumulární schopnost vykazovala slunečnice roční a to 80 mg diklofenaku na kilogram suché hmotnosti oproti 30 mg/kg u kukuřice seté. Translokace [^{125}I]diklofenaku v rostlině studované pomocí elektronické autoradiografie prokázala maximální výskyt v oblasti kořenů rostlin, kde pravděpodobně dochází k primární adsorpci. Přítomnost značeného diklofenaku však byla prokázána i ve stoncích a listech, což svědčí o průniku zkoumané substance do kořenů a translokaci do nadzemních částí.

Klíčová slova

Farmaka, ibuprofen, naproxen, diklofenak, jodace, fytoextrakce, translokace, odpadní vody

Abstract

Pharmaceuticals are group of organic substances with significant worldwide consumption in human and veterinary medicine. These compounds may be metabolized in the organism, but in some cases they remain unchanged and both are usually excreted via renal excretion in the native form or as metabolites. Large quantities of pharmaceuticals and their metabolites contaminate municipal wastewater. The wastewater treatment plants are unable to remove these substances completely, so they contaminate surface water, groundwater and soil as well. Due to the biological activity of pharmaceuticals, long - term effect may cause bacterial resistance, endocrine influence, DNA and renal damages in non-target organisms. The phytoextraction and the translocation of radiolabeled diclofenac with ^{125}I were experimentally studied by using of *in vitro* cultivated plants *Helianthus annuus* and *Zea mays*. Efficiency of phytoextraction was monitored as decrease of radioactivity of tested substance [^{125}I]diclofenac in Murashige-Skoog cultivation medium. Both species are able to extract tested substance during 8 to 10 days of cultivation, with efficiency approximately 85 % using *Zea mays* and 79 % using *Helianthus annuus*. Better extraction ability of diclofenac was observed at *Helianthus annuus* – 80 mg/ kg of dry weight compared to 30 mg/kg of dry weight in *Zea mays*. The translocation of [^{125}I]diclofenac studied by electronic autoradiography showed the maximal occurrence in the plant roots, where the primary adsorption probably occurs. The presence of the labeled diclofenac was observed also in stems and leaves, which shows the penetration of tested substance into the roots and translocation to the shoot parts of plants.

Keywords

Pharmaceuticals, ibuprofen, naproxen, diclofenac, iodination, phytoextraction, translocation, wastewater

Pod'akovanie

V tejto práci by som veľmi rada pod'akovala vedúcemu diplomovej práce Doc. Ing. Stanislavovi Smrčkovi, CSc. za odborné vedenie, pomoc, užitočné rady a pripomienky, za čas, ochotu a trpezlivosť, ktorú mi pri vypracovávaní tejto práce venoval.

Ďalej by som taktiež veľmi rada pod'akovala Ing. Šárke Pšondrovej a RNDr. Martinovi Štíchovi za ochotu, čas a pomoc, ktorú mi vypracovávaní experimentálnej časti venovali.

Obsah

Obsah	7
1 Úvod	11
1.1 Cieľ práce.....	11
2. Teoretický úvod.....	13
2.1 Farmaká v životnom prostredí	13
2.1.1 Vstup farmák do prostredia	13
2.1.1.1 Vlastnosti liečiv a faktory ovplyvňujúce prítomnosť farmák v životnom prostredí.....	15
2.1.2 Správanie farmák v čistiarnach odpadových vôd.....	17
2.1.2.1 Opis procesu čistenia odpadových vôd	17
2.1.2.2 Chovanie liečiv počas čistenia odpadových vôd	19
2.1.3 Výskyt liečiv v ekosystéme.....	22
2.1.3.1 Prítomnosť liečiv v pôde a sedimente	22
2.1.3.2 Prítomnosť farmák vo vode.....	23
2.2 Biologické efekty liečiv v životnom prostredí.....	25
2.2.1 Hodnotenie ekologického rizika.....	25
2.2.2 Vplyv liečiv na mikrobiálnu a bakteriálnu funkciu.....	26
2.2.3 Účinky liečiv na vegetáciu	27
2.2.4 Renálne poškodenie v dôsledku prítomnosti liečiv v ekosystéme	28
2.2.5 Endokrinné pôsobenie liečiv v ekosystéme	29
2.2.6 Prítomnosť liečiv v životnom prostredí ako príčina poškodenia DNA.....	30
2.3 Spotreba farmák a významné farmaká ako indikátory znečistenia.....	31
2.3.1 Spotreba a výdaj najviac používaných liečiv	31

2.3.2 Liečivá ako ukazovatele znečistenia vody v dôsledku antropogénnej činnosti	33
2.4 Netradičné metódy odstránenia zvyškových koncentrácií farmák	34
2.4.1 Pokročilé oxidačné procesy čistenia	34
2.4.2 Čistenie v membránových bioreaktoroch.....	37
2.4.3 Fytoremediačné techniky	37
3. Experimentálna časť	40
3.1 Použité chemikálie	40
3.2 Prístroje	40
Pri príprave reakcií bola použitá miešačka Vortex-Genie®	40
3.3 Rastliny použité na experiment.....	41
3.4 Pracovný postup.....	42
3.4.1 Príprava jódom značených farmák	42
3.4.2 Stanovenie optimálneho reakčného času.....	43
3.4.3 Príprava [¹²⁵ I]diklofenaku	44
3.4.4 Príprava rastlinných kultúr	44
3.4.5 Fytoextrakcia [¹²⁵ I]diklofenaku	45
3.4.6 Detekcia translokácie [¹²⁵ I]diklofenaku v rastline	46
4. Výsledky a diskusia	47
4.1 Príprava ¹²⁵ I značených farmák	47
4.2 Účinnosť fytoextrakcie [¹²⁵ I]diklofenaku	53
4.2.1 Fytoextrakčná schopnosť eliminácie [¹²⁵ I]diklofenaku vybraných druhov rastlín z roztokov.....	55
4.3 Translokácia [¹²⁵ I]diklofenaku vo vybraných rastlinných druhoch.....	56
4.3.1 Kukurica siata (<i>Zea mays</i>).....	56
4.3.2 Slnečnica ročná (<i>Helianthus annuus</i>).....	57

5 Záver.....	59
Referencie.....	61

Zoznam skratiek a symbolov

CYPs (systém izoenzýmov cytochromu P-450)

MAO (monoaminoxidasa)

NSAIDs (nesteroidné protizápalové liečivá)

K_{ow} (rozdeľovací koeficient oktanol – voda)

K_d (rozdeľovací koeficient pevná fáza – voda)

PEC (predpokladaná environmentálna koncentrácia)

PNEC (koncentrácia, pri ktorej nie je predpokladaný škodlivý účinok)

RQ (rizikové skóre)

EC50 (efektívna dávka 50)

AOPs (pokročilé oxidačné procesy)

1 Úvod

Liečivá spolu s kozmetickými prípravkami ako skupina organických látok sú využívané predovšetkým na liečebné účely ako diagnostika ochorenia či samotná liečba, alebo z kozmetických dôvodov, a sú to látky významnej celosvetovej spotreby. V rámci Európy a USA existuje na trhu približne 4 000 rôznych farmaceuticky aktívnych látok, ktoré sa používajú v humánnom a veterinárnom lekárstve a spotreba liečiv každým rokom narastá.

Čistiare odpadových vôd nie sú schopné bezo zvyšku stopové množstvá farmák v procese čistenia odstrániť, a tak sa tieto látky, ktoré môžu, ale nemusia, podliehať v tele metabolickej premene, dostávajú v natívnej forme alebo ako aktívne či neaktívne metabolity cez kanalizáciu ďalej do odpadových, podzemných, ale aj povrchových vôd, a ich výskyt bol zaznamenaný dokonca aj v pitnej vode. Využívanie odpadovej vody na zavlažovanie pôdy a iné poľnohospodárske aktivity prispievajú ďalej k tomu, že liečivá sa stávajú všadeprítomnými v životnom prostredí a možnými polutantami v ekosystéme. Vzhľadom na pretrvávajúce vypúšťanie liečiv do životného prostredia sú tiež označované ako „pseudoperzistentné zlúčeniny“ v ekosystéme.

Liečivá, ako látky biologicky aktívne a pretrvávajúce v životnom prostredí, sa stávajú potenciálne nebezpečné a môžu mať negatívny dopad aj na necieľové organizmy, zahrňujúc vznik bakteriálnej rezistencie, renálne i endokrinné poruchy, poškodenie DNA, alebo vplyv na vegetáciu. Nájdenie vhodného spôsobu dekontaminácie životného prostredia od týchto látok by preto mohlo pomôcť k eliminácii liečiv ako polutantov z ekosystému a zabrániť v ich ďalšiemu rozširovaní.

1.1 Cieľ práce

Diplomový projekt je koncipovaný ako príspevok ku štúdiu fytotechnologických procesov v zmysle fytoremediácie, teda možnosti dekontaminácie pôdných a vodných kompartmentov od environmentálne významných polutantov. V súčasnej dobe patria v tomto zmysle medzi najštudovanejšie organické zlúčeniny farmaká a ich metabolity,

ktoré kontaminujú predovšetkým povrchové vody. K nájdeniu možností a predovšetkým mechanizmu ich interakcie s rastlinami je vhodné sledovať ich chovanie pomocou rádioaktívne značených analógov, ktoré dovoľujú vyhodnotiť ako ich záchyt, tak aj translokáciu v rastline. Ako študované látky boli zvolení zástupcovia nesteroidných protizápalových substancií – ibuprofén, naproxen a diklofenak.

Splnenie požadovaného cieľa zahrňuje:

- 1) Overenie možností jodácie testovaných substancií metódou analogickou klasickej jodácii aromatických častí proteínových štruktúr na báze chloraminu T a iodogenu vrátane optimalizácie procesu.
- 2) Nájdenie separačných podmienok pre izoláciu rádioaktívne značených substancií.
- 3) Príprava ^{125}I značených substancií a ich izolácia.
- 4) Príprava *in vitro* kultúr *Zea mays* a *Helianthus annuus* pre fytoextrakčné experimenty.
- 5) Vlastné prevedenie fytoextrakčných pokusov.
- 6) Stanovenie fytoextrakčnej účinnosti na základe vyhodnotenia rádioaktivity média pred a po kultivácii.
- 7) Štúdium translokácie pomocou elektronickej autorádiografie.
- 8) Vyhodnotenie experimentov z hľadiska účinnosti a translokácie, porovnanie použitých rastlinných druhov.

2. Teoretický úvod

2.1 Farmaká v životnom prostredí

V dôsledku antropogénnej aktivity rastie množstvo znečisťujúcich látok vypúšťaných do životného prostredia ako sú pesticídy, ťažké kovy a organické látky, čím dochádza k jeho kontaminácii ¹.

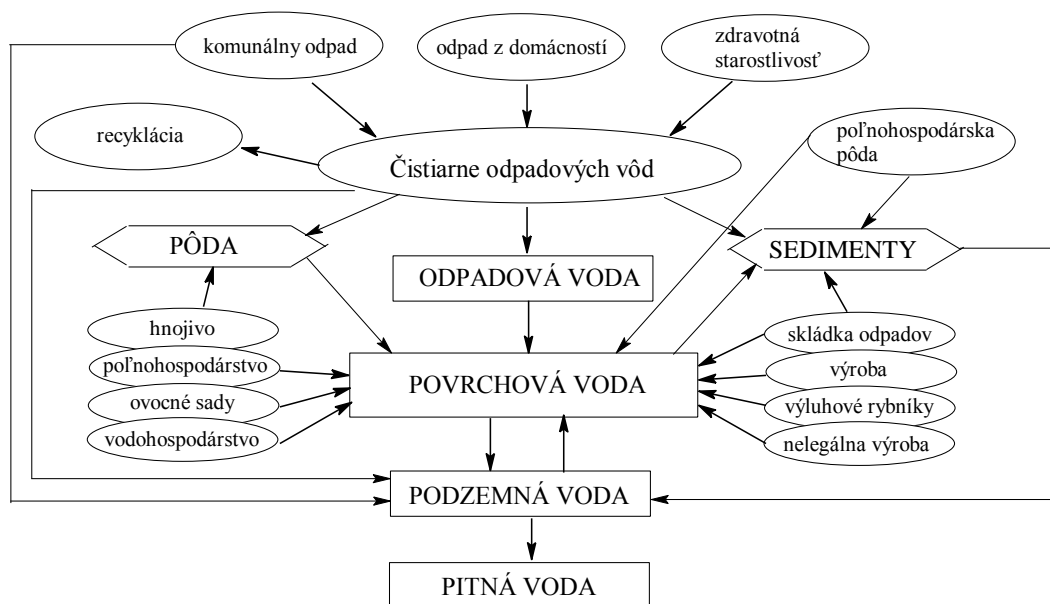
Liečivá a kozmetické prípravky patria do širokej škály organických látok používaných k liečebným účelom (diagnostika ochorenia, liečba, prevencia, liečivá na zmiernenie bolesti a iné) alebo z kozmetických dôvodov a zahŕňajú terapeutické liečivá, fytotherapeutiká, biotechnologické produkty, voňavky či kozmetiku, veterinárne liečivá ^{2, 3}. Liečivá sú klasifikované podľa terapeutického využitia do rôznych skupín (antibiotiká, analgetiká, antidepresíva,...) a predstavujú látky významnej celosvetovej spotreby ³. V Európe a USA je približne 4 000 rôznych farmaceuticky aktívnych zlúčenín, ktoré sú komerčne využívané ako veterinárne liečivá alebo humánne liečivá ⁴. Vzhľadom na ich stále narastajúce a nekontrolovateľné používanie sa tieto látky stávajú so zvýšeným rizikom možnými kontaminantmi životného prostredia, čo vyplýva z ich vlastnej biologickej aktivity, ktorá môže mať nežiaduci efekt na vodný, ale aj pôdny ekosystém, obzvlášť pri chronickom vystavení ^{5, 6}. Práve kvôli ich pretrvávajúcemu vstupu do životného prostredia sú tiež označované ako „pseudoperzistentné zlúčeniny“ v ekosystéme ⁷.

2.1.1 Vstup farmák do prostredia

Molekuly liečiva sa po vstrebaní v ľudskom tele a tele zvieratá zúčastňujú viacerých biochemických reakcií v procese biotransformácie. V prvej fáze biotransformácie dochádza k oxido–redukčným a hydrolytickým reakciám za účasti enzýmov (CYPs, MAO, alkoholdehydrogenasa, hydrolasy, ...) za vzniku polárnejších molekúl vzhľadom k molekule materskej. Produkty I. fázy sú substrátmi reakcií druhej fázy biotransformácie, kde dochádza ku konjugácii s endogénnymi látkami (kyselina

glukuronová, glutathion, kyselina sírová, ...) a vznikajúce látky sú polárnejšie, obvykle menej toxické ako metabolity I. fázy a sú následne vylučované prostredníctvom moču a stolice^{4,8}. Významnou špecifitou metabolizmu je teda strata aktivity natívnej zlúčeniny liečiva. Avšak niektoré látky sú aktivované až po metabolickej aktivácii enzymatickým systémom z materskej látky na metabolit⁴ a niektoré liečivá sú vylučované bez metabolickej úpravy vo forme natívnych látok. Takto neupravené liečivá, aktívne či neaktívne metabolity vstupujú prostredníctvom kanalizačného systému ďalej do odpadných vôd⁹.

Hlavný vstup liečiv do životného prostredia je práve preto cez odpadové vody, a to hlavne výtoky z čistiarní odpadových vôd, až do povrchových či podzemných vôd. Prítomnosť liečiv v odpadových vodách je daná ich vylučovaním ľuďmi a zvieratami a z likvidácie farmaceutických prípravkov z domácností¹⁰. Čistiarne odpadových vôd nie sú schopné bezo zvyšku odstrániť stopy liečiv, a tak sa ďalej dostávajú do už prečistenej vody. Ďalšími zdrojmi farmák v životnom prostredí sú opätovné zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy s odpadovou vodou, priemyselná produkcia liečiv a likvidácia nepoužitých i exspirovaných liekov na skládkach, nemocnice a odpadové kaly používané ako hnojivo na poľnohospodárske pôdy. Liečivá prítomné v hnojive priamo kontaminujú pôdy a odplavením z polí sa takto môžu transportovať až do povrchových a podzemných pôd^{4,7,10}.



Obr. 2.1.1 Výskyt a hlavné cesty vstupu liečiv do životného prostredia ¹¹.

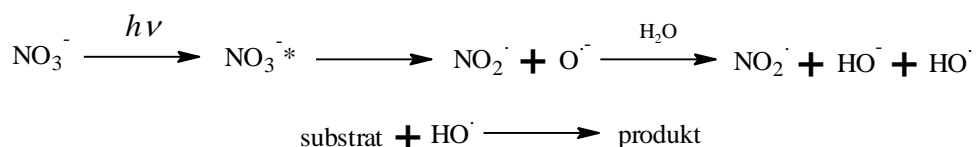
2.1.1.1 Vlastnosti liečiv a faktory ovplyvňujúce prítomnosť farmák v životnom prostredí

Osud liečiv, ktoré sú považované za látky znečisťujúce životné prostredie, v ekosystéme a biologický účinok sú hodnotené na základe ich fyzikálne–chemických a biologických vlastností. Liečivá môžu byť zásadité, kyslé, neutrálne, veľké polyméry, ako proteíny, sacharidy, alebo ako komplexné zlúčeniny. Distribúcia liečiv v tele je určená ich schopnosťou prechádzať lipidickou dvojvrstvou, a teda hlavnými vlastnosťami, ktoré ovplyvňujú prechod biologickými membránami sú lipofilita, schopnosť tvoriť vodíkové väzby, náboj a veľkosť. Najmä lipofilita molekuly určuje, kde sa bude liečivo v životnom prostredí vo väčšej miere kumulovať ⁹.

Taktiež faktory ako prítomnosť heteroatómu a viacerých funkčných skupín v molekule podmieňuje jej polaritu, ionizovateľnosť a rozdielne správanie v závislosti na pH, v ktorom sa nachádzajú. Stupeň ionizovateľnosti liečiva pri jednotlivých hodnotách pH významne ovplyvní jeho dostupnosť biologickým organizmom, jeho fyzikálne–chemickú aktivitu a jeho konečný výskyt v ekosystéme. Liečivá kyslej povahy (NSAIDs, kyselina klofibrová, gemfibrozil, ...), ktoré sa v neutrálnom pH

vyskytujú v iontovej forme, sa budú v malej miere adsorbovať na sediment či kal, naopak, ich výskyt bude prevládať vo vode a ochotne budú prechádzať cez výtoky z čistiarní odpadových vôd až do vôd povrchových. Zásadité liečivá (fluorochinolónové antibiotiká, ...) sa budú adsorbovať na sediment. Sorpcia na sediment zahŕňa viacero mechanizmov ako iontovú výmenu, povrchovú adsorpciu na minerály, tvorbu komplexov s kovmi, tvorbu vodíkových väzieb, asociáciu s organickým materiálom a iné ^{2, 3, 9}.

Ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje koncentráciu liečiv v životnom prostredí, je fotodegradácia. Farmaká podliehajú v povrchovej vode abiotickej premene – priamej alebo nepriamej fotolýze. Priama fotolýza je spôsobená priamou absorpciou slnečného žiarenia, zatiaľ čo nepriama fotolýza je podmienená prítomnosťou prirodzených fotosenzitizérov ako nitráty a huminové kyseliny. Tieto prirodzene vyskytujúce sa látky vplyvom slnečného žiarenia generujú silné oxidačné látky ako sú hydroxylové radikály a jednomocný kyslík ¹².



Na druhej strane, huminové kyseliny absorbujúce slnečné žiarenie môžu slúžiť ako inertné filtre a redukovať tým stupeň fotodegradácie iných organických látok prítomných v životnom prostredí ¹². Fotolytické reakcie sú často komplexné a vzniknuté produkty môžu stratiť svoju aktivitu a/alebo toxicitu, byť rovnako toxické ako pôvodná zlúčenina (zachovanie antibiotickej aktivity), alebo toxickejšie ⁴. Podstatný vplyv na mieru fotodegradácie v povrchových vodách má zmena v intenzite slnečného žiarenia, ktorá sa mení v závislosti na zemepisnej šírke a ročnom období ¹². Viaceré štúdie naznačujú, že fotodegradácia liečiv prebieha podľa kinetiky pseudo-prvého rádu ¹³. Fotolýza hrá významnú úlohu pri odstraňovaní farmák z vody, ako napríklad diklofenak z povrchovej vody, a významne prispieva k rozkladu sulfametoxazolu, propranololu a ofloxacinu ³.

Na koncentráciu farmák v životnom prostredí významne vplýva aj veľkosť populácie v danej oblasti ¹⁴ a rozdiely v produkcii liečiv a ich používaní ¹⁵.

2.1.2 Správanie farmák v čistiarniach odpadových vôd

2.1.2.1 Opis procesu čistenia odpadových vôd

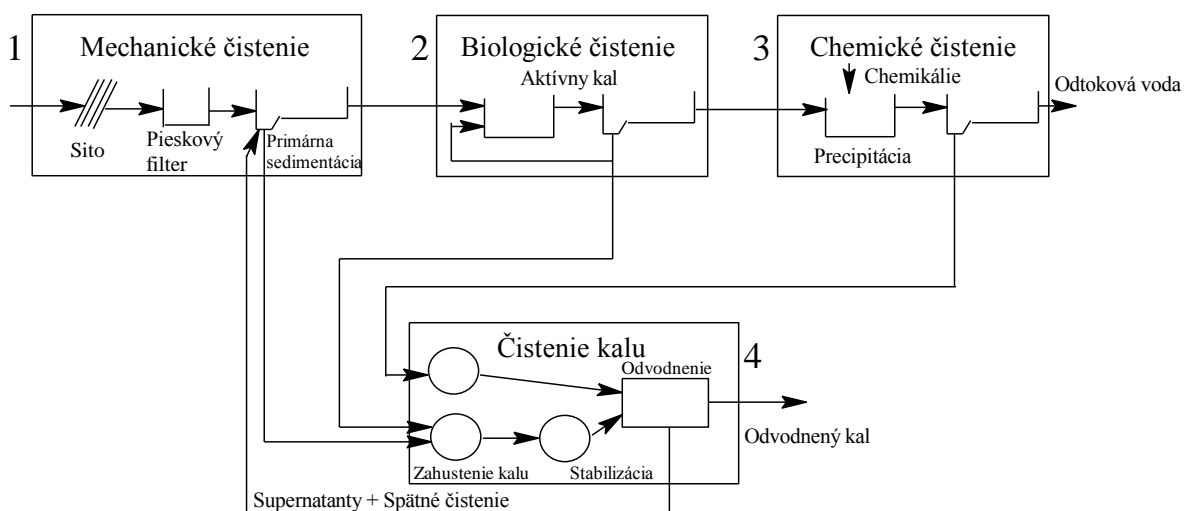
Čistiarne odpadových vôd sú vodohospodárske objekty, ktoré slúžia na zneškodnenie a likvidáciu polutantov v odpadových vodách pomocou transformácie a separácie a prípadne využívajú vzniknuté produkty. V súlade s charakterom odpadových vôd, požadovanej kvality odtoku z čistiarní a iných environmentálnych a sociálnych faktorov rozlišujeme čistiareň mestských, poľnohospodárskych, priemyselných a iných odpadových vôd. Hlavnými produktmi čistiarní sú vyčistená odpadová voda, kal a plyn^{16,17}.

V čistiarniach prebieha vlastné čistenie odpadových vôd a skladá sa z mechanického, fyzikálneho, chemického a biologického procesu. Fyzikálne čistenie zahŕňa cedenie, sedimentáciu, flotáciu, filtráciu a membránové techniky. Chemické čistenie zase pozostáva z koagulácie, chemického zrážania koloidov a jemne suspendovaného materiálu, ako aj z precipitácie rozpusteného materiálu. Biologické čistenie je založené na biologických kultúrach, ktoré pozostávajú z baktérií, jednobunkových foriem života, a tiež niektorých viacbunkových foriem života. Organické látky prítomné v odpadových vodách slúžia ako potrava a zdroj energie pre rast mikrobiálnej kultúry. Mikrobiálna kultúra môže rásť buď suspendovaná vo vode, alebo fixovaná na povrchu ako napríklad na biofilmoch. Suspendovaný rast je používaný v reaktoroch s aktívnym kalom, kým fixovaný rast sa využíva v reaktoroch s pevným podkladom. Biologické čistenie je v reaktoroch s aktívnym kalom dokončené separáciou kalu od vodnej fázy v separačnej jednotke a potom sa kal vracia späť do biologického reaktoru. Prebytok kalu, ktorý sa vytvorí počas procesu, je odstránený a prečistený v procese kalového čistenia, kde je kal stabilizovaný a odvodnený. Stabilizáciou kalu sa dosiahne jeho biologická bezpečnosť a môže byť ďalej využívaný ako hnojivo^{16,17}.

Jednotlivé druhy čistenia sú spojené do rôznych úrovní čistenia známych ako predbežné, primárne, pokročilé primárne, sekundárne (bez alebo s odstránením živín) a pokročilé (terciárne) čistenie. V predbežnom čistení sú odstránené veľké časti, ktoré

by mohli zničiť vybavenie. V primárnom čistení sú používané fyzikálne procesy ako sedimentácia na likvidáciu plávajúceho a usadeného materiálu, ktoré sú prítomné v odpadovej vode. V priebehu pokročilého primárneho čistenia sú do vody pridané chemikálie, aby sa zvýšila efektívnosť odstránenia suspendovaných pevných častíc. Počas sekundárneho čistenia sú využívané biologické a chemické procesy na zlikvidovanie organického materiálu. Na záver sú zvyškové suspendované pevné látky a zložky, ktoré neboli zničené počas predchádzajúcich čistení, odstránené v pokročilom (terciárnom) čistení¹⁸.

Účinnosť odstránenia polutantov v jednotlivých procesoch alebo v ich kombinácii je určená hodnotou čistiaceho účinku. Čistiaci účinok vyjadruje pomer úbytku koncentrácie znečisťujúcej látky docielený jedným alebo kombináciou viacerých procesov, ku koncentrácii danej látky v prítoku odpadovej vody. Čistiaci účinok sa vyjadruje v percentách¹⁷.



Obr. 2.1.2.1.1 Všeobecné usporiadanie procesov v čistiarniach odpadových vôd¹⁶.

2.1.2.2 Chovanie liečiv počas čistenia odpadových vôd

Liečivá sú často formované tak, aby boli chemicky stále a dostali sa v tele na svoje miesto účinku. Viaceré sú neprchavé, polárne a nepodliehajú biodegradácii, čo je dôsledkom ich nekompletného odstránenia počas primárneho či sekundárneho čistenia v čistiarniach odpadových vôd¹⁹. Keďže čistiarne odpadových vôd nie sú primárne stavané na odstránenie týchto mikropolutantov, dostávajú sa prostredníctvom odtokov z čistiarní ďalej do životného prostredia, či už vody alebo pôdy²⁰.

Odstránenie farmaceutických látok v čistiarniach je vo všeobecnosti hodnotené ako hmotnostná bilancia medzi koncentráciou v prítoku a odtoku odpadovej vody. Za hlavné procesy likvidácie liečiv sú považované biodegradácia a sorpcia na čistiarenský kal. Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú efektivitu procesu čistenia odpadových vôd patria vek čistiarenského kalu, teplota, čas zdržania, rozdeľovací koeficient pevná fáza–voda (K_d) a môže tu dochádzať aj k dekonjugácii liečiva, čo má však negatívny vplyv na jeho likvidáciu^{6, 21, 22}.

Biodegradácia je jedna z možností, kde dochádza k zníženiu koncentrácie pôvodnej látky a/alebo jej metabolitov počas čistenia odpadových vôd. Môže k nej dôjsť už v potrubí, ktoré vedie odpadovú vodu do čistiarní, ale v hlavnej miere je zastúpená v sekundárnom čistení, kde sú látky vystavené veľkej koncentrácii mikroorganizmov. Vo všeobecnosti je možné povedať, že molekuly s rozvetvenými, dlhými bočnými reťazcami budú v menšej miere prístupné biodegradácii v porovnaní s nerozvetvenými zlúčeninami s krátkymi bočnými reťazcami a nenasýtené alifatické látky budú ochotnejšie biodegradovať oproti nasýteným analógom aromatických látok so zložitou štruktúrou aromatických kruhov a sulfonovou alebo halogénovou skupinou²².

Ďalším dôležitým efektom, ktorý sa podieľa na dekontaminácii liečiv, je sorpcia na čistiarenský kal. Sorpcia závisí na fyzikálnych a chemických vlastnostiach zlúčeniny a na charakteristike kalu. Účinnosť sorpcie na kal je hodnotený na základe tzv. rozdeľovacieho koeficientu pevná fáza–voda (K_d), ktorý môže byť stanovený experimentálne alebo výpočtom. Koeficient K_d korešponduje distribúciou farmák medzi primárnym kalom a prítokom odpadovej vody a medzi sekundárnym kalom a odtokom

odpadovej vody ⁶. Látky s vysokou hodnotou K_d sa budú prednostne adsorbovať na pevné častice, a teda budú vo väčšej miere likvidované počas čistenia aktívnym kalom, naproti tomu látky s nízkou hodnotou K_d zostanú prítomné vo vodnej fáze. Negatívne nabité funkčné skupiny v aktívnom kale budú prispievať k elektrostatickému odpudzovaniu látok v neutrálnej alebo aniontovej forme. Takýmto spôsobom môže byť výrazne zredukovaná prítomnosť tonalidu a galaxolidu, ktoré ochotne adsorbujú na kal v biologických reaktoroch. Tetracyklíny sa taktiež vo všeobecnosti veľmi silno adsorbujú na kal tvorbou komplexov s kovmi asociovaných s kalom a reakciou kationtovej výmeny ^{20, 23}.

Správanie sa liečiv počas čistenia je ovplyvnené viacerými faktormi a jedným z nich je čas zdržania. Dostatočný čas zdržania odpadových vôd v reaktoroch pozitívne koreluje s odbúravaním organického materiálu, a teda predĺženie doby zdržania zvyšuje efektivitu degradácie liečiv počas procesu čistenia odpadových vôd ^{21, 24}. Medzi ďalšie faktory patria vek čistiarenskeho kalu a teplota. Zatiaľ čo účinnosť degradácie liečiv rastie pri čistení aktívnym kalom spolu s vekom čistiarenskeho kalu ¹³, rastúca teplota môže mať pozitívny, ale aj negatívny vplyv na ich likvidáciu. Biodegradácia a sorpcia na kal sú procesy teplotne závislé. Pre mnoho zlúčenín platí, že sorpcia rastie so znižujúcou sa teplotou, avšak efektivita biodegradácie rastie naopak so zvyšujúcou sa teplotou ^{19, 24}.

V druhej fáze biotransformácie dochádza v organizme ku konjugácii produktov prvej fázy s endogénnymi látkami ako kyselina glukuronová alebo H_2SO_4 . Tieto látky podliehajú v odpadovej vode, ale aj v priebehu čistenia, spätnej dekonjugácii v dôsledku prítomnosti baktérií v aktívnom kale ²⁴ a veľkého množstva β -glukuronidasy (produkt baktérie *Escherichia coli* vo výkaloch). Výsledkom je zvýšená koncentrácia pôvodného liečiva v odtoku z čistiarní, a teda dekonjugácia je považovaná za faktor, ktorý negatívne vplýva na odstraňovanie liečiv z odpadovej vody ²². V štúdií M. Carballa a spol. bol takto preukázaný nárast koncentrácie estrónu po sekundárnom čistení, čo bolo spôsobené oxidáciou 17 β -estradiolu ²³. Tiež koncentrácie furosemidu, diklofenaku, metoprololu, gemfibrozilu, propranololu alebo karbamazepinu boli zaznamenané vyššie v odtoku ako prítoku odpadovej vody, čo mohlo byť spôsobené dekonjugáciou, a/alebo uvoľnením z pevnej matrice ¹⁹.

Čistiarne odpadových vôd v rozvojových krajinách sú vo všeobecnosti menej pokročilé, ako vo vyspelých krajinách. Príkladom je väčšina krajín juhovýchodnej Ázie, kde využívajú len primárne čistenie. Viaceré štúdie poukazujú na fakt, že aeróbna a anaeróbna biodegradácia je najdôležitejší proces, kde dochádza k odstráneniu farmaceutických produktov z vody a teda k najúčinnnejšej likvidácii dochádza najmä počas sekundárneho čistenia. Koncentrácia farmaceutických zlúčenín v povrchovej vode v rozvojových krajinách bude preto vyššia ako v krajinách vyspelých. Managaki a spol. testovali distribúciu 12 druhov antibiotík vo vode z delty rieky Mekong vo Vietname a zistili extrémne vysokú koncentráciu sulfamethazinu v odpadovej vode z prasacej farmy. Naproti tomu nezaznamenali výraznú koncentráciu tohto liečiva v povrchovej vode vyspelých krajín v Japonsku alebo USA ^{13, 25}.

Jednotlivé procesy a faktory ovplyvňujúce čistenie odpadových vôd sú individuálne pre každé liečivo v závislosti na charaktere liečiva a jeho koncentracii v odpadovej vode.

Nasledujúca tabuľka zobrazuje účinnosť čistenia vybraných liečiv ^{19-21, 23}.

Tab. 2.1.2.2.1 Účinnosť čistenia vybraných liečiv v čistiarnach odpadových vôd ^{19-21, 23}.

Liečivo	Čistiaci účinok (%)
Bezafibrát	9,5 - 98,3
Kofeín	94 - 99,8
Klotrimazol	18,2 - 91,5
Karbamazepin	0 - 72,1
Diklofenak	22 - 82,1
Furosemid	0 - 33,9
Gemfibrozil	75 - 90,6
Pravastatín	0 - 74,2
Propranolol	33,3 - 40
Kyselina salicylová	0 - 99,4
Trimetoprim	0 - 94,6
Sulfametoxazol	17 - 98
Ibuprofén	84,3 - 99,7

2.1.3 Výskyt liečiv v ekosystéme

2.1.3.1 Prítomnosť liečiv v pôde a sedimente

Všadeprítomnosť liečiv v životnom prostredí je odrazom ich zvyšujúcej sa produkcie a spotreby, rovnako ako ich nedostatočného odstránenia v čistiarniach odpadových vôd a dôsledkom poľnohospodárskej činnosti. Globálne používaný spôsob zavlažovania pôdy s prečistenými odpadovými výtokmi dodáva úrode živiny a vodu a zároveň redukuje efekty priameho vypúšťania výtokov z čistiarní do vodných útvarov a pobrežných zón²⁶. Najvýznamnejšou cestou, akou sa dostávajú liečivá, ich metabolity alebo degradačné produkty do pôdy, je aplikáciou kompostu či tekutého hnojiva (močovky) na poľnohospodársku pôdu, alebo priamo výkalmi zvierat, ktoré boli kŕmené potravou s prídavkom antibiotík, či veterinárne ošetrované. Následne sa povrchovým odtokom a odnášaním alebo výluhmi dostanú do hlbších pôdných vrstiev²⁷.

Aplikácia zvieracieho hnoja alebo močovky môže mať vplyv na fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy, do čoho spadá kapacita zadržiavania vody, pH a mikroflóra²⁷. Rovnako ako pri čistení odpadových vôd, aj tu je hlavným uplatňujúcim sa procesom sorpcia na prírodné pevné fázy (sediment, pôda). Tento proces ďalej interferuje s inými procesmi, ktoré sa uplatňujú pri kontakte s pevnou fázou ako transport, reaktivita a biodegradácia. Sorpcia je závislá na vlastnostiach pevnej fázy, matrice (pH, celkový obsah organického uhlíka, zloženie zrnitostné a mineralogické) a od vlastností liečiv (K_{ow} , pK_a)²⁸.

V laboratórnom výskume E. Pérez-Carrera zameranom na vývoj analytickej metódy pre detekciu 32 rozdielnych liečiv v reálnych vzorkách pôdy z poľnohospodárskej oblasti a sedimentu z rieky Guadalete bola zistená prítomnosť 9 z nich zahrňujúc stimulanty, anireumatiká, analgetiká, protizápalové liečivá, sedatíva a veterinárne liečivá na koncentračnej úrovni ng/g, čím bol jasne preukázaný výskyt rôznych druhov farmák v suchozemskom prostredí ako dôsledok antropogénnej a poľnohospodárskej aktivity. Prítomnosť omeprazolu bola v pôde aj v sedimente s maximálnou koncentráciou 6,5 ng/g a 4,5 ng/g. Losartan a diazepam boli nájdené na koncentračnej úrovni nižšej ako LOQ a spironolakton s koncentráciou 0,6 ng/g v pôde.

Allopurinol bol detegovaný iba v sedimente v rozmedzí LOQ a 3,3 ng/g a cimetidín bol nájdený v najvyššej koncentrácii 7,8 ng/g. Liečiva ako diklofenak, prednisolon a cyproteron acetát boli detegované na úrovni nižšej ako LOQ¹⁰.

Jedným z dôsledkov hnojenia ílovitých zemín močovkou je zvýšenie pH pôdnej vody, čím dochádza ku zvýšeniu mobility kyslých a zásaditých látok, a teda ich sorpcia na pôdu či sediment klesá. Kyslé zlúčeniny budú mať vo vyššom pH negatívny náboj, čo zapríčini ich nízku sorpciu na pôdu, ktorá je negatívne nabitá, a zase zásadité zlúčeniny budú migrovať ochotnejšie v dôsledku potlačenia ich kladného náboja s narastajúcim pH. J.-W. Kwon skúmal mobilitu sulfonamidov a tetracyklínov meraním koncentrácie výluhov z ílovitej zeminy po aplikácii hnojiva za laboratórnych podmienok počas 9 dní so záverom, že väčšiu pohyblivosť mali sulfonamidy (sulfametazin = sulfatiazol > sulfametoxazol) ako tetracyklíny (chlortetracyklín > oxytetracyklín). Tetracyklíny budú teda s najväčšou pravdepodobnosťou pretrvávajúť v pôde, zatiaľ čo sulfonamidy môžu ďalej prispievať ku kontaminácii povrchovej a podzemnej vody práve ich vylúhovaním z pôdy. Množstvo močovky použitej ako hnojivo na poliach dosahuje maximálnu hodnotu 50 m³/ha, z čoho vyplýva, že takto sa do pôdy môže dostať až 1 kg/ha sulfonamidových zvyškov, čo je zrovnateľné s množstvom používaných moderných pesticídov²⁷.

2.1.3.2 Prítomnosť farmák vo vode

Najväčším zdrojom liečiv vo vode je prostredníctvom odtokov z čistiarní odpadových vôd, či už mestských, nemocničných, vyrábajúcich liečivá alebo poľnohospodárskych¹⁵. Ich prítomnosť v životnom prostredí bola po prvýkrát zaznamenaná v roku 1976 Garrisonom a spol., ktorí detegovali kyselinu klofibrovú v prečistenej odpadovej vode v USA v koncentrácii 0,8 – 2 µg/l^{13, 29}. V roku 1981 sa našli farmaceutické zlúčeniny aj v riekach v UK a v roku 1986 boli liečivá ibuprofén a naproxen nájdené v odpadovej vode v Kanade. Vzhľadom na stále vyvíjajúce sa analytické techniky a s nimi aj čoraz nižšie medze detekcie sa čoraz viac objavujú publikácie zaoberajúce sa výskytom liečiv špeciálne vo vodnom prostredí. Najrozšírenejšou látkou vyskytujúcou sa vo vodách je kofeín, ktorý je nielen prijímaný

v káve, čaji, alebo čokoláde, ale aj ako psychostimulancium. Medzi ďalšie látky, ktoré sú všadeprítomné v povrchovej a odpadovej vode, patria diklofenak, kyselina klofibrová, acetaminofen, ibuprofén, aspirín, karbamazepín, atorvastatín, gemfibrozil, fluoxetín a 17 β -ethynylestradiol²⁹. Koncentrácia liečiv a ich metabolitov sa vo všeobecnosti pohybuje v rozmedzí od $\mu\text{g/l}$ v odtokoch z čistiarní odpadových vôd až po ng/l v riekach, jazerách a morskej vode v dôsledku kombinácie efektov ako biodegradácia a riedenie¹³.

Tien-Hsi Fang a spol. sa vo svojej štúdií zaoberali prítomnosťou štyroch farmák (ibuprofén, diklofenak, ketoprofén a klofibrát) v odtoku z čistiarní a v prímorskej vode a tiež ich polčasom života a sledovaním vplyvu salinity na vybrané liečivá. Pre jednotlivé látky bol polčas života v rozmedzí 3 – 18 dní s tým, že najdlhší polčas spomedzi štyroch spomínaných liečiv namerali pre kyselinu klofibrovú a to 8,8 – 18,1 dňa, a naopak najkratší polčas približne 3 – 4 dni mal ketoprofén. S výnimkou ketoprofénu salinita mala vplyv na degradáciu farmák, avšak toto zistenie nie je jasne vysvetliteľné. Farmaceutické zlúčeniny teda nie sú vo vodnom prostredí perzistentné, ale môžu byť fotochemickou a biologickou oxidáciou degradované. Čo sa týka prítomnosti liečiv v prímorskej vode, je možné zaznamenať ich výskyt pochádzajúci z vypúšťania odtokov z čistiarní odpadových vôd alebo pôdy, avšak väčšinou pod limitom detekcie práve z dôvodu kombinácie riediaceho efektu, fotodegradácie a biodegradácie¹³.

Existuje mnoho štúdií, ktoré sa zaoberajú výskytom a osudom farmák vo vodnom prostredí a sledovaním koncentrácie v prítoku a odtoku vody z čistiarní. S. Mompelet, O. Thomas a B. Le Bot sa zamerali na detekciu 20 humánných liečiv nielen v povrchovej vode ale aj v pitnej vode vo Francúzsku. V pitnej vode je koncentrácia farmák značne nižšia oproti koncentrácii v povrchovej vode, na úrovni ng/l , čo je pripisované najmä vysokej efektívnosti ich likvidácie v procese čistenia a v tomto prípade to bolo približne dva až štyrikrát. Jediný kofeín bol rezistentný voči čisteniu či už pitnej (s minimálnou mierou 5 %) alebo povrchovej vody, čím sa stáva potenciálnym ukazovateľom antropogénneho znečistenia. Ostatné skúmané humánne liečivá boli pomerne efektívne eliminované s priemernou účinnosťou nad 50 % adsorpciou na aktívne uhlie a oxidáciou/dezinfekciou s ozónom alebo chlóróm.

Rôznorodé zastúpenie humánných liečiv vyskytujúcich sa aj v pitnej vode predstavuje preto reálnu hrozbu pre ľudské zdravie³⁰.

2.2 Biologické efekty liečiv v životnom prostredí

Liečivá sú vyrábané s cieľom, aby vyvolali biologický efekt. Ich rozsiahle a stále narastajúce používanie v humánnej a veterinárnej medicíne a zároveň ich všadeprítomnosť a vypúšťanie do životného prostredia vyvoláva čoraz väčšie obavy, že tieto látky môžu mať negatívny dopad na necieľové organizmy v ekosystéme aj v nízkych koncentráciách^{5, 29}.

2.2.1 Hodnotenie ekologického rizika

Ekotoxické testovanie pre registráciu nových liečiv bolo prvýkrát v Európskej únii vyžadované Smernicou 92/18 EEC a korešpondujúcimi Metodickými pokynmi pre veterinárne liečivá. Podľa Smernice 2001/83/ES, žiadosť o registráciu nového medicínskeho produktu určeného na humánnu liečbu musí byť doplnená o hodnotenie ekologického rizika^{2b9}. Všeobecné princípy a smernice týkajúce sa hodnotenia ekologického rizika sú určované Európskou agentúrou pre lieky (European Medicines Evaluation Agency, (EMEA)) a Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drug Administration, (FDA))⁷.

Hodnotenie ekologického rizika je založené na porovnaní medzi predpokladanou environmentálnou koncentráciou (predicted environmental concentration, (PEC)) a koncentráciou, pri ktorej nie je predpokladaný škodlivý účinok (predicted no effect concentration, (PNEC)), vyjadrením čoho je relatívne rizikové skóre (risk quotient, (RQ))^{6, 7, 13, 31}.

$$RQ = PEC/PNEC$$

Hodnoty PEC sa stanovujú z modelových výpočtov a/alebo z predchádzajúcich meraní. Hodnoty PNEC sú určené metódami ekotoxikologického sledovania.

Hodnotenie ekologického rizika je podľa hodnoty RQ rozčlenené do viacerých úrovní ^{6, 7, 31}:

- 0,01 – 0,1 nízke riziko
- 0,1 – 1 stredné riziko
- >1 – vysoké riziko

Súčasnú pokyny požadujú takéto hodnotenie (environmentálny osud, analýza biologického účinku), ak sa predpokladá, že koncentrácia liečiva v povrchovej vode prekročí hodnotu 10 ng/l v Európe a ≥ 1 $\mu\text{g/l}$ vo výtoku z čistiarní odpadových vôd v USA a pri prekročení môže byť nariadená kontrola nad používaním a likvidáciou takéhoto liečiva ^{3, 29, 32}. Medzi najrizikovejšie látky vyskytujúce sa vo výtokoch z čistiarní odpadových vôd a zároveň v povrchových vodách patria nesteroidné analgetiká (ibuprofén, diklofenak, naproxen, ketoprofén) a karbamazepín ⁷.

2.2.2 Vplyv liečiv na mikrobiálnu a bakteriálnu funkciu

Rozsiahle používanie antibiotík proti patogénom u ľudí a zvierat, ale aj na konzerváciu potravín či priemyselne produkované antimikrobiálne činidlá a ich preukázaná prítomnosť vo vodných útvaroch a pôde zapríčiňuje formovanie rezistentných organizmov *Aeromonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* a *Staphylococcus* a k najviac prevládajúcim patria vankomycin- rezistentné enterokoky, meticilín- rezistentné *Staphylococcus aureus* a multirezistentné pseudomonády ^{2, 9}. Rezistencia mikroorganizmov je daná expresiou génov, ktoré kódujú proteíny zodpovedné za vylučovanie antibiotík do extracelulárneho priestoru (cez protónové pumpy), syntézu enzýmov, ktoré odbúrávajú molekulu použitím inaktivátorov a sú zodpovedné za modifikáciu cieľového miesta alebo terapeutického cieľa pre antibiotikum. V prípade, že sa tieto mikroorganizmy dostanú do kontaktu, či už priameho, alebo cez vodu, jedlo, ak sú rastliny zavlažované vodou, odpadovou vodou či čistiarenským kalom obsahujúcim rezistentné baktérie alebo gény rezistentné na antibiotiká, ktoré sa nepodarilo zničiť, s človekom, môžu zvýšiť mortalitu v hostiteľovi práve v dôsledku neúčinného pôsobenia liečiv ^{2, 9}.

Gerty J. H. P. Gielen a spol. sa vo svojej práci zamerali na sledovanie vplyvu vysokých koncentrácií farmák na pôdne mikrobiálne vlastnosti a dopad dlhotrvajúceho zavlažovania výtokmi z čistiarní odpadových vôd s obsahom liečiv na pôdnu mikrobiálnu funkciu. Vysoká koncentrácia študovaných liečiv (acetaminofen, karbamazepin, chlorpromazin, tetracyklíny a aspirin) mala za následok zvýšenie CO₂ dýchania a zníženie mikrobiálnej biomasy²⁶. Účinok antibiotík na pôdne mikrobiálne dýchanie je časovo závislý, ako vyplýva z výskumu Feng Liu a spol., kde bol zaznamenaný pokles dýchania počas prvých štyroch dní a naopak nárast respirácie v ďalších dňoch. Nadobudnutie a vzostup pôdnej respiračnej aktivity je pripisovaný zníženiu biodostupnosti antibiotík v dôsledku ich degradácie a zvýšeniu mikrobiálneho prispôsobenia sa a rezistencie. Prítomnosť antibiotík ovplyvňuje taktiež mikrobiálnu enzymatickú aktivitu. Koncentrácia antibiotík v pôde a hnoji dosahuje hodnoty > 91 mg/kg a bolo preukázané, že v životnom prostredí môže mať za následok inhibíciu fosfatasovej aktivity³³.

2.2.3 Účinky liečiv na vegetáciu

Zavlažovaním poľnohospodárskej pôdy odpadovou vodou a hnojením čistiarenským kalom sú liečivá v nich obsiahnuté ďalej prijímané rastlinami a môžu ovplyvniť ich vývoj. Rastlinný príjem liečiv bol zaznamenaný pre karbamazepin, sulfametoxazol, trimetoprim, ibuprofén a 17 α -ehtynylestradiol⁶. Nie je jasné, či negatívny vplyv na rastliny je spôsobený priamym poškodením rastliny samotnými liečivami, alebo nepriamo antimikrobiálnym pôsobením liečiv na pôdne mikroorganizmy, ktoré môže byť zodpovedné za narušenie symbiôzy medzi rastlinou a mikroorganizmami. Zníženie počtu pôdnych baktérií vedie k nedostatku potravy pre pôdnu faunu (protozoa, nematoda, mikro arthropoda) a vo výsledku ovplyvňuje pôdnu funkciu: rastlinné zvyšky sú pomalšie rozkladané, denitrifikácia je pomalšia, a potom aj živiny sú pomalšie recyklované, s následným vplyvom na rastliny⁹.

Antibiotiká môžu fungovať vo veľmi malých koncentráciách ako signálne látky v mikrobiálnom prostredí. Spoločné receptory pre niekoľko antibiotík a dezinfekčných činidiel boli identifikované aj v rastlinách s pôsobením na replikáciu chloroplastov

(fluorochinolóny), transkripciu a transláciu (tetracyklíny, makrolidy, linkozamidy, aminoglykozidy, pleuromutilíny), biosyntézu folátu (sulfonamidy a možno trimetoprim), syntézu mastných kyselín (triklozán) a biosyntézu sterolov (azoly, statíny)⁹. Účinky antibiotík na rastliny v pôde sa líšia medzi zlúčeninami a medzi rastlinnými druhmi. Bolo preukázané, že tetracyklíny zvyšujú výnos reďkvičiek, ale znižuje výnos strakatej fazule. Pestovanie kukurice a strakatej fazule v pôde, do ktorej bol pridávaný chlortetracykín malo zase za následok výrazné zvýšenie aktivity rastlinných stresových proteínov glutatión S-transferasy a peroxidasy u kukurice, ale u fazule nie. Taktiež bolo zistené, že sulfametoxin v koncentrácii 300 mg/l značne spomaľuje rast *Amaranthus retroflexus*, *Plantago major*, *Rumex acetosella* a *Zea mays in vitro*, rovnako ako *Hordeum desthicum in vitro* ale aj v pôde³³.

Feng Liu a spol. študovali účinky šiestich antibiotík zo skupiny tetracyklínov a sulfonamidov, tylozín a trimetoprim na rôzne druhy rastlín v teste na klíčivosť semien a v teste zameranom na rast rastlín. Negatívny účinok bol závislý od druhu sledovanej rastliny a na klíčivosť semien mali toxickejší dopad sulfonamidy (s hodnotami EC50 pod 100 mg/l) a tetracyklíny (s hodnotami EC50 pod 300 mg/l). Inhibičné pôsobenie na rast rastlín bolo preukázané len pôsobením sulfonamidov³³.

2.2.4 Renálne poškodenie v dôsledku prítomnosti liečiv v ekosystéme

Prítomnosť liečiv v životnom prostredí neovplyvňuje len baktérie, mikrobiálne funkcie, či rastliny, ale má dopad aj na fungovanie orgánov v tele. U rýb, rovnako ako u cicavcov, bolo dokumentované, že diklofenak bráni stimulácii syntézy prostaglandínov v obličkách a u pstruha obecného bola táto skutočnosť preukázaná aj v environmentálne významnej koncentrácii 0,5 – 50 µg/l. Škodlivý vplyv diklofenaku bol zaznamenaný aj u pstruha dúhového, u ktorého na obličkách dochádzalo k nekróze endoteliálnych buniek, indukciu glomerulonefritídy a tiež hyalínovej kvapôčkovej degenerácii³.

Významný histopatologický nález na obličkách dospelého pstruha dúhového bol nájdený po 28 dňoch a vystavení diklofenaku (1,0 – 500 µg/l), rovnako aj u 18 mesačného pstruha obecného po 21 dňoch a koncentrácii diklofenaku 0,5; 5,0

a 50 µg/l. Avšak v inej štúdií sa uvádza, že žiadny histopatologický nález nebol preukázaný po vystavení počas 28 dní koncentráciám diklofenaku od 0,2 do 60 mg/l u mladej sladkovodnej ryby *Danio pruhoané*³⁴.

Významný negatívny preukázaný dopad v dôsledku veterinárne využívaného diklofenaku bol viac ako 95% pokles populácie supov od roku 1990 (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris*) v Ázii po konzumácii mŕtveho hovädzieho dobytku ošetrovaného týmto liečivom. Úhyn supov bol vyvolaný renálnym zlyhaním a viscerálnou dnou. Škodlivé pôsobenie diklofenaku bolo preukázané aj experimentálne na 42 supoch tmavých (*Gyps bengalensis*) z toho 33 dospelých a 9 mladých (28 s viscerálnou dnou a 14 bez nej) priamym perorálnym podaním a kŕmením supov diklofenakom liečeným dobytkom. Dnes sú tieto druhy supov podľa „BirdLife International“ označené ako kriticky ohrozené druhy³⁵.

2.2.5 Endokrinné pôsobenie liečiv v ekosystéme

Endokrinný systém tvorí časť komplexného biologického systému a je zodpovedný za syntézu, degradáciu a uvoľňovanie hormónov, ktoré regulujú biologické procesy ako metabolizmus a reprodukciu. V posledných rokoch bolo dokázané, že niektoré liečivá prítomné vo vodných útvaroch môžu narušiť niektoré endokrinné funkcie – produkciu hormónov (luteinizačný hormón, tyreotropný hormón, folikulostimulačný hormón) u rýb a zmeny v hladine estrogénu a androgénu u niektorých rýb a obojživelníkov².

Azoly pôsobiace proti hubám interagujú s niektorými enzýmami cytochróm P450 a inhibujú CYP19 (aromasu), ktorý je kľúčovým steroidným enzýmom majúcim účasť na hormonálnej premene estrogénu na androgén, čím môžu ovplyvniť endokrinný systém aj vodných stavovcov^{3, 36}. Klotrimazol zasahuje do aromasovej aktivity v gonádach a v mozgu lariev *Xenopus tropicalis* a spolu s liečivami kotokonazol a fadrozol pôsobia toxicky na rozmnožovanie rýb inhibíciou CYP11a a CYP17 a aromasy v koncentráciách nižších ako 11,1 nmol/l. Inhibícia enzýmov pozmeňuje produkciu niektorých steroidných látok (testosterón, 17β-estradiol, androstenedión) s rozličnými reťazovými reprodukčnými účinkami na samice a samce rýb ako pokles

v produkcii vajíčok, zníženie koncentrácie vitelogenínu v plazme, inhibíciu rastu vaječníkov³.

17 α -ethynylestradiol v environmentálne významných koncentráciách má silný účinok na ryby, v ktorých sa môže silne akumulovať a vyvoláva feminizáciu samcov rýb tým že indukuje tvorbu prekursoru samičieho žltého telieska vitelogeninu u samcov, formovanie samičieho reprodukčného kanálíku v semenníkoch a vznik takzvaného intersexu (charakteristický prítomnosťou oocytov v semenníkoch)³.

Medzi látky, ktoré môžu mať negatívny dopad na reprodukciu u živočíchov, patria aj nesteroidné analgetiká. V literatúre sa uvádza, že ibuprofén môže spôsobiť zmeny v neresení sa chovných párov *Oryzias latipes* pri vystavení ibuprofénu počas šiestich týždňov. Jinyoung Lee a spol. sa zamerali na štúdium zmien v reprodukcii sladkovodných kôrovcov (*Daphnia magna*, *Moina macrocopa*) a u ryby *O. latipes* pri dlhodobej expozícii diklofenaku. V tomto poradí boli efektívne koncentrácie nasledovné: 25 mg/l, 50 mg/l a 10mg/l. U kôrovcov malo vystavenie diklofenaku za následok zníženie reprodukcie a u *O. latipes* sa výrazne znížila úspešnosť liahnutia a dochádzalo k oneskoreniu liahnutia a dokonca pri koncentrácii 10 mg/l k liahnutiu už ani nedochádzalo. Avšak v životnom prostredí sa diklofenak v takto vysokých koncentráciách nevyskytuje, takže jeho priame pôsobenie v prírode nie je očakávané³⁷.

2.2.6 Prítomnosť liečiv v životnom prostredí ako príčina poškodenia DNA

Pri liečivách používaných dlhodobo v klinickej praxi je dôležité vedieť, či sú aj potenciálne genotoxické. Brambilla a Martelli zverejnili, že z 838 liečiv, ktoré sú na trhu dlhšie ako šesť mesiacov, alebo sú občasne používané avšak dlhodobo, 474 z nich mali pozitívny výsledok aspoň v jednom z testov na genotoxicitu a karcinogenitu^{38,39}.

Použitím umuC testu, založenom na krátkodobom testovaní geneticky modifikovaného kmeňa *Salmonella typhimurium*, a Amasovho testu na testovanie mutagenity boli dokumentované pozitívne zistenia v prípade ciprofloxacínu, sulfametoxazolu, linkomycínu a ofloxacínu. Genotoxické poškodenie bolo dokonca pozorované aj v koreňových špičkách pšenice pri pôsobení chlortetracyklínu vo vysokej

koncentracii, kde dochádzalo k chromozomálnym aberáciám, výmene medzi sesterskými chromatídami. Potenciál a mechanizmus genotoxicity šiestich často vyskytujúcich sa liečiv (erytromycín, sulfametazin, sulfatiazol, chlortetracyklín, oxytetracyklín a diklofenak) v ekosystéme študovali Xiaoshan Liu a spol. na slepačích DT40 bunkách. Testované liečivá vyvolali poškodenie DNA, ktoré pozastavili DNA replikáciu a viedli k chromozomálnym zlomom, ako aj k transléznej syntéze DNA sprostredkovanou mutagénnymi zmenami v DT40 bunkách, avšak použité koncentrácie boli niekoľkonásobne vyššie ako v prírode³⁹.

2.3 Spotreba farmák a významné farmaká ako indikátory znečistenia

2.3.1 Spotreba a výdaj najviac používaných liečiv

V celej Európskej únii a USA sú používané v humánnej medicíne rôzne druhy liečiv ako aj antibiotiká, protizápalové liečivá, azoly vo veterinárnej medicíne, a ich spotreba stále narastá. V Anglicku, Nemecku a Rakúsku spotreba niektorých liečiv presahuje dokonca 100 ton ročne²⁹. V roku 2008 celosvetový predaj liečiv dosiahol 602 miliárd amerických dolárov, čo predstavuje ročný nárast približne o 5 – 7 % a súvisí paralelne s výrazným pokrokom v medicínskej technológii a narastajúcimi výdajmi za zdravotnú starostlivosť. Medzinárodný trh poukazuje na značné rozdiely v používaní liečiv, čo je ovplyvnené ekonomickou situáciou krajiny, zdravotnými požiadavkami a nárokmi, výkonnosťou miestnej priemyselnej farmaceutickej výroby a legislatívou. Vyspelé krajiny dominujú globálnemu predaju liečiv s najväčším podielom 45% v Severnej Amerike (248 miliárd amerických dolárov v roku 2004), 13% v Európe, 10% v Japonsku a 1% v Austrálii³.

Nasledujúca tabuľka zobrazuje výdaj 30 najviac používaných liečiv v Českej republike za rok 2012^{40, 41}.

Tab. 2.3.1.1 Spotreba 30 najpoužívanejších liečiv v Českej republike za rok 2012^{40, 41}.

Liečivo	Podanie	Celkový počet DDD	DDD (mg)	Spotreba liečiv (tony)
Metformín	Perorálne	69 032 032	2000	138,1
Pentoxifylín	Perorálne	12 534 090	1000	12,53
Alopurinol	Perorálne	28 546 893	400	11,42
Theofylín	Perorálne	28 000 020	400	11,2
Metoprolol	Perorálne	69 019 866	150	10,35
Fenofibrát	Perorálne	38 462 525	200	7,692
Verapamil	Perorálne	14 784 292	240	3,548
Losartan	Perorálne	68 886 986	50	3,444
Furosemid	Perorálne	70 614 509	40	2,825
Atorvastatín	Perorálne	135 990 876	20	2,72
Nimesulid	Perorálne	13 570 908	200	2,714
Diklofenak	Perorálne	24 687 449	100	2,469
Omeprazol	Perorálne	100 050 134	20	2,001
Valsartan	Perorálne	21 584 109	80	1,727
Sertralin	Perorálne	30 038 478	50	1,502
Telmisartan	Perorálne	35 543 344	40	1,422
Isosorbid-mononitrát	Perorálne	32 059 440	40	1,282
Gliklazid	Perorálne	18 520 628	60	1,111
Atenolol	Perorálne	13 159 062	75	0,987
Trimetazidín	Perorálne	24 414 670	40	0,977
Betaxolol	Perorálne	46 800 781	20	0,936
Spironolakton	Perorálne	12 358 250	75	0,927
Simvastatín	Perorálne	27 750 535	30	0,833
Pantoprazol	Perorálne	19 222 075	40	0,769
Nitrendipin	Perorálne	34 203 220	20	0,684
Amlodipin	Perorálne	130 539 335	5	0,653
Betahistín	Perorálne	21 916 134	24	0,526
Citalopram	Perorálne	25 472 058	20	0,509
Rosuvastatín	Perorálne	49 937 239	10	0,499
Lansoprazol	Perorálne	15 639 387	30	0,469

2.3.2 Liečivá ako ukazovatele znečistenia vody v dôsledku antropogénnej činnosti

Ideálny ukazovateľ znečistenia vodného ekosystému by mal byť všadeprítomný v odpadových vodách a ideálne pochádzať iba z odpadových vôd, byť perzistentný a prítomný v detekovateľných koncentráciách v kontaminovaných environmentálnych vzorkách (ale nie v čistej vode) a nepodliehať biodegradácii, fotodegradácii alebo absorpcii v odpadových vodách či iných vodných útvaroch (alebo mať známu rýchlosť degradácie). Chemické indikátory znečistenia by preto mali mať vysokú rozpustnosť vo vode, nízky K_{ow} a prchavosť a navyše, ak sú to indikátory antropogénneho znečistenia, mali by byť produkované, konzumované a vylučované ľuďmi, alebo používané v domácnostiach, aby bolo možné rozlíšiť, či zdroj znečistenia pochádza od ľudí, alebo zvierat⁴². Medzi najvýznamnejšie indikátory znečistenia vôd patria kofeín, diklofenak a karbamazepin⁴³.

Kofeín, ako jeden z významných ukazovateľov znečistenia^{30, 43}, je vhodným indikátorom znečistenia povrchových, podzemných vôd a odpadových vôd z domácností. Je jednou z hlavných zložiek potravinových výrobkov a liečiv a najrozšírenejšie používanou chemickou látkou na svete. Vďaka jeho značnému používaniu v jedle, nápojoch a ako liečivo, je kofeín za rôznych environmentálnych podmienok stabilnou zlúčeninou s rozpustnosťou až 21,7 g/l a zanedbateľnou prchavosťou⁴⁴.

Karbamazepin nie je biodegradovateľný a nepodlieha ani absorpcii pri procese čistenia. Rezistencia na biodegradáciu bola preukázaná počas čistenia aktívnym kalom a taktiež aj pri filtrácii. Toto liečivo je zároveň rezistentné aj na fotodegradáciu a málo hydrofóbne a jeho odstránenie z vody je limitované. Karbamazepin je používaný iba v humánnej medicíne, čím sa stáva jasným dôkazom znečistenia zapríčineného ľuďmi. Rovnako môže byť používaný ako indikátor kontaminácie odpadovej vody v podzemných vodách a v ústí riek⁴².

Diklofenak je dôležité nesteroidné protizápalové liečivo, ktoré je široko využívané v humánnej, ale aj veterinárnej medicíne. Celosvetová spotreba diklofenaku presahuje 1000 ton ročne³⁴. V čistiarniach odpadových vôd je len v malej miere

biodegradovateľný a absorbovaný na aktívny kal^{34, 42}. Vzhľadom na jeho všadeprítomnosť v kontaminovaných vodách v koncentráciách od ng/l až µg/l sa stáva dobrým ukazovateľom znečistenia^{42, 43}.

2.4 Netradičné metódy odstránenia zvyškových koncentrácií farmák

Viacere čistiarne odpadových vôd po celom svete využívajú len dva procesy čistenia (fyzikálne a biologické) a súčasťou len malého počtu čistiarní je aj terciárne alebo pokročilé čistenie (ultrafiltrácia, flokulácia, ozonizácia, pokročilá oxidácia alebo osmóza). Vylepšené terciárne chemické procesy čistenia, ako napríklad TiO₂ fotokatalýza a niekoľko pokročilých oxidačných procesov, môžu byť preto dobrým riešením pri odstraňovaní mikropolutantov z vody⁹ a ďalším spôsobom na dekontamináciu ekosystému od liečiv by mohlo byť pomocou fyto-remediačných techník, či membránových bioreaktorov.

2.4.1 Pokročilé oxidačné procesy čistenia

Pokročilé oxidačné procesy (advanced oxidation processes, (AOPs)) sú definované ako procesy čistenia vody pri blízkej okolitej teplote a tlaku, ktoré sú založené na tvorbe hydroxylových radikálov potrebných k iniciácii oxidatívnej degradácii organického materiálu. Hydroxylový radikál je silný, neselektívny chemický oxidant, ktorý reaguje typicky milión až bilión krát rýchlejšie než ozón alebo peroxid vodíku. AOPs môžu spôsobiť rozklad látok, ktoré sú dokonca odolné voči bežným O₃ a H₂O₂ oxidáciám. Základ AOPs pri čistení odpadových vôd tvoria⁴⁵:

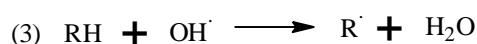
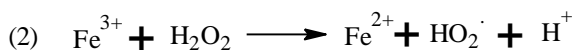
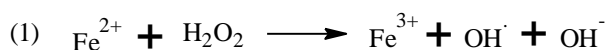
- *ozón (O₃)* - môže reagovať s organickým materiálom priamo, alebo nepriamo jeho rozpadom a tvorbou hydroxylových radikálov, alebo oxidácia organického materiálu môže nastať v dôsledku kombinácie reakcií s molekulárnym ozónom a reakcií s hydroxylovými radikálmi. Polčas života ozónu v priemyselných odpadových vodách je od menej ako minúta až po viac ako 30 minút v závislosti na

type a reaktivite polutantov s ozónom a na hodnote pH. So zvyšujúcim sa pH rastie aj rýchlosť dekompozície O_3 ⁴⁵.

- *peroxid vodíka (H_2O_2)* – sám o sebe nie je často používaný ako samotný oxidant kvôli jeho nízkej reakčnej rýchlosti, ale prevažuje jeho používanie v kombinácii s UV alebo inými oxidačnými činidlami ⁴⁵.

- *ozón + peroxid vodíka* – v pomere 2:1 s prídavkom H_2O_2 pri nízkych hodnotách pH sa zrýchli dekompozícia ozónu, čo má za následok zvýšenie tvorby hydroxylových radikálov. Peroxid vodíka reaguje s ozónom ako aniont HO_2^- za produkcie dvoch hydroxylových radikálov z dvoch molekúl ozónu ⁴⁵.

- *fentonova reakcia* – hydroxylové radikály sú rýchlo tvorené z rozkladu H_2O_2 za katalýzy s Fe^{2+} (1). Fe^{2+} môže byť ďalej pomaly regenerované (2). Organické látky sú oxidované vzniknutými hydroxylovými radikálmi. Vo všeobecnosti čistenie odpadovej vody fentonovou reakciou prebieha v štyroch fázach: oxidácia, neutralizácia, koagulácia/flokulácia a separácia pevnej a kvapalnej fázy ^{45, 46}.



- *fotooxidácia* – mnohé organické zlúčeniny absorbujú ultrafialové žiarenie a sú rozkladané priamou fotolýzou alebo prechádzajú do vzбудeného stavu a ďalej reagujú s chemickými oxidantami. UV žiarenie zrýchľuje rozklad molekúl O_3 a H_2O_2 . Napriek tomu, že fotochemické štiepenie H_2O_2 je jednoduchý spôsob získania hydroxylových radikálov, pri vlnovej dĺžke 254 nm dosahuje pomerne malý výťažok. Ozón ochotne absorbuje UV žiarenie pri 254 nm a rýchlosť tvorby OH^\cdot je 20-krát rýchlejšia v porovnaní so štiepením H_2O_2 . Fotolýza vodného ozónu produkuje H_2O_2 ako

medziprodukty reakcie, ktoré sú ďalej rozkladané na OH^{\cdot} .⁴⁵ Na rýchlosť reakcie dekompozície liečiv kyslej povahy majú negatívny vplyv humínové kyseliny, ktoré so zvyšujúcou sa koncentráciou reakciu spomaľujú. Rýchlosť reakcie rastie spolu s narastajúcou teplotou a klesá s narastajúcim pH⁴⁷.

- *fotokatalýza* – UV žiarenie slúži na excitovanie kovového katalyzátora v pevnom stave a vytvoreniu pozitívneho a negatívneho náboja na jeho povrchu. Pozitívny a negatívny náboj podporuje oxidoredukčné reakcie, a to oxidáciu organického materiálu v roztoku generovaným pozitívnym nábojom a redukciu iontov kovu alebo kyslíka negatívnym nábojom⁴⁵.

- *UV + TiO₂* – oxid titaničitý je stabilný v rôznych podmienkach, má veľký potenciál na produkciu radikálov a je ľahko dostupný, do procesu môže byť vnesený ako kaša alebo ako fixovaný katalyzátor. V kombinácii s UV žiarením dosahuje eliminácia až 90 % v priebehu štyroch hodín⁴⁵.

- *ožiarenie elektónovým lúčom* – ožiarenie vodného roztoku s vysokou energiou elektrónov vedie k rýchlej produkcii zlúčenín v excitovanom stave a voľných radikálov. Pri ožiarení sú tvorené najreaktívnejšie prechodné častice, a to hydroxylový radikál, redukčný elektrón z vody a hydrogénový radikál v ekvivalentnom pomere, ktoré redukujú alebo oxidujú organické či anorganické zlúčeniny vo vode⁴⁵.

- *sonolýza* – sonochemická dekompozícia organických polutantov je výsledkom tvorby a kolapsu vysoko energetických bublín vložení zvukovej energie v rozmedzí 15 kHz až 1 MHz, čo vedie k enormnému nárastu teploty a tlaku. Počas kolapsu bublín, čo trvá 100 ns, sa molekuly vody v plynnej fáze termálne rozštiepia a poskytujú hydroxylové radikály a atómy vodíka, ktoré potom slúžia na rozklad organických látok. Sonochemická deštrukcia polutantov môže byť zvýšená prídavkom napríklad aktívneho uhlia, reagentov z fentonovej reakcie, ozónu, CCl_4 a H_2O_2 ^{45, 48}.

2.4.2 Čistenie v membránových bioreaktoroch

Technológia membránových bioreaktorov kombinuje proces biologickej degradácie použitím aktívneho kalu so separáciou pevnej a kvapalnej fázy cez membránovú filtráciu. Eliminácia farmák môže byť realizovaná viacerými mechanizmami – sorpcia na kal, biodegradácia a membránové zadržanie. Sorpcia, ako jedna z nich, je založená na hydrofóbných interakciách alifatickej alebo aromatickej skupiny prítomnej v zlúčenine s tukmi nachádzajúcimi sa v kale alebo lipidovými membránami buniek mikroorganizmov, v závislosti na cieľovej K_{ow} hodnote. Nepochopiteľné látky sa absorbujú na biomasu a potom sú odstraňované s prebytkom kalu, zatiaľ čo polárne látky nie sú ani absorbované ani biodegradované. Účinnosť membránovej separácie je výrazne závislá na veľkosti použitých filtrov⁴⁹.

2.4.3 Fytoremediačné techniky

Fytoremediácia je definovaná ako priame použitie zelených rastlín a s nimi asociovanými mikroorganizmami na *in situ* sanáciu kontaminovanej pôdy, kalu, sedimentu a vody obmedzením, odstránením a degradáciou kontaminovanej látky. Výraz fytoremediácia sa skladá zo slov *phyto* = rastlina a *remediation* = napraviť škodu, ktorý bol prvýkrát použitý v roku 1991. Názov fytoremediácia, ktorý zahŕňa viacero technológií, bol nedávno nahradený výrazom fytotechnológie, ktoré sú založené na základných fyziologických mechanizmoch ako transpirácia, fotosyntéza, metabolizmus a minerálna výživa. Rastliny sa zakorenia do pôdy, sedimentu a vody a korene môžu prijať organické a anorganické zlúčeniny. Korene sú schopné stabilizovať a naviazať tieto látky na svoj povrch a zlúčeniny interagujú s mikroorganizmami v rhizosfére. Prijaté látky môžu byť transportované, uchované, premieňané a akumulované v rozličných bunkách a pletivách v rastline. Na degradácii organických látok v koreňoch rastlín sa podieľajú prítomné enzýmy a patria medzi dehalogenasy, karboxylesterasy, mono- a dioxygenasy, peroxidasy, peroxygenasy, lakkasy, nitrilasy, fosfatasy a nitroreduktasy. Ďalej si môžu nadzemné časti rastliny s atmosférou vymieňať plyny umožňujúce prijatie a uvoľnenie molekúl⁵⁰⁻⁵³.

Fytoremediačné aplikácie sú klasifikované podľa toho, aký je osud kontaminovanej látky, alebo podľa zúčastneného mechanizmu a patria sem⁵⁰⁻⁵³:

- *fytoextrakcia* – tiež nazývaná fytoakumulácia, je metóda založená na príjme, absorpcii, kontaminujúcej látky koreňmi rastlín a ich translokácii a akumulácii v nadzemných častiach rastlín. Kontaminanty sú potom odstránené zozbieraním rastlín. Dôležitou vlastnosťou použitých rastlín je ich hyperakumulačná schopnosť voči polutantu. Najčastejšie sa táto technika používa na sanáciu kovov, polokovov, rádionuklidov a nekovov⁵⁰⁻⁵³.

- *rhizofiltrácia* – je adsorpcia alebo precipitácia na koreňovom systéme rastlín, alebo absorpcia kontaminantov v koreňoch, ktoré sú prítomné v povrchových, podzemných a splaškových vodách. Pri rhizofiltrácii sú cieľovou časťou práve korene. Môže dochádzať aj k príjmu, zakoncentrovaniu a distribúcii v závislosti na povahe polutantu. Hlavným cieľom je obmedzenie kontaminantu, ktorý je imobilizovaný alebo akumulovaný na alebo v rastline. Úspešne sa používa pri dekontaminácii izotopov Se a Cs z povrchových vôd pomocou slnečníc v Černobyle⁵⁰⁻⁵³.

- *fyto stabilizácia* – je definovaná ako imobilizácia kontaminujúcej látky v pôde jej absorpciou a akumuláciou koreňmi rastlín, adsorpciou na koreňoch alebo precipitáciou v koreňovom systéme rastlín a použitie rastlín a koreňov k zabráneniu jej presunu vetrom, eróziou vody, výluhmi alebo rozptýlením pôdy. Využíva sa tam, kde je potrebné obnoviť vegetačnú pokrývku, ale kvôli veľkej kontaminácii nie je možné aplikovať bežnú vegetáciu na zasiahnuté územie, a taktiež pre finálnu úpravu plôch, kde boli predtým použité iné sanačné technológie⁵⁰⁻⁵³.

- *rhizodegradácia* – dochádza pri nej k rozpadu organickej látky v pôde pomocou mikrobiálnej aktivity, ktorá je podporovaná prítomnosťou koreňového systému. Korene vylučujú do pôdy organické zlúčeniny (alkoholy, cukry, kyseliny), ktoré sa stávajú potravou pre pôdne baktérie. Dostatkom živiny rapidne vzrastá počet mikroorganizmov (kvasinky, huby, baktérie) a je stimulovaná ich aktivita, čo zvyšuje degradáciu organických látok v pôde⁵⁰⁻⁵³.

- *fyto degradácia* – tiež nazývaná fytotransformácia, je proces, v ktorom dochádza k rozpadu kontaminantu prijatého rastlinou metabolickými procesmi vo vnútri rastliny, alebo k rozpadu zvonku rastliny v dôsledku prítomnosti látok (enzýmov), produkovaných rastlinou. Táto metóda je používaná hlavne na odstránenie organických látok (PAH, PCB, výbušniny, detergenty). Látky sú degradované, inkorporované do rastlinných buniek a slúžia ďalej ako živiny pre rastliny. Je dôležité zabezpečiť, aby látky neboli premieňané na metabolity, ktoré by mohli byť toxickejšie ako samotný polutant⁵⁰⁻⁵³.

- *fyto volatilizácia* – pri tomto procese dochádza k príjmu a transpirácii polutantu rastlinou. Kontaminant je prijatý koreňovým systémom rastliny a distribuovaný do nadzemných častí a niekedy môže dôjsť aj k jeho biotransformácii. Potom je v prchavej forme transpirovaný do atmosféry. Metóda je skôr využívaná pri odstránení organických polutantov⁵⁰⁻⁵³.

3. Experimentálna časť

3.1 Použité chemikálie

Pri práci boli použité nasledujúce chemikálie: ibuprofén (Zentiva), sodná soľ naproxenu (Sigma – Aldrich), sodná soľ diklofenaku (Zentiva), jodid draselný (čistota p.a., Lachema, ČR), hydroxid sodný (čistota $\geq 97\%$, Penta), chloramin T (Sigma Chemical CO), iodogen (Pierce Chemical CO), jódmonochlorid (Aldrich), kyselina chlorovodíková 35% (čistota p.a., Lach-Ner, ČR), dichlormethan (čistota p.a., Lachema, ČR), demineralizovaná voda (Demiva 3roi., Watek ČR), sacharóza (čistota p.a., Lachema ČR), myo-inositol (kvalita pre tkanivové kultúry, Sigma – Aldrich), chemikálie použité na prípravu kultivačných médií boli v čistote p.a. (Lachema ČR), metanol pre HPLC (Lab-Scan), kyselina octová (čistota p.a., Merck), acetonitril pre HPLC (J. T. Baker), dimethylsulfoxid (čistota 99,5 %, Sigma – Aldrich, testované pre tkanivové kultúry), Savo (Bochemie a.s), ethanol (96 %, denaturovaný benzínom).

3.2 Prístroje

Pri príprave reakcií bola použitá miešačka Vortex-Genie®.

Na analýzu vzoriek jódovaných zlúčenín bol použitý kvapalinový chromatograf SHIMADZU (Japonsko) tvorený: vysokotlakovým čerpadlom LC20AD, dávkovacím ventilom RHEODYNE (USA) na 20 μl , UV detektorom SPD-20A, kolónou so sorbentom Reprosil 100 C-18 (5 μm) o rozmere 4,4 x 250 mm (Watrex). Namerané dáta boli vyhodnocované v chromatografickom programe Clarity (DataApex). LC/MS boli prevedené na zostave tvorenej kvapalinovým chromatografom HP1100 s hmotnostným detektorom Bruker Esquire 3000.

Sledovanie časovej závislosti, analýza vzoriek [^{125}I]diklofenaku a jeho izolácia boli realizované na kvapalinovom chromatografe tvoreným: vysokotlakovým čerpadlom Chrom sds 150, dávkovacím ventilom RHEODYNE (USA) na 20 μl , UV detektorom

D250 (Watrex), rádiometrickým detektorom Flow Scintillation Analyzer 150TR (Packard), kolónou so sorbentom Reprosil 100 C-18 (5 µm) o rozmere 4,4 x 250 mm (Wartex). Namerané dáta boli vyhodnocované v chromatografickom programe Clarity (DataApex).

K meraniu rádioaktivity média bol použitý kvapalinový scintilačný spektrometer LS6000SE a scintilačný koktejl Ready ValueTM (Beckman).

K vyhodnoteniu distribúcie rádioaktivity v rastline bol použitý elektronický autorádiograf Instant Imager (Packard).

Na prípravu rastlín, kultivačných médií a ku samotnej kultivácii boli použité nasledujúce prístroje: magnetická miešačka IKA-basic (IKA, SRN), pH-meter (IQ, Scientific Instruments, USA), laminárny box s vertikálnym prúdením vzduchu FBB 120 (Labox, ČR), kultivačné boxy TCH 100 9 (Laborátorne prístroje, Praha). Rastliny boli kultivované pri teplote 25°C a svetelnom režime 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma (žiarivky Philips, teple biela).

3.3 Rastliny použité na experiment

Na fytoextrakciu ¹²⁵I značených liečiv boli použité semená nasledujúcich rastlín

- Kukurica siata (*Zea mays*) kultivar DKC2971 G1
- Slniečnica ročná (*Helianthus annuus*) kultivar Extrasol

Všetky použité kultivary boli získané od firmy MONSANTO ČR s.r.o..

3.4 Pracovný postup

3.4.1 Príprava jódom značených farmák

Na prípravu jódom značených farmák boli použité dve metódy jodácie dvoma rozdielnymi jodačnými činidlami, a to zmesou chloraminu T (sodná soľ N-chloro-*p*-toluén-sulfonamidu) s jodidom draselným a zmesou iodogenu (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycouril) s jodidom draselným.

Pred zahájením reakcie boli pripravené zásobné roztoky používaných reagensí. Zásobný roztok požadovaného liečiva (diklofenaku, ibuprofenu alebo naproxenu) vo forme sodnej soli s výslednou koncentráciou 0,2 mg/ml bol pripravený rozpustením liečiva v destilovanej vode s prídavkom ekvimolárneho množstva hydroxidu sodného o koncentrácii 1 g/l a následne bol na 40 minút daný do ultrazvuku na zaistenie dostatočného rozpustenia liečiva. Ďalej bol pripravený zásobný roztok jodidu draselného o koncentrácii 0,1 mg/ml v destilovanej vode. Čisté roztoky oxidačných činidiel chloraminu T o koncentrácii 0,5 mg/ml v destilovanej vode a iodogenu o koncentrácii 1,5 mg/ml v dichlormethane boli pripravené vždy v deň prevedenia reakcií.

Pri reakcii, kde bolo ako oxidačné činidlo použitý chloramin T, bol realizovaný nasledujúci postup: do sklenenej skúmavky bolo automatickou pipetou pridaných 1 ml oxidačného činidla o koncentrácii 0,5 mg/ml v destilovanej vode, ku ktorému boli ďalej nadávkované 1 ml roztoku vybraného liečiva vo forme sodnej soli o koncentrácii 0,2 mg/ml a 1 ml roztoku jodidu draselného o koncentrácii 0,1 mg/ml. Reakčná zmes bola premiešaná pomocou Vortexu a ponechaná reagovať počas 10 minút.

V prípade použitia oxidačného činidla iodogenu boli reakcie prevedené nasledujúcim spôsobom: 0,5 ml roztoku iodogenu o koncentrácii 1,5 mg/ml v dichlormethane bolo automatickou pipetou nadávkované do sklenenej skúmavky. Pomocou horúceho vzduchu bolo rozpúšťadlo odparené tak, aby na skúmavke ostal súvislý povlak oxidačného činidla do výšky, ktorá zodpovedala 2 ml v ďalšom kroku pridaných reagensí. Do takto pripravenej skúmavky boli pridané 1 ml

roztoku liečiva vo forme sodnej soli o koncentrácii 0,2 mg/ml a 1 ml roztoku jodidu draselného s koncentráciou 0,1 mg/ml. Použitím Vortexu bola reakčná zmes premiešaná a nechaná reagovať 10 min. Reakcia bola ukončená odobratím zmesi zo skúmavky automatickou pipetou. Odobratá zmes bola bez prítomnosti oxidačného činidla.

Výsledný produkt reakcie bol analyzovaný pomocou HPLC s UV detekciou a LC/MS, na základe ktorých bola vyhodnotená úspešnosť reakcie.

Tab. 3.4.1.1 Parametre HPLC pre stanovenie produktov v reakčnej zmesi. Na analýzy bola použitá kolóna Repronil 100 C-18 (5 µm), 4,4 x 250 mm (Watrex).

Látka	Analýza	Zloženie mobilnej fázy	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Vlnová dĺžka detekcie [nm]
Diklofenak	HPLC s UV detekciou	CH ₃ OH : H ₂ O (7 : 3, v/v)	1	280
	LC/MS	CH ₃ OH : H ₂ O (7 : 3, v/v)	0,5	280
Ibuprofén	HPLC s UV detekciou	CH ₃ OH : CH ₃ CN : 1% CH ₃ COOH v H ₂ O (1 : 1 : 0,7)	1	230
	LC/MS	CH ₃ OH : CH ₃ CN : 1% CH ₃ COOH v H ₂ O (1 : 1 : 0,7)	0,5	230
Naproxen	HPLC s UV detekciou	CH ₃ OH : CH ₃ CN : 1% CH ₃ COOH v H ₂ O (1 : 1 : 0,7)	1	271
	LC/MS	CH ₃ OH : CH ₃ CN : 1% CH ₃ COOH v H ₂ O (1 : 1 : 0,7)	0,5	271

3.4.2 Stanovenie optimálneho reakčného času

K stanoveniu optimálneho reakčného času boli pripravené reakcie s použitím jodačného činidla iodogen – jodid draselný a liečiva diklofenaku a reakcie prebiehali v časoch 10 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod a 5 hod. Po ukončení reakcií boli výsledky analyzované pomocou HPLC s UV detekciou a stanovený optimálny čas, kedy bol dosiahnutý najväčší výtťažok reakcie.

3.4.3 Príprava [¹²⁵I]diklofenaku

Pomocou horúceho vzduchu bolo odparených 50 µl roztoku iodogenu v sklenenej vialke s kónickým dnom tak, aby na stene vialky vznikla súvislá vrstva do výšky, ktorá zodpovedala prídavku 200 µl reagensí. Následne bolo pridaných 100 µl diklofenaku vo forme sodnej soli a 5 µl roztoku Na¹²⁵I (10 MBq). Po 20 min bolo do reakcie pridaných 100 µl jodidu draselného. Reakčná zmes bola premiešaná a ponechaná reagovať 4 hodiny.

Produkt reakcie bol izolovaný pomocou HPLC s UV detekciou. Postupne bolo zozbieraných desať frakcií za nasledovných podmienok:

Tab. 3.4.3.1 Parametre HPLC pre izoláciu [¹²⁵I]diklofenaku z reakčnej zmesi.

Produkt reakcie	Analýza	Kolóna	Mobilná fáza	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Vlnová dĺžka detekcie [nm]	Dávkovaný objem [µl]	Časový interval odberu [min]
[¹²⁵ I]diklofenak	HPLC s UV detekciou	Reposil 100 C-18 (5 µm), 4,4 x 250 mm (Watrex)	H ₂ O : CH ₃ OH (3 : 7, v/v)	0,8	280	18	2,90 – 3,40

Odobraté frakcie boli odobrané do jednej plastovej fľaštičky a uschované v chladničke pre ďalšie využitie.

3.4.4 Príprava rastlinných kultúr

Pre vybrané rastlinné kultúry bolo ako živná pôda použité médium podľa Murashiga a Skooga s prídavkom myo-inositolu (100 mg/l) ⁵⁴. Pred sterilizáciou bolo pH média upravené na hodnotu 5,8. Ďalej bolo do 250 ml Erlenmeyerových bánk pridaných 15 ml média, ktoré boli alumíniovou fóliou uzatvorené a sterilizované. Pred samotným nasadením semien do živného média, boli semená sterilizované nasledujúcim

postupom. Semená boli odmastené s použitím 70% roztoku ethanolu počas 30 sekúnd. Následne bol ethanol zo semien vyliaty a v sterilizácii sa pokračovalo použitím 10% roztoku Sava po dobu 20 minút. Po 20 minútach bolo opäť Savo zo semien vyliate a sterilizácia bola ukončená použitím 20% roztoku Sava po dobu 10 minút. Za aseptických podmienok bolo Savo zo semien vyliate a semená boli trikrát opláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Do 250 ml Erlenmeyerových bánk bolo pomocou sterilnej pinzety vnesených 5 – 10 kusov semien kukurice siatej alebo slnečnice ročnej v laminárnom boxe a banky boli uzatvorené pomocou alumíniovej fólie. Takto vysadené semená boli umiestnené do kultivačných boxov, kde prebiehala kultivácia po dobu 2 – 3 týždňov pri teplote 25°C.

3.4.5 Fytoextrakcia [¹²⁵I]diklofenaku

Po 2 – 3 týždňoch kultivácie boli vybrané rastlinné kultúry, ktoré boli dostatočne vyrastené a nekontaminované. Za aseptických podmienok práce bolo v laminárnom boxe z Erlenmeyerových bánk vyliate kultivačné médium a bolo do nich pridané 100 ml média s rovnakým zložením, ako bolo médium v rastlinných kultúrach predtým. Ďalej bol pripravený zásobný roztok tvorený [¹²⁵I]diklofenakom izolovaným pomocou HPLC a diklofenakom sodným, ktorý bol rozpustený v dimethylsulfoxide s výslednou koncentráciou 5 mg/ml. Za dodržania podmienok aseptického práce bolo následne pomocou sterilnej injekčnej striekačky pridané 0,5 ml zásobného roztoku (8,5 kBq) do rastlinných kultúr. Sterilnou ihlou bolo z každej rastlinnej kultúry odobraté 1 ml vzorky média pre stanovenie východiskovej aktivity. Banky s rastlinami boli opäť uzatvorené pomocou alumíniovej fólie a nechané v kultivačných boxoch po dobu 8 – 10 dní. Po ukončení kultivácie boli rastliny vytiahnuté, opláchnuté v destilovanej vode a ponechané na usušenie. Z každej Erlenmeyerovej banky bolo na záver odobraných 1 ml vzorky média. Všetky vzorky boli uchované v mrazničke pre nasledujúcu analýzu. Rádioaktivita média na začiatku a na konci experimentu bola stanovená pomocou kvapalinovej scintilácie.

3.4.6 Detekcia translokácie [¹²⁵I]diklofenaku v rastline

Rastliny po vytiahnutí z Erlenmeyerových bánk boli dvakrát opláchnuté v destilovanej vode, aby boli zbavené média a sorbovanej rádioaktívnej látky z povrchu a po čiastočnom uschnutí boli postupne pomaly rozdelené na jednotlivé rastliny tak, aby sa zamedzilo poškodeniu koreňov a nadzemných častí rastlín. Rastliny boli po jednom uložené a ponechané na vyschnutie pri laboratórnej teplote počas niekoľkých dní. V takto uschnutých rastlinách kukurice siatej a slnečnice ročnej bola pomocou elektronickej autorádiografie sledovaná translokácia [¹²⁵I]diklofenaku v rastlinách.

4. Výsledky a diskusia

Liečivá sú látky významnej celosvetovej spotreby, sú súčasťou životného prostredia a sú označované ako „pseudoperzistentné“ zlúčeniny v ekosystéme vďaka ich pretrvávajúcemu používaniu a vypúšťaniu do odpadových vôd v natívnej forme alebo vo forme metabolitov. Vzhľadom na nedostatočnosť ich odstránenia v čistiarniach odpadových vôd sa stávajú liečivá všadeprítomné v životnom prostredí a v dôsledku ich biologickej aktivity aj potenciálne nebezpečné pre cieľové organizmy.

Fytotechnológie, ktoré využívajú rastliny a s nimi asociované mikroorganizmy na očistenie životného prostredia od kontaminujúcich látok, sú označované ako doplnkové, neagresívne, alternatívne metódy k technicky založeným metódam sanácie. Tieto technológie je možné použiť aj na odstránenie polutantov predovšetkým v prípade nízkych koncentrácií z odpadovej vody a taktiež aj pri odstránení kontaminujúcich látok z už prečistenej vody z čistiarní odpadových vôd.

Okrem pokročilých oxidačných procesov, ktoré je možné využiť na dekontamináciu vody od perzistentných organických zlúčenín ako aj liečiv, fytoemediácia by mohol byť ďalší alternatívny spôsob, ako sa týchto látok zo životného prostredia zbaviť. Pri praktickom využití tohto spôsobu likvidácie zvyškovej koncentrácie liečiv z ekosystému je však dôležité vedieť, kde v rastlinách sa tieto látky prevažne akumulujú a do akej miery sú rastliny schopné liečivá prijímať. Táto práca bola v hlavnej miere zameraná na štúdium účinnosti fytoextrakcie liečiv a jej využitie ako potenciálnej sanačnej metódy z vodného prostredia a štúdium translokácie liečiv v rastline pomocou elektronickej autorádiografie, čo zatiaľ v laboratórnych podmienkach študované nebolo. Ako reprezentatívna skupina liečiv boli vybrané nesteroidné protizápalové liečivá naproxen, ibuprofén a diklofenak.

4.1 Príprava ^{125}I značených farmák

Pre označenie vybraných liečiv bola zvolená metóda jodácie, pri ktorej dochádza iba k derivatizácii molekuly a nie je nutné pripravovať značené látky komplexnou

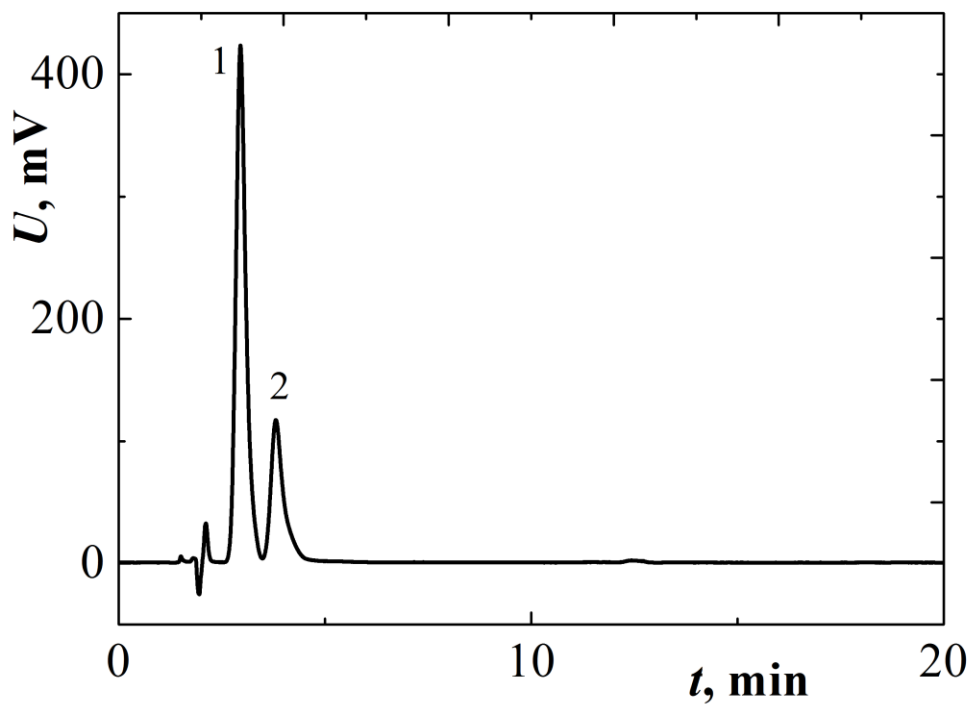
syntézou, a ako rádioaktívny prvok bol vybraný izotop ^{125}I emitujúci gama žiarenie s maximálnou energiou 35 keV, ktorý má z hľadiska fytoextrakčných a translokačných experimentov dostatočne dlhý polčas rozpadu (60 dní) ⁵⁵, čo bolo vyhovujúce aj pre experimentálne pokusy. Jodácia prebieha lepšie v polárnom prostredí, preto bolo ako rozpúšťadlo zvolená voda. Vybrané liečivá obsahujú vo svojej štruktúre aromatický kruh a na jodáciu aromatických zlúčením sú v literatúre dokumentované viaceré efektívne metódy s využitím rôznych oxidačných činidiel, ako napríklad systémy 1,4-bis(triphenylphosphonium)-2-buten peroxodisulfát/ I_2 , HIO_3 / I_2 , N-jodosacharín, NH_4I / I_2 , CrO_3 / I_2 , $\text{Hg}(\text{NO})_3$ / I_2 , NH_4I / H_2O_2 alebo NaClO_2 / NaI / HCl ^{56, 57}. Jodácia viacerých liečiv bola úspešne prevedená použitím jodačného činidla tetramethylammonium dichlorjodát, avšak v pevnom stave bez použitia rozpúšťadiel ⁵⁸.

Použiteľné sú iba metódy, ktoré umožňujú jednoduché prevedenie do rádioaktívnej syntézy za dodržania zodpovedajúcich predpisov pre prácu s rádionuklidmi. Preto bola uprednostnená metóda jodácie analogická štandardnej metóde jodácie proteínov, ktorá využíva ako zdroj rádioaktívneho jódu rádioaktívny jodid sodný. Použitie rádioaktívneho elementárneho jódu nie je príliš možné. Boli zvolené dve metódy jodácie v roztoku, ktoré boli pomerne jednoduché, časovo nenáročné a jodácia prebiehala v jednom kroku. Použité jodačné činidlá boli chloramin T – jodid draselný a iodogen - jodid draselný.

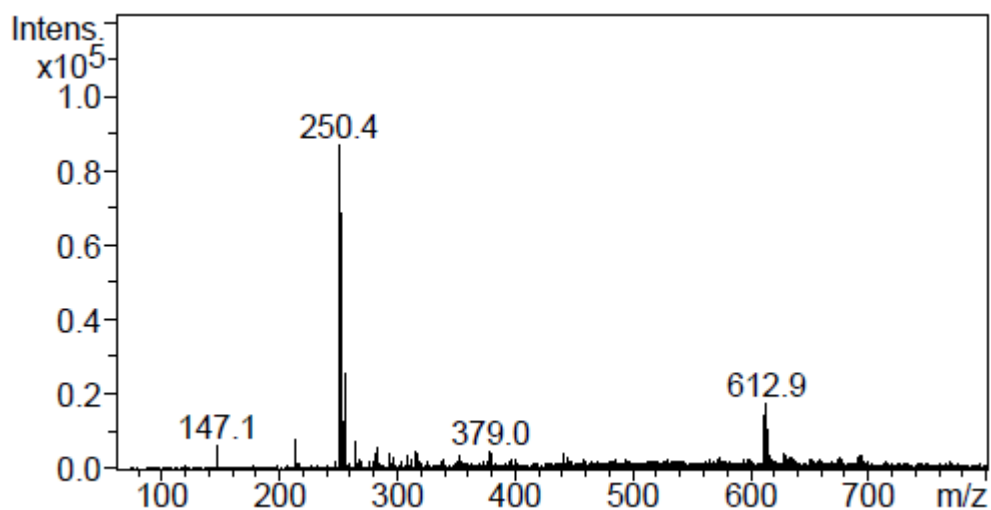
V prípade liečiv ibuprofén a naproxen sa nepodarilo ani jednou zvolenou metódou jódom liečivá označiť. Preto bolo použité ďalšie oxidačné činidlo jódmonochlorid, avšak taktiež s negatívnym výsledkom. Neúspešné jodácie boli potvrdené kvapalinovou chromatografiou s hmotnostnou spektrometriou. Jodácia ibuprofenu je pravdepodobne sťažená stérickou a elektronickou náročnosťou molekuly a jediná publikovaná jodácia ibuprofenu využíva zložitejší spôsob prípravy s oxidačným činidlom jodozobenzénom diacetátom katalyzovaná paladnatými soľami ⁵⁹. Napriek tomu, že molekula naproxenu bola jodácii prístupnejšia, stérické dôvody pravdepodobne nehrajú rolu, ani v tomto prípade nebola úspešná. Žiadna priama jodácia naproxenu nebola popísaná ani v literatúre.

Jodácia dikofenaku bola v oboch prípadoch úspešná, čo bolo potvrdené použitím LC/MS. Nasledujúci obrázok 4.1.1 zobrazuje chromatogram reakčnej zmesi

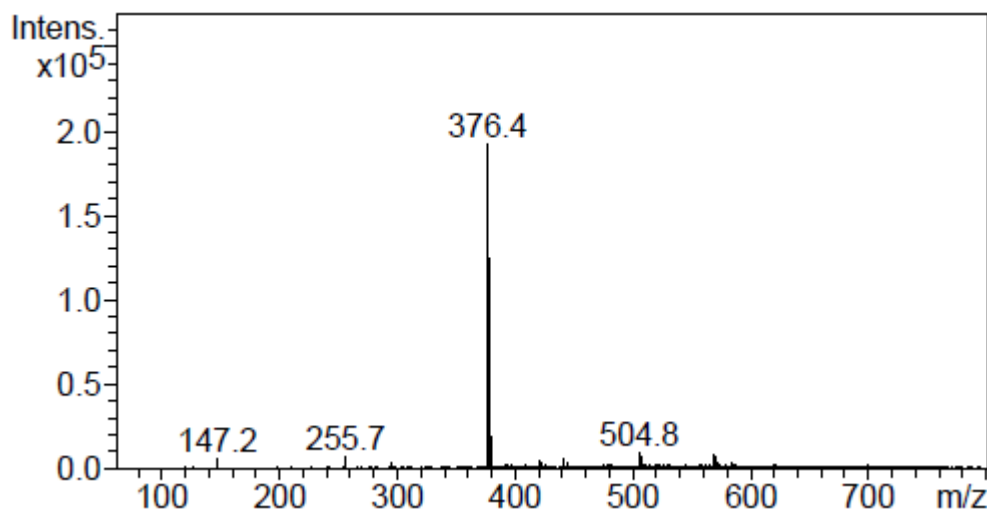
diklofenaku s jódom označeným diklofenakom pri jodácii diklofenaku sodného pomocou iodogenu a jodidu sodného. Obrázky 4.1.2 a 4.1.3 predstavujú záznamy z hmotnostnej spektrometrickej analýzy, ktoré to potvrdzujú.



Obr. 4.1.1 Chromatogram z analýzy HPLC diklofenaku a jódom značeného diklofenaku. Pík 1 - diklofenak, pík 2 - diklofenak-I.



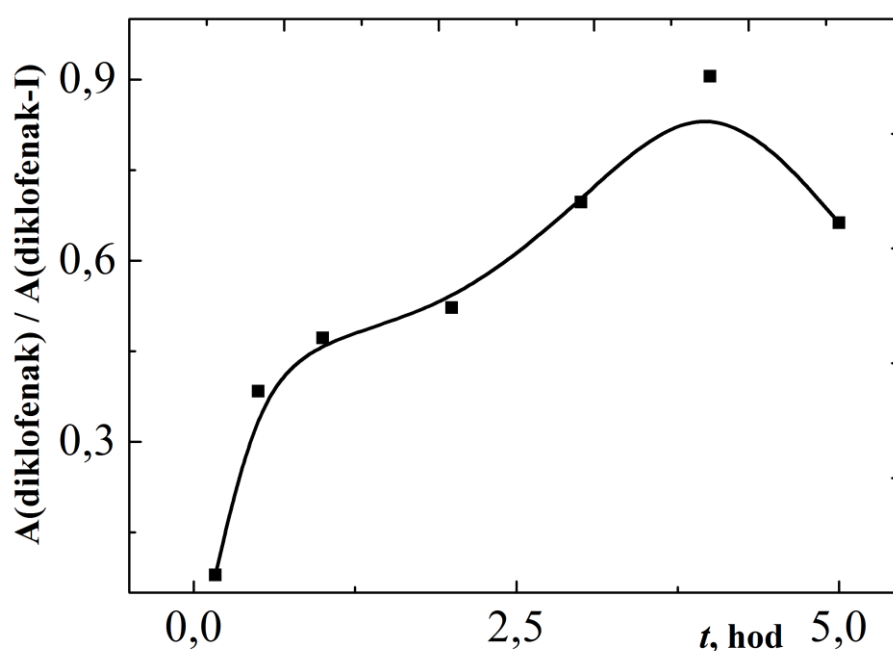
Obr. 4.1.2 Hmotnostné spektrum diklofenaku. m/z 250,4 monomér diklofenaku, m/z 612,9 dimér diklofenaku-Na (ESI, negatívny mód)



Obr. 4.1.3 Hmotnostné spektrum diklofenaku-I (m/z 376,4) (ESI, negatívny mód).

Pre ďalšiu prácu bola zvolená metóda jodácie použitím oxidačného činidla iodogenu. Po ukončení reakcie bol produkt iba odobratý zo skúmavky alebo vialky automatickou pipetou a oxidačné činidlo ostalo na stenách použitého skla, ako vyplýva zo spôsobu prípravy. Týmto spôsobom bol zároveň izolovaný produkt od oxidačného činidla a tým aj uľahčený ďalší postup práce. V prípade použitia chloraminu T, ktorý bol do reakcie pridávaný vo forme roztoku, by bola izolácia nutná.

V reakciách, kde bolo použité ako oxidačné činidlo chloramin T a nebol od produktu izolovaný, sa po viacnásobnom premeraní v rozdielnych časoch zistilo, že s rastúcim časom sa zvyšuje aj výťažok reakcie. Toto zistenie bolo overené použitím i oxidačného činidla iodogenu, kedy boli prevedené reakcie v čase 10 min, 30 min, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod a 5 hod a na základe vyhodnotenia výsledkov bol stanovený optimálny reakčný čas, kedy bol dosiahnutý maximálny výťažok reakcie. Závislosť pomeru plôch pík diklofenaku a diklofenaku-I pri HPLC analýzách reakcií s rôznou dobou zobrazuje obrázok 4.1.4.

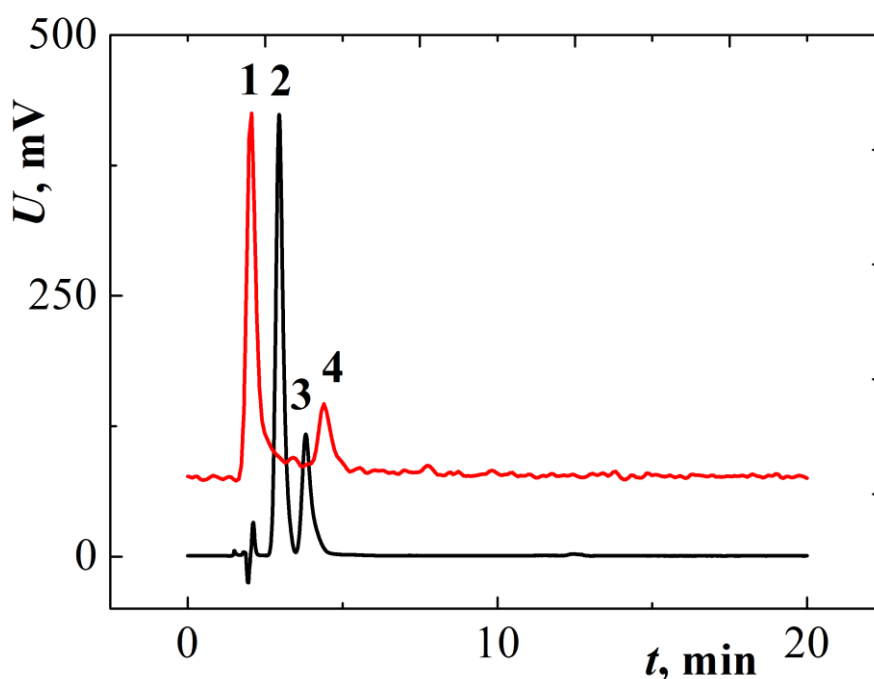


Obr. 4.1.4 Závislosť pomeru plôch pík diklofenaku a diklofenaku-I pri HPLC analýzách reakcií v rôznom čase.

Na základe výsledkov bol stanovený optimálny reakčný čas štyri hodiny. Výťažok reakcie sa prudko zvýšil v prvých štyroch hodinách, čo bolo následkom zvyšujúcej sa premeny jodidu na I^+ a následne reakciou I^+ s benzénovým jadrom v molekule liečiva. Pokles výťažku mohol byť spôsobený spätnou premenou liečiva na nejódovanú formu a tvorbou I_2 v stále pretrvávajúcej prítomnosti oxidačného činidla.

Stabilita výsledného produktu bez prítomnosti oxidačného činidla bola overená viacnásobným premeraním v niekoľkých dňoch.

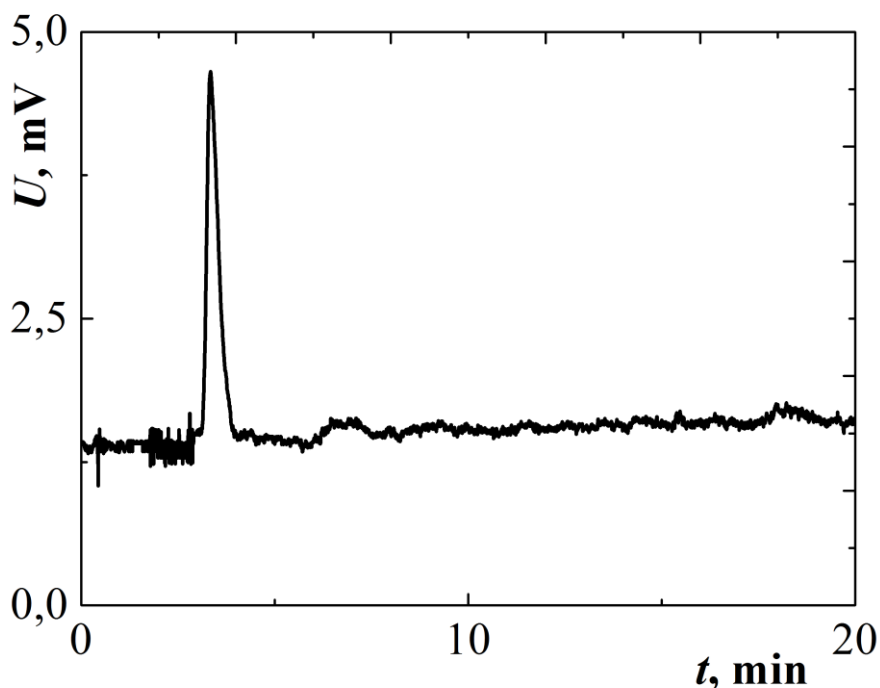
Po úspešnom označení liečiva pomocou jódu bol urobený aktívny pokus s roztokom Na^{125}I , aby bolo docielené rádioaktívne označenie liečiva a výsledok bol overený využitím kvapalinovej chromatografie s UV a rádiometrickou detekciou, čo je znázornené na obrázku 4.1.5. Odozva rádiometrického detektoru nezodpovedá presne odozve UV detektoru, ale je posunutá o 30 sekúnd, čo je spôsobené sériovým zapojením detektorov a oneskoreným dotečením mobilnej fázy do rádiometrického detektoru.



Obr. 4.1.5 Chromatogram z analýzy HPLC s UV a rádiometrickou detekciou diklofenaku a diklofenaku-I. Pík 1 - Na^{125}I , pík 2 - diklofenak, pík 3,4 - ^{125}I diklofenak.

Po úspešnom prevedení rádioaktívneho označenia diklofenaku s ^{125}I nasledovala izolácia produktu ^{125}I diklofenaku. Produkt bolo potrebné izolovať, aby bol zbavený v zmesi prítomného zvyškového Na^{125}I a diklofenaku-Na. ^{125}I diklofenak bol izolovaný odoberaním frakcií pomocou HPLC, čím bol získaný ^{125}I diklofenak vo vodnom methanole, ktorý bol ďalej používaný pri fytoextrakčných pokusoch. Čistotu

výsledného izolovaného produktu znázorňuje obrázok 4.1.6. Rádiochemický výtťažok bol približne 1 %. Rádiochemická čistota bola > 95 % (HPLC).



Obr. 4.1.6 Chromatogram čistého izolovaného produktu [^{125}I]diklofenaku z analýzy HPLC s UV detekciou.

4.2 Účinnosť fytoextrakcie [^{125}I]diklofenaku

Účinnosť fytoextrakcie [^{125}I]diklofenaku z vodných roztokov bola študovaná na rastlinných druhoch: slnečnica ročná (*Helianthus annuus* kultivar Extrasol) a kukurica siata (*Zea mays* kultivar DKC2971 G1). Účinnosť bola stanovená úbytkom meranej aktivity v odobratých vzorkách média po nadávkovaní zásobného roztoku obsahujúceho [^{125}I]diklofenak a po ukončení fytoextrakcie po 8 – 10 dňoch pomocou kvapalinovej scintilácie. Nasledujúca tabuľka 4.2.1 zobrazuje účinnosť fytoextrakcie oboch použitých

druhov rastlín. Množstvo vyextrahovaného [¹²⁵I]diklofenaku je vyjadrené v percentách východiskovej aktivity.

Tab. 4.2.1 Účinnosť fytoextrakcie [¹²⁵I]diklofenaku vybraných rastlinných druhov. Množstvo vyextrahovanej látky vyjadrené v % východiskovej aktivity.

Rastlinný druh	Účinnosť fytoextrakcie	s _r (%) (počet paralelných stanovení, n)	L _{1,2}
Kukurica siata (<i>Zea mays</i>)	84,6	6,1 (n = 4)	9,0
Slničnica ročná (<i>Helianthus annuus</i>)	78,6	6,5 (n = 5)	7,8

Zo získaných výsledkov je viditeľné, že aj napriek výraznej eliminácii [¹²⁵I]diklofenaku z vodných roztokov, účinnosť fytoextrakcie v priebehu 8 – 10 dní nebola úplná a v prípade kukurice ročnej bolo výsledné množstvo [¹²⁵I]diklofenaku vo vodnom roztoku ≈ 16 % a u slnečnice ročnej ≈ 22 %. Zo spracovaných údajov a dosiahnutých výsledkov taktiež jasne vyplýva, že je dôležité zvoliť správny rastlinný druh, u ktorého bude eliminácia skúmanej látky najväčšia. Je zrejmé, že v prípade [¹²⁵I]diklofenaku bola vyššia fytoextrakčná účinnosť dosiahnutá použitím kukurice siatej, čo je pravdepodobne spôsobené aj väčšou tvorbou biomasy. Fytoextrakcia nepozostáva iba z jedného jediného deja, ale zahŕňa súbor vzájomne sa ovplyvňujúcich dejov, ktoré sa vzájomne ovplyvňujú a majú výrazný dopad na výslednú účinnosť fytoextrakcie. Hlavnú úlohu hrajú hlavne adsorpčné a absorpčné deje na povrchu koreňov rastlín, ako aj fyziologické a metabolické deje, ale aj transport látky vo vnútri rastliny. Pretrvávajúci zostatok [¹²⁵I]diklofenaku do vodných roztokov mohol byť spôsobený aj spätným vypustením sledovanej látky z rastliny zapríčinený možným poškodením alebo odumretím rastlinných tkanív, najmä koreňov, aj napriek starostlivému výberu rastlinných kultivácií, na ktorých neboli badateľné viditeľné zmeny v priebehu fytoextrakcie.

4.2.1 Fytoextrakčná schopnosť eliminácie [¹²⁵I]diklofenaku vybraných druhov rastlín z roztokov

Vhodný vybraný rastlinný druh, u ktorého bude účinnosť fytoextrakcie dosahovať najvyššie hodnoty, je dôležitým faktorom ovplyvňujúcim úspešnosť a účinnosť fytoextrakcie. Akumulačnú schopnosť použitých vybraných rastlinných druhov eliminovať stanovované liečivo [¹²⁵I]diklofenak z vodných roztokov zobrazuje nasledujúca tabuľka 4.2.1.1. Výsledné hodnoty sú prepočítané na gram suchej váhy a vyjadrené v percentách vyextrahovaného [¹²⁵I]diklofenaku na gram suchej váhy vybraného rastlinného druhu. Akumulačná schopnosť eliminovať diklofenak sodný z vodných roztokov je vyjadrená v mg vyextrahovaného diklofenaku sodného na kilogram suchej váhy rastlinného druhu.

Tab. 5.2.1.1 Akumulačná schopnosť použitých rastlinných druhov na fytoextrakciu [¹²⁵I]diklofenaku a diklofenaku-Na. Množstvo vyextrahovanej látky vyjadrené v % východiskovej aktivity/g suchej váhy a v mg/kg suchej váhy rastlín.

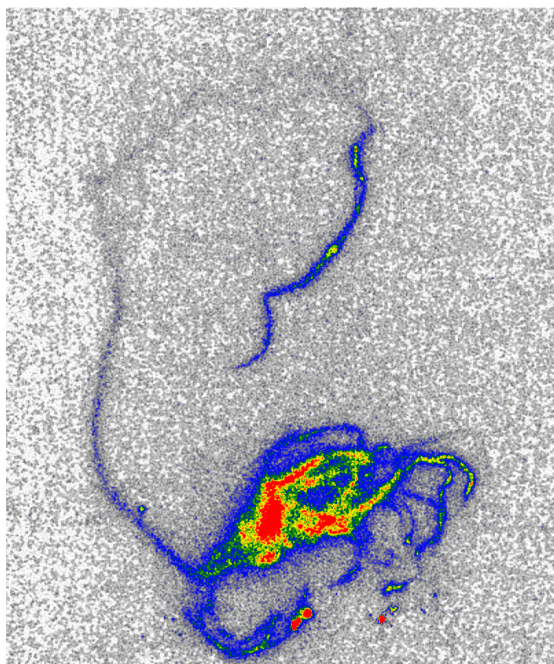
Rastlinný druh	Akumulačná schopnosť (% vyextrahovaného množstva [¹²⁵I]diklofenaku / g suchej váhy)	Akumulačná schopnosť (mg diklofenaku-Na / kg suchej váhy)
Kukurica siata (<i>Zea mays</i>)	30,7	30
Slničnica ročná (<i>Helianthus annuus</i>)	76,3	80

Zo získaných výsledkov je jednoznačne vidieť, že lepšiu akumulačnú schopnosť rastlinného druhu na fytoextrakciu [¹²⁵I]diklofenaku mala slnečnica ročná, čo je v protiklade s výsledkami účinnosti fytoextrakcie, kde lepšiu účinnosť dosiahla kukurica siata. Výsledok je pravdepodobne výrazne ovplyvnený množstvom vytvorenej biomasy, kde u kukurice siatej bola vytvorená biomasa takmer trojnásobná.

4.3 Translokácia [^{125}I]diklofenaku vo vybraných rastlinných druhoch

4.3.1 Kukurica siata (*Zea mays*)

Distribúcia [^{125}I]diklofenaku v kukurici siatej kultivar DKC2971 G1 bola sledovaná pomocou elektronickej autorádiografie v rastlinách v suchom stave, ktoré boli pred vysušením opláchnuté v destilovanej vode, aby sa zbavili povrchovej kontaminácie. Nasledujúce obrázky 4.3.1.1 a 4.3.1.2 zobrazujú výsledok distribúcie a sledovanú rastlinu.



Obr. 4.3.1.1 Záznam distribúcie [^{125}I]diklofenaku v kukurici siatej použitím elektronickej rádiografie.



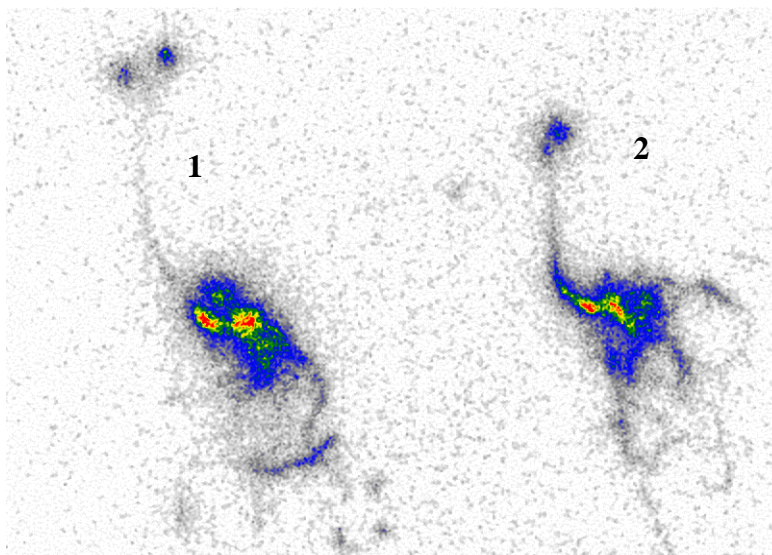
Obr. 4.3.1.2 Kukurica siata (*Zea mays*) použitá k detekcii rádioaktivity v rastline.

Z dokumentovaných výsledkov jednoznačne vyplýva, že najväčšia koncentrácia [^{125}I]diklofenaku je v koreňoch rastlín a postupne prechádza do nadzemných častí rastliny. Epicentrum maximálnej koncentrácie sa nachádza v semene rastliny a plynule

prechádza do koncových častí koreňov rastliny. Zo získaných výsledkov je možné usúdiť, že prevládajúcim mechanizmom fytoextrakcie sledovaného liečiva je adsorpcia na koreňoch s následnou absorpciou a transportom v rastline až do listov, kde môže dochádzať k ďalším fyziologickým a metabolickým dejom. Vysoká koncentrácia v jednom z listov mohla byť spôsobená prednostným ukladaním sledovaného liečiva práve v listoch. Nie je však vylúčené, že to mohlo byť spôsobené aj ponorením listu do živného média počas fytoextrakcie pre nedostatok miesta v Erlenmeyerovej banke vzhľadom k dosiahnutej veľkosti prítomných rastlín.

4.3.2 Slniečnica ročná (*Helianthus annuus*)

Translokácia [¹²⁵I]diklofenaku v rastlinnom druhu slnečnici ročnej kultivar Extrasol bola sledovaná pomocou elektronickej autorádiografie v suchých rastlinách, ktoré boli pred usušením opláchnuté v destilovanej vode, aby boli zbavené prebytočného média na povrchu. Distribúciu [¹²⁵I]diklofenaku v slnečnici ročnej a vybrané rastliny v suchom stave znázorňujú obrázky 4.3.2.1 a 4.3.2.2.



Obr. 4.3.2.1 Záznam distribúcie [¹²⁵I]diklofenaku v slnečnici ročnej použitím elektronickej autorádiografie.



Obr. 4.3.2.2 Rastliny slnečnice ročnej (*Helianthus annuus*) použité k detekcii distribúcie rádioaktivity.

Získané výsledky opäť dokazujú, že aj v prípade použitia tohto rastlinného druhu sa sledované liečivo [^{125}I]diklofenak koncentruje prevažne v koreňoch rastlín a postupne prechádza do nadzemných častí, kde sa pravdepodobne prednostne ukladá do listov rastliny. Najväčšia koncentrácia [^{125}I]diklofenaku je v koreňovej oblasti, kde sa korene začínajú rozvetvovať a vyrastá nadzemná časť rastliny, čiže v oblasti, kde bolo semeno rastliny. V prípade rastliny číslo 2 bol zrejme [^{125}I]diklofenak uložený už do prvých lístkov a do vyšších častí rastliny sa nedostal. Vzhľadom na najvyššiu koncentráciu liečiva v koreňovej oblasti je možné konštatovať, že najvýznamnejšími mechanizmami podieľajúcim sa na fytoextrakcii liečiva z vodných roztokov je adsorpcia na koreňoch, kde ďalej dochádza k absorpcii študovanej látky do koreňov rastliny a následne k transportu liečiva do nadzemných častí až k prednostnému ukladaniu liečiva do listov rastliny, kde môže ďalej dochádzať k metabolickým a fyziologickým dejom.

5 Záver

Pre štúdium prípravy a fytoextraktácie ^{125}I značených farmák bola zvolená ako reprezentatívna skupina nesteroidné protizápalové liečivá ibuprofén, naproxen a diklofenak. Pomocou zvolených metód jodácie s jodačnými činidlami chloramin T – jodid draselný a iodogen – jodid draselný bolo úspešne pripravené iba jedno ^{125}I značené liečivo zo skupiny a to [^{125}I]diklofenak, ktoré bolo po ukončení reakcie z reakčnej zmesi vyizolované použitím HPLC so ziskom [^{125}I]diklofenaku vo vodnom methanole o celkovej aktivite 51 kBq. Takto získaný produkt bol ďalej použitý pri fytoextrakčných experimentoch.

Štúdium fytoextraktácie [^{125}I]diklofenaku z vodných roztokov v *in vitro* usporiadaní preukázalo relatívne vysokú schopnosť extraktácie zvoleného liečiva z vodných roztokov. Účinnosť extrakčného procesu bola v prípade rastlinných species slnečnici ročnej (*Helianthus annuus* kultivar DKC2971 G1) takmer 79 % a u kukurice siatej (*Zea mays* kultivar Extrasol) skoro 85 %. Akumulačná schopnosť vybraných rastlinných species voči diklofenaku sodnému bola 30 mg/kg suchej váhy rastliny v prípade kukurice siatej a 80 mg/kg suchej váhy rastliny slnečnice ročnej. Napriek vysokej extrakčnej schopnosti rastlín nebola extrakcia úplná, čo môže súvisieť s prípadnou toxicitou sledovanej látky voči koreňovému systému, nedostatočne výkonným transportným systémom v rastline alebo s krátkou dobou trvania experimentu. Nie je možné vylúčiť aj toxický vplyv [^{125}I]diklofenaku s následným odumretím koreňov a spätnému uvoľneniu ad- a absorbovaných látok znovu do média.

Translokácia [^{125}I]diklofenaku v použitých rastlinných species bola sledovaná pomocou elektronickej autorádiografie a ukázala na vysokú kumuláciu [^{125}I]diklofenaku v koreňovom systéme rastlín s následným transportom tohto liečiva do nadzemných častí rastlín. Jedným z hlavných mechanizmov podieľajúcim sa na extrakcii [^{125}I]diklofenaku z vodných roztokov je preto eventuálne adsorpcia na koreňoch s postupnou absorpciou a distribúciou v rastline až do listov, kde môže ďalej dochádzať k metabolickým a fyziologickým dejom.

Výsledný pokus je teda superpozíciou všetkých opísaných dejov. Celková schopnosť fytoextrakcie u vybraných kultivarov slnečnice ročnej a kukurice siatej je pomerne vysoká, preto je možné z technologického hľadiska konštatovať, že táto metóda predstavuje zaujímavú možnosť eliminácie študovaného znečistenia zo životného prostredia.

Referencie

- 1 S. Dietrich F. Ploessl., F. Bracher, Ch. Laforsch: Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere*, **79**, 60 - 66 (2010).
- 2 J. F. Navarez V. C. Jimenez. C.: PHARMACEUTICAL PRODUCTS IN THE ENVIRONMENT: SOURCES, EFFECTS AND RISKS. *VITAE*, **19**, 93 - 108 (2012)..
- 3 J. Corcoran, M. J. Winter, Ch. R. Tyler: Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, **40**, 287 - 304 (2010)..
- 4 R. López-Serna, M. Petrović, D. Barceló: Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the Total Environment*, **440**, 280 - 289 (2012)..
- 5 B. Ferrari, N. Paxéus, R. Lo Giudice, A. Pollio, J. Garrica: Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 359 - 370 (2003)..
- 6 J. Martín D. Camacho.-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso: Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, **239-240**, 40 - 47 (2012).
- 7 M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló: Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, **69**, 334 - 342 (2006).
- 8 P. L. Williams, Ph.D., R. C. James, Ph.D., S. M. Roberts, Ph.D: *Principles of toxicology, Environmental and Industrial Applications*. Second ed. John Wiley & Sons, Interscience, Hoboken: New Jersey 2000, pp 57 - 86, ISBN: 0-471-29321-0.

- 9 D. Fatta-Kassinos, S. Meric, A. Nikolaou: Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **399**, 251 - 275 (2011).
- 10 E. Pérez-Carrera, M. Hansen, V. M. León, E. Björklund, K. A. Krogh, B. Halling-Sorensen, E. González-Mazo: Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**, 1173 - 1184 (2010).
- 11 J. Dębska, A. Kot.-Wasik, J. Namieśnik: Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **34**, 51 - 67 (2004).
- 12 R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, **50**, 1319 - 1330 (2003).
- 13 T.-H. Fang, F.-H. Nan, T.-S. Chin, H.-M. Feng: The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **64**, 1435 - 1444 (2012).
- 14 M. A. Aukidy, P. Verlicchi, A. Jelic, M. Petrovic, D. Barcelò: Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, **438**, 15 - 25 (2012).
- 15 W.-J. Sim, J.-W. Lee, E.-S. Lee, S.-K. Shin, S.-R. Hwang, J.-E. Oh: Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, **82**, 179 - 186 (2011).
- 16 Ch. K. Yoo, D. S. Kim, J.-H. Cho, S. W. Choi, I.-B. Lee: Process System Engineering in Wastewater Treatment Process. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **18**, 408 - 421 (2001).
- 17 J. Martoň, J. Tölgyessy, L. Hyánek, M. Piatrik: *Získavanie, úprava, čistenie a ochrana vôd*. Druhé doplnené vydanie, Vydavateľstvo ALFA: Bratislava 1900, pp 460 - 547, ISBN: 80-05-00830-9.

- 18 G. Tchobanoglous, F. L. Burton, H. D. Stensel: *Wastewater engineering, Treatment and reuse*. 4th ed. McGraw-Hill: New York 2002, pp 10 - 14, ISBN: 0-07-041878-0.
- 19 C. Lacey, S. Basha, A. Morrissey, J. M. Tobin: Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. *Environmental Monitoring and Assessment*, **184**, 1049 - 1062 (2012).
- 20 P. Gao, Y. Ding, H. Li, I. Xagorarakis: Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere*, **88**, 17 - 24 (2012).
- 21 A. Yu-Chen Lin, T.-H. Yu, S. K. Lateef: Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan., *Journal of Hazardous Materials*, **167**, 1163 - 1169 (2009).
- 22 O. A. H. Jones, N. Voulvoulis, J. N. Lester: Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **35**, 401 - 427 (2005).
- 23 M. Carballa, F. Omil, J. M. Lema, M. Llombart, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, T. Ternes: Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, **38**, 2918 - 2926 (2004).
- 24 L. Lishman, S. A. Smyth, K. Sarafin, S. Kleywegt, J. Toito, T. Peart, B. Lee, M. Servos, M. Beland, P. Seto: Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*, **367**, 544 - 558 (2006).
- 25 S. Managaki, A. Murata, H. Takada, B. C. Tuten, N. H. Chiem: Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in Mekong Delta. *Environmental Science & Technology*, **41**, 8004 - 8010 (2007).
- 26 J. H. P. Gerty, P. W. Clinton, M. R. Van den Heuvel, M. O. Kimberley, L. G. Greenfield: INFLUENCE OF SEWAGE AND PHARMACEUTICALS ON SOIL MICROBIAL FUNCTION. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30**, 1086 - 1095 (2011).

- 27 J.-W. Kwon: Mobility of Veterinary Drugs in Soil with Application of Manure Compost. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **87**, 40 - 44 (2011).
- 28 E. Hiller, Z. Krascenits, M. Bartal': ENVIRONMENTÁLNY OSUD VYBRANÝCH FARMACEUTÍK: SORPCIA A DESORPCIA V SEDIMENTE. *ACTA ENVIRONMENTALICA UNIVERSITATIS COMENIANAE*, **15**, 16 - 25 (2007).
- 29 A. Nikolaou S. Meric, D. Fatta: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387**, 1225 - 1234 (2007).
- 30 S. Mompelat, O. Thomas, B. Le Bot: Contamination levels of human pharmaceutical compounds in French surface and drinking water. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**, 2929 - 2939 (2011).
- 31 Metodiky pre proces Hodnotenia a riadenia rizík: Hodnotenie ekologického rizika (Ecological Risk Assessment). Dostupné z URL: <http://www.sazp.sk/slovak/struktura/ceev/ERA/met_pokyn/hodnotenieer.html> [cit. 23.3.2013].
- 32 P. H. Howard, D. C. G. Muir: Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce II: Pharmaceuticals. *Environmental Science & Technology*, **45**, 6938 - 6946 (2011).
- 33 F. Liu, G.-G. Ying, R. Tao, J.-L. Zhao, J.-F. Yang, L.-F. Zhao: Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, **157**, 1636 - 1642 (2009).
- 34 U. Memmert, A. Peither, R. Burri, K. Weber, T. Schmidt, J. P. Sumpter, A. Hartmann: DICLOFENAC: NEW DATA ON CHRONIC TOXICITY AND BIOCONCENTRATION IN FISH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **32**, 442 - 452 (2013).
- 35 J. L. Oaks, M. Gilbert, M. Z. Virani, R. T. Watson, C. U. Meteyer, B. A. Rideout, H. L. Shivaprasad, S. Ahmed, M. J. Iqbal Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A. A. Khan: Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *NATURE*, **427**, 630 - 633 (2004).

- 36 X. Peng, Q. Huang, K. Zhang, Y. Yu, Z. Wang, Ch. Wang: Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Science of the Total Environment*, **426**, 311 - 317 (2012).
- 37 J. Lee, K. Ji, Y. L. Kho, P. Kim, K. Choi: Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**, 1216 -1225 (2011).
- 38 O. Brambilla A. Martelli: Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, **681**, 209 - 229 (2009).
- 39 X. Liu, J. Lee, K. Ji, S. Takeda, K. Choi: Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. *Toxicology Letters*, **211**, 70 - 76 (2012).
- 40 Státní ústav pro kontrolu léčiv: Dodávky léčiv - se zaměřením na léčivé látky, 2012. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/rok-2012>> [cit. 1.4.2013]
- 41 staženo WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology: ATC/DDD Index 2013. Dostupné z URL: <http://www.whocc.no/atc_ddd_index/> [cit. 1.4.2013]
- 42 B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy: Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment - Forensic applications on environmental data, Part 2: Pharmaceuticals as chemical markers of faecal water contamination. *Environmental Pollution*, **157**, 1778 - 1786 (2009).
- 43 Y. Vystavna, F. Huneau, V. Grynenco, Y. Vergeles, H. Celle-Jeanton, N. Tapie, H. Budzinski, P. Le Coustumer: Pharmaceuticals in Rivers of Two Regions with Contrasted Socio-Economic Conditions: Occurrence, Accumulation, and Comparison for Ukraine and France. *Water, Air, & Soil Pollution*, **223**, 2111 - 2124 (2012).
- 44 S. Kurissery, N. Kanavillil, S. Verenitch, A. Mazumder: Coffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecological Indicators*, **23**, 501 - 508 (2012).
- 45 A. Vogelpohl, S.-M. Kim: *Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **10**, 33 - 40 (2004).

- 46 W. Li, V. Nanaboina, Q. Zhou, G. V. Korshin: Effects of Fenton treatment on the properties of effluent organic matter and their relationships with the degradation of pharmaceuticals and personal care products. *Water Research*, **46**, 403 - 412 (2012).
- 47 H. Yuan, X. Zhou, Y.-L. Zhang: Degradation of Acid Pharmaceuticals in the UV/H₂O₂ Process: Effects of Humic Acid and Inorganic Salts. *Clean – Soil, Air, Water*, **41**, 43 - 50 (2013).
- 48 R. Sivakumar K. Muthukumar: Sonochemical Degradation of Pharmaceutical Wastewater. *Clean – Soil, Air, Water*, **39**, 136 - 141 (2011).
- 49 H. Fr. Schröder, J. L. Tambosi, R. F. Sena, R. F. P. M. Moreira, H. J. José, J. Pinnekamp: The removal and degradation of pharmaceutical compounds during membrane bioreactor treatment. *Water Science & Technology*, **65**, 833 - 839 (2012).
- 50 staženo United States Environmental Protection Agency: Phytoremediation Resource Guide. Dostupné z URL: <<http://epa.gov/tio/download/remed/phytoresgude.pdf>> [cit. 1.4.2013]
- 51 P. Soudek, Š. Petrová, D. Benešová, J. Kotyza, T. Vaněk: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické Listy*, **102**, 346 - 352 (2008).
- 52 staženo United States Environmental Protection Agency: Introduction to Phytoremediation. Dostupné z URL: < <http://clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>> [cit. 1.4.2013]
- 53 N. Marmiroli, M. Marmiroli, E. Maestri: PHYTOREMEDIATION AND PHYTOTECHNOLOGIES: A REVIEW FOR THE PRESENT AND THE FUTURE. *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, **3**, 403 - 416 (2006).
- 54 T. Murashige F. Skoog.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473 - 497 (1962).
- 55 staženo Environmental Health & Safety (EHS): IODINE - 125. Dostupné z URL: < http://www.orcbs.msu.edu/radiation/programs_guidelines/radmanual/appendix_i_iodine_125.pdf#search=%22iodine%20125%22> [cit. 13.4.2013].

- 56 J. Albadi M. Abedini, N. Iravani: Regioselective iodination of aromatic compounds with potassium iodide in the presence of benzyltriphenylphosphonium perchlorate. *Chinese Chemical Letters*, **23**, 261 - 264 (2012).
- 57 H. Keipour, M. A. Khalilzadeh, B. Mohtat, A. Hosseini, D. Zareyee: Efficient iodination of aromatic compounds using potassium ferrate supported on montmorillonite. *Chinese Chemical Letters*, **22**, 1427 - 1430 (2011).
- 58 A. R. Hajipour, M. Arbabian, A. E. Rouho: Tetramethylammonium Dichloroiodate: An Efficient and Environmentally Friendly Iodination Reagent for Iodination of Aromatic Compounds under Mild and Solvent-Free Conditions. *The Journal of Organic Chemistry*, **67**, 8622 - 8624 (2002).
- 59 T.-S. Mei, D.-H. Wang, J.-Q. Yu: Expedient Drug Synthesis and Diversification via ortho-C-H Iodination using Recyclable PdI₂ as the Precatalyst. *Organic Letters*, **12**, 3140 - 3143 (2010).