

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra organické a jaderné chemie

Modelová studie fytoextrakce farmak kontaminujících povrchové vody - ibuprofen

Bakalářská práce

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc.Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 15.8. 2007

Mořková

.....
podpis

Obsah

	Prohlášení	2
	Obsah.....	3
	Seznam zkratk a symbolů.....	4
1	Úvod	5
2	Výskyt farmak v povrchových vodách.....	6
2.1	Antiflogistika.....	7
2.2	Nesteroidní antiflogistika	7
2.3	Ibuprofen	7
3	Nežádoucí účinky nízkých koncentrací farmak v ekosystému	11
4	Interakce PPCPs s ekosystémem	12
4.1	Vliv rostlinného druhu	12
4.2	Procesy související s fytoextrakcí.	14
5	Cíl práce	15
6	Experimentální část.....	16
6.1	Chemikálie a přístroje	16
6.2	Kultivace rostlin a odběr vzorků	17
6.3	Izolace produktů biotransformace ibuprofenu	19
6.3.1	Izolace z media	19
6.3.2	Izolace z rostlin	20
6.3.3	Izolace ze suspenzní kultury kalusů.....	20
7	Výsledky a diskuse.....	20
8	Závěr	27
9	Seznam literatury	28

Seznam zkratk a symbolů

COX – cyklooxygenasa

DMSO – dimethylsulfoxid

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

MS-medium – medium dle Murashiga a Skooga

NA – kyselina nikotinová

NAA – kyselina α -naftyloctová

NU – nežádoucí účinek

NSAID – nesteroidní protizánětlivé látky

PPCPs – farmaka a prostředky osobní péče

UV - ultrafialový

2,4-D – 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

1. Úvod

V každodenním životě se setkáváme s chemickými látkami ať již ve formě farmak, přípravků osobní hygieny, pesticidů a mnoha dalších. Tyto látky, vesměs patřící do skupiny organických sloučenin, jsou v současné době označovány jako skupina farmak a prostředků osobní péče (Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs) mají vesměs kladný vliv na zdraví, životní standard a spokojenost lidí, jejich použití je ovšem i spjato s vylučováním těchto látek do životního prostředí a jejich akumulaci v něm. Přítomnost mnohých z nich má neblahý dopad na ekosystém.

V procesu farmakoterapie jsou vnášeny chemické substance do organismu za účelem fyziologického efektu. Je nutné si však v této souvislosti uvědomit, že tyto substance jsou následně vylučovány z organismu ať již ve formě původní, či s modifikovaným skeletem v důsledku přirozených detoxifikačních pochodů. Mnohé z metabolitů však mají rovněž nezanedbatelnou biologickou aktivitu. Pokud se substance vnáší jako prekursor, který se mění na účinnou formu v důsledku enzymových pochodů, má dokonce aktivitu i vyšší. Kromě toho je u většiny farmak obvyklé, že se vylučují nikoliv jako jediná substance, ale jako směs původní látky a jejich metabolitů. Vzhledem k tomu, že hlavní exkretční cestou je glomerulární filtrace a následné vyloučení močí, dostávají se diskutované látky do komunálních odpadních vod a následně do celého ekosystému. Dalším faktorem je likvidace nepoužitých či prošlých léčiv, která jsou v domácnostech často likvidována s běžným kapalným či pevným odpadem. Zbavování se jich prostřednictvím odpadních kontejnerů či užitím toalety problém neřeší a spolupráce s pacienty je v tomto ohledu problematická. Čistírny odpadních vod jsou sice vybaveny technologiemi, které zajišťují eliminaci či úplné rozklad řady škodlivých látek, nicméně technologie není v současné době tak dokonalá, aby dokázala uspokojivě odstranit většinu používaných farmak a zamezila jejich vstupu do povrchových vod a jejich následné expanzi do potravních řetězců. Protože omezení farmakoterapie nelze předpokládat je nutné hledat nové technologické možnosti pro dodatečné odstranění těchto látek, ať už jako dodatečný krok k stávajícím technologiím čistíren odpadních vod, nebo jako metodu postupného odstranění stávajících kontaminovaných objektů.

K řešení tohoto problému se zdá být vhodné užít metody fytoextrakce, která umožňuje poměrně levnou a efektivní dekontaminaci zamořených ploch. Teoretické studium tohoto procesu potom napovídá o možnostech a mechanismu průniku studovaných xenobiotik do potravinových řetězců a umožňuje nalézt rostlinné druhy či jejich kultivary s vysokou absorpční schopností pro účely dekontaminace a naopak s nízkou schopností extrahovat studované látky pro produkční účely.

2. Výskyt farmak v povrchových vodách

Stále zvyšující se používání volně prodejných léčiv stejně jako zvyšování jejich preskripce způsobuje hromadění těchto látek v životním prostředí. Tam pronikají v důsledku jejich exkrece, zejména močí. Dalšími zdroji kontaminace jsou rovněž farmaceutický průmysl, nemocnice a veterinární ordinace.

Většina těchto látek je ve formě komunálních odpadních vod odvedena kanalizací do čistíren odpadních vod, kde je nejprve mechanicky přečištěna a zbavena největších nečistot. Poté jsou pomocí kyslíku a mikroorganismů odstraněny rozpustné nečistoty a minerální látky. Takto vycištěná voda se vypouští zpět do přírody. I přes tyto úpravy jsou v povrchových vodách naměřeny nízké koncentrace (ng- μ g/l) farmak. Tyto koncentrace sami o sobě nejsou vysoké, ale i takové koncentrace, jsou-li v prostředí stálé, mají nepříznivý dopad na ekosystém. Dochází k zabudování léčiv a jejich metabolitů do potravního řetězce a následně k fyziologickým změnám organismů žijících v takto kontaminovaných vodách.

Přítomnost farmak v prostředí roste s četností jejich užívání. Je zřejmé, že se např. koncentrace hojně používaného a volně prodejného ibuprofenu bude pohybovat v detegovatelných hodnotách, na rozdíl od léčiv méně často předepisovaných.

Nejčastěji vyskytujícími se a tedy i nejobávanějšími látkami jsou volně prodejná a hojně předepisovaná léčiva jako jsou dezinficiencia, antibiotika, antiparazitika, hormony a především analgetika a antiflogistika. Ze skupiny analgetik se jedná o látky nemorfinového typu (analgetika-anytipyretika, antiflogistika) tj. ibuprofen, diclofenak, ketoprofen, naproxen a to ať už v jejich původní chemické struktuře, či ve formě jejich metabolitů.[1-3].

2.1 Antiflogistika

Antiflogistika jsou látky, které potlačují projevy zánětu a z toho plynoucí poškození tkáně, navíc mají také analgetický a antipyretický účinek.

Zánět je přirozená komplexní reakce organismu na poškození tkáně. Účastní se ho mediátory zánětu (prostaglandiny, bradykinin, histamin, leukotrieny, serotonin) a buňky zánětu (žírné buňky, monocyty, neutrofilly). Buněčné membrány obsahují fosfolipidy, které se při poškození buňky uvolní a vlivem enzymu fosfolipasy dochází k odštěpení kyseliny arachidonové, která je metabolizována na řadu biologicky aktivních látek, vlivem cyklooxygenasy vznikají především prostaglandiny. V posledních letech bylo objeveno, že existují dvě formy cyklooxygenasy: COX-1 (podílí se na tvorbě „pozitivních prostaglandinů“), COX-2 (uplatňuje se v poškozené tkáni a produkuje prozánětlivé prostaglandiny)[4].

2.2 Nesteroidní protizánětlivé látky

NSAID (Nonsteroid anti-inflammatory drugs) jsou léčiva první volby v léčbě zánětu. Jejich působení je analgetické a ve vyšších dávkách protizánětlivé. Jsou indikovány při akutních a chronických zánětlivých a degenerativních onemocněních kloubů, svalů, šlach, páteře, zubů, hlavy a při virózách.

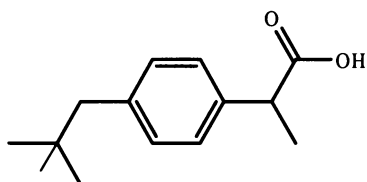
Mechanismus účinku spočívá v blokaci cyklooxygenasy, čímž inhibují syntézu prostaglandinů. Selektivita blokace cyklooxygenasy se odráží v množství nežádoucích účinků (NU). Klasická NSAID potlačují obě formy cyklooxygenasy, což má za následek častý výskyt NU. Látky selektivnější k COX –2 se vyznačují menším množstvím NU.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří poškození gastroduodenální sliznice, poškození ledvin, jater, krvetvorby, alergie, průjem a případné lékové interakce.

2.3 Ibuprofen

Hlavním představitelem nesteroidních antiflogistik je ibuprofen (obr.1), který je dobře absorbován v gastrointestinálním traktu. Vysoce se váže na proteiny plazmy

(90-99%) a v játrech je metabolizován na inaktivní sloučeniny. Neaktivní metabolity společně s malým množstvím nezměněné formy jsou exkretovány ledvinami - 95% zpracované dávky je eliminováno močí během 4 hodinového intervalu (eliminační poločas ibuprofenu se pohybuje v rozmezí 1,9-2,2 hod) [5].



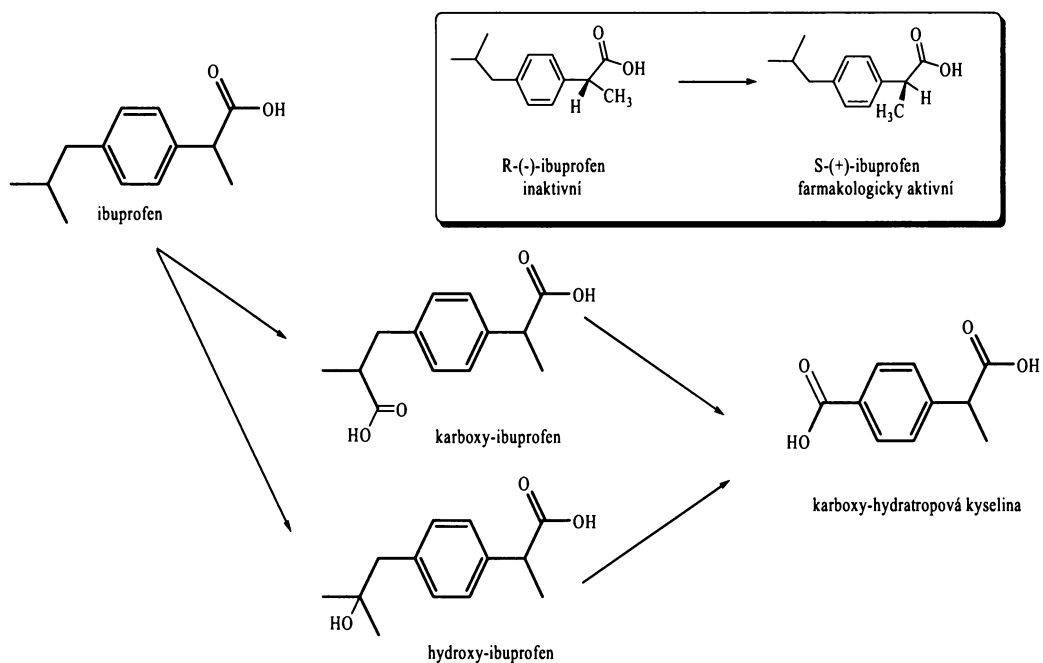
Kyselina 2-(4-isobutylfenyl)propionová

Obr.1 Chemický vzorec a systematický název ibuprofenu.

Kromě příznivých účinků ibuprofenu na potlačení bolesti a zánětlivých stavů se u této látky vyskytují dříve popsané nežádoucí účinky. Je kontraindikován u přecitlivělosti na ibuprofen, v období těhotenství, zejména v třetím trimestru a při aktivním gastrointestinálním krvácení nebo vředech.

Útlumu bolesti je v běžných dávkách (200 - 400 mg) dosaženo po přibližně 30 minutách, maximální antipyretický účinek je v intervalu za 2 - 4 hodiny po podání. Antipyretický účinek trvá 4 - 8 i více hodin, analgetický 4 - 6 hodin. [6].

Z farmakologického hlediska je rovněž podstatné že ibuprofen je chirální látka, jelikož má asymetricky substituovaný atom uhlíku. Pro člověka a jiné savce je aktivní jen S-(+)-forma na rozdíl od R-(-)-formy, která je neaktivní. Hmotnostní bilanci účinné formy komplikuje fakt, že neaktivní R forma je v organismu racemizována, čímž vzniká další množství fyziologicky aktivní formy. Ibuprofen je vylučován buď v nezměněné formě nebo ve formě metabolitů. Hlavní metabolity jsou hydroxy-ibuprofen, karboxy-ibuprofen a 2-(4-karboxyfenyl)propionová kyselina. (Obr. 2) [7].

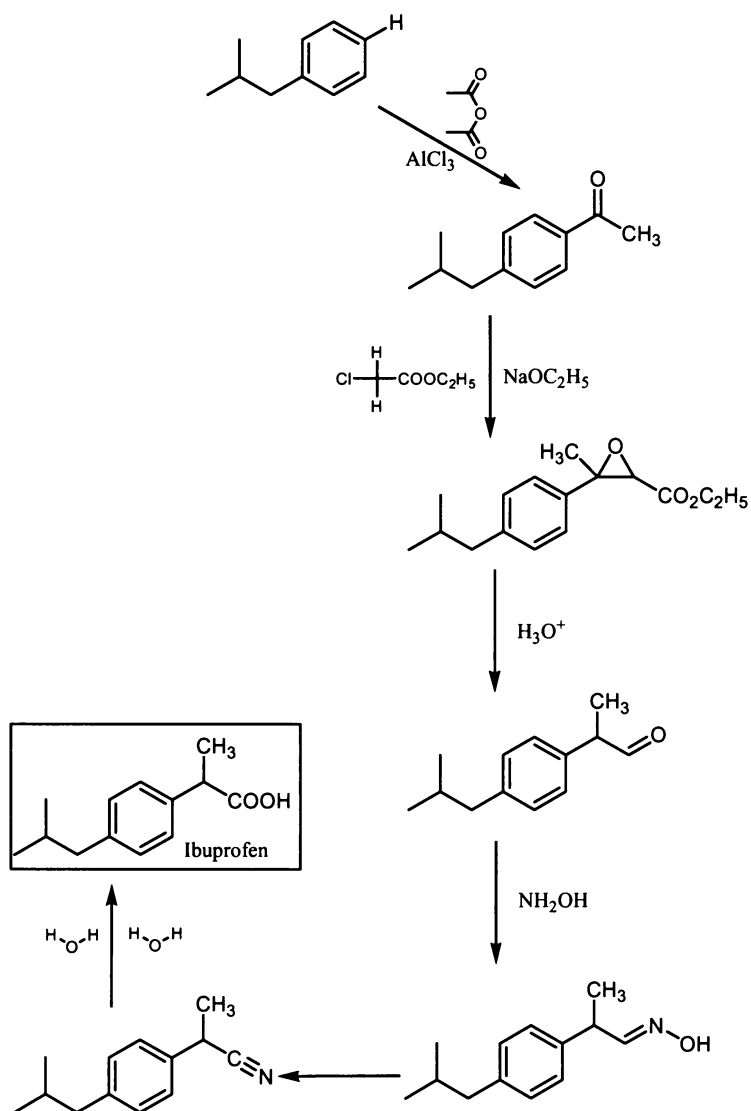


Obr. 2 Struktura enantiomerů ibuprofenu a metabolitů [7].

V širších souvislostech je nutné podotknout, že aplikace ibuprofenu není jedinou příčinou kontaminace povrchových vod. Samotná syntéza je spjata s tvorbou řady meziproduktů a odpadních produktů syntézy, které se svoji strukturou blíží finální struktuře ibuprofenu a mohou tedy vykazovat nežádoucí fyziologické účinky. V této souvislosti je třeba si uvědomit, že celosvětová produkce ibuprofenu se pohybuje v několika kilotunách a tato látka je třetí nejčastěji používaný lék na světě [8].

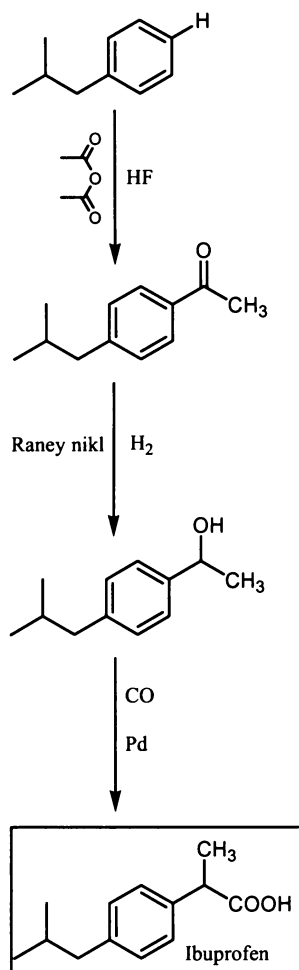
Pro ilustraci lze například uvést publikovaná data z Finska, která uvádí spotřebu 70200 kg/rok [9]. V Rakousku byla spotřeba ibuprofenu 6 696 kg/rok [10]. A ve Velké Británii v roce 2000 162 209 kg/rok [11].

Pro syntézu ibuprofenu se používají dvě základní metody. Dříve hojně užívá *Brown synthesis* (obr.3) zahrnuje 6 kroků jejíž výsledkem je ibuprofen a velké množství odpadních produktů. Vyjádřením čísla se jedná o 73% nežádoucích produktů a jen 27% požadovaného produktu [12].



Obr.3 Syntéza ibuprofenu – *Brown synthesis* [12].

Snaha omezit odpadní produkty při syntéze ibuprofenu vedla k rozvinutí nové syntézy *green synthesis* (obr.4) skládající se pouze ze tří kroků a menšího množství nežádoucích produktů [12].



Obr.4 Syntéza ibuprofenu – *green synthesis* [12].

Jak je vidět *Brown synthesis* vyžaduje pro reakci dodání pomocných reagentů, kdežto *Green synthesis* je trojkroková katalytická reakce. Katalyzátory se dají opětovně použít do následných reakcí a tříkrokový proces také znamená menší míru odpadu, což je nesporná výhoda pro environmentální čistotu.

3. Nežádoucí účinky nízkých koncentrací farmak v ekosystému

Vlivem lidské činnosti se dostávají do povrchových vod látky, které narušují biogeochemické cykly a negativně ovlivňují celé společenstvo. Obvykle se vyskytují v malém množství. Tyto látky likvidují některé složky společenstva a snižují druhovou rozmanitost, případně omezují růst, životní cyklus a reprodukci přežívajících organismů. Některé látky se mohou hromadit v organismech a

přenášet do dalších trofických článků až k člověku. Zvláště v aquatických systémech je obvyklé, že vodní rostlinné organismy bývají výrazně tolerantnější ke xenobiotické zátěži než vodní živočichové. Například mlži konzumující řasové nárusty jsou usmrcovány dávkou sloučenin kovů akumulovaných v rostoucích řasách [13].

Několik příkladů škodlivosti PPCPs v aquatickém prostředí a pitné vodě.

V Atlantě byla v pitné vodě nalezena stopová množství antibiotik, konkrétně trimethoprimu a sulfametoxazolu [14]. Také další antibiotika jako erythromycin, tobramycin, chloramphenikol a tetracyklin se vyskytují v povrchových vodách. Jejich přítomnost je zdrojem vzniku rezistence u některých mikroorganismů. Následkem toho dochází ke zvýšení obtížnosti léčby infekčních onemocnění.

Nesteroidní antiflogistika mají vliv na obratlovce i bezobratlé – inhibice syntézy prostaglandinů se projevuje i u ptáků, obojživelníků a ryb, což vede k narušení různých funkcí především ochranných mechanismů [15].

Při zkoumání efektů estrogenu a testosteronů v hodnotách ng/l byl nalezen při koncentraci 2 ng/l těchto hormonů pohlavní zvrát u ryb. Čímž je prokázána vysoká citlivost na nízké koncentrace steroidů [14].

Aktivní metabolity parfémových kompozit často působí estrogení aktivitou a ukázalo se, že jejich aktivita je dostatečná pro zvýšenou produkci rakovinových buněk prsu. Přítomnost těchto látek v ekosystému byla rovněž jasně prokázána [16].

Působením farmak a ostatních chemikálií, nepočítaje jejich přítomnost v pitné vodě, se nevyhýbá ani člověku. Ten je nepřímo vystaven působení PPCPs konzumací ryb a vodních organismů žijících v kontaminovaných vodách.

Tento výčet některých účinků není zdaleka obsáhlý, ale postačí na poukázání potřeby odstraňování xenobiotik z životního prostředí.

4. Interakce PPCPs s ekosystémem

4.1 Vliv rostlinného druhu

Vliv rostlinného druhu je jednou z podmínek účinné fytoextrakce. Je prokázáno, že některé rostliny jsou silně selektivní k určitým druhům xenobiotik, například

iontům těžkých kovů. Pro ionty kovů byly nalezeny rostliny, které vykazují abnormální schopnost akumulace určitého iontu či skupiny iontů. Takové rostliny se často nazývají hyperakumulátory. Pro vlastní aplikaci jsou však nevhodné, protože naprostá většina patří ke skupině sukulentních rostlin, u kterých je problémem malé množství tvořené biomasy a nalezení zdroje semen je rovněž nereálné. Pro organické kontaminanty se používá řada rostlin, především takových u kterých je

- zřejmý zdroj semenného materiálu
- tvorba velkého množství biomasy
- malá ovlivnitelnost klimatickými podmínkami vegetační sezóny
- vysoká rezistence vůči organickým sloučeninám extrahovaného typu
- nenáročnost na množství živin a charakteristiku půdy (v případě nehydroponické aplikace)
- vypracovaná a dostupná agrotechnika
- transport xenobiotik do nadzemních částí
- snadnost finální likvidace rostlinných zbytků (spálení, mikrobiální degradace)

V tab. 1 jsou uvedeny některé rostliny užívané k dekontaminaci znečištěných vod uvedenými kontaminanty z různých medií.

Medium	Kontaminanty	Typické rostliny
Půda, podzemní voda, výluhy ze skládek, aplikace odpadních vod na půdy	Herbicide(chlorované alifatické uhlovodíky, aromatické uhlovodíky), exploziva, živiny(dusičnany, amoniak, fosfor)	<i>Salicaceae</i> (vrby, topoly), trávy (kostřava, rákos, proso panenské, čirok), <i>Fabaceae</i> (jetel, vojtěška, vigna)
Podzemní voda, odpadní voda přes umělé mokřady	Sloučeniny kovů (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu), radionuklidy, hydrofobní organické sloučeniny	Řasy, stolistek vodní, potamogeton nodosus

Tab. 1 Typické rostliny užívané při dekontaminaci [17]

4.2 Procesy související s fytoextrakcí

Pro účinné odstranění PPCPs pomocí fytoextrakce se uplatňují následující mechanismy.

Přímá adsorpce/absorpce kořeny, při které se nerozpustné látky většinou váží pevně na povrch kořenů. Jedná-li se o látky s vyšší rozpustností, jsou tyto látky transportovány přímo do rostlinných tkání, kde mohou být různými detoxikačními mechanismy přeměněny na nefytotoxické sloučeniny (přeměna na více toxické sloučeniny rovněž není vyloučená) a dále ukládány např. do vakuol nebo jako součást ligninu do buněčné stěny.

Dalším procesem souvisejícím s možností adsorpce/absorpce látek kořenovým systémem, je uvolňování látek, které napomáhají mikrobiální mineralizaci v rhizosféře. Tyto látky mohou sloužit jako zdroj uhlíku a energie pro katabolismus organických látek znečišťující životní prostředí. Rostlinné exsudáty obsahují hlavně enzymy, alifatické a aromatické látky, aminokyseliny a cukry. Některé z těchto látek mohou působit též jako induktory bakteriálních procesů degradace některých organických xenobiotik [18].

Posledním mechanismem je činnost enzymových systémů ve vlastní rostlině. Hlavními enzymy, které působí na cizorodé molekuly jsou peroxidasy, oxygenasy, některé transferasy umožňující konjugaci parentních látek nebo metabolitů a v některých případech například i dehalogenasy, nebo reduktasy organických sloučenin.

5. Cíl práce

Cílem bakalářského projektu je studium fytoextrakce běžně užívaného farmaka ibuprofenu rostlinami laskavce ocasatého, bobu koňského a světlice barvířské především z hlediska fytoextrakční účinnosti. Ze získaného biologického materiálu (media po kultivaci, rostliny kultivované na ibuprofenem obohaceném mediu) poté připravit extrakty do ethyl-acetátu za účelem následných analýz metabolitů ibuprofenu a stresových metabolitů (vlastní analýza již není součástí bakalářského projektu). Nedílnou součástí je i příprava kalusové a suspenzní kultury laskavce jedlého a provedení biotransformačního experimentu do stadia extraktu metabolitů.

K zajištění řešení projektu je nutné:

- aktualizovat literární data dostupná v laboratoři
- vypracovat podmínky pro kultivaci uvedených rostlinných species ve sterilním *in vitro* uspořádání
- najít vhodný systém pro odvození a pasážování kalusové a suspenzní kultury laskavce jedlého
- příprava dostatečného množství biologického materiálu
- provedení fytoextrakčních experimentů se vstupními koncentracemi aktuálně upřesněnými školitelem
- ověření kvality stávajícího HPLC/UV stanovení koncentrace ibuprofenu v mediu
- stanovení koncentrací ibuprofenu v mediu ve vzorcích z fytoextrakčních experimentů
- provést extrakce kultivovaných rostlin a media a extrakty uvést do stavu vhodného pro skladování do doby dalších analýz
- provést kultivaci suspenzní kultury laskavce s přidaným xenobiotikem, získat extrakty z buněk a media
- zpracovat získaná fytoextrakční data a porovnat schopnost fytoextrakce u testovaných rostlin

6. Experimentální část

6.1 Chemikálie a přístroje

Biologický materiál: Semena rostliny laskavce jedlého *Amaranthus sp.* (Semo s.r.o., Smržice), byla použita pro odvození kalusu ze semenáčků sterilně naklíčených rostlin na mediu MSB ztuženém Agargelem (Sigma)

Pro odvození sterilních kultur *in vitro* kultivovaných rostlin byla použita semena následujících rostlinných druhů: laskavec ocasatý (duo mix) *Amaranthus caudatus* L. (Semo s.r.o., Smržice), bob koňský „Carola“ *Vicia faba* L. (semena Veleliby a.s., Veleliby u Nymburka), světlice barvířská *Carthamus tinctorius* L. (Seva-Flora s.r.o., Valtice) na mediích MS a MK3. Složení medií je uvedeno v tabulkách 4-6.

Přístroje: HPLC analýza byla provedena na chromatografickém systému INCOS, složeném z vysokotlakého čerpadla INCOS LPC 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS 5000. Použita byla kolona se sorbentem Reprisil 100C-18 (5 μ m) o rozměru 4,4 x 250 mm. Analýzy byly prováděny v mobilní fázi methanol/voda (8:2, v/v) s 0,1% kyselinou octovou, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, detekce UV při 210 nm. Data byla vyhodnocována chromatografickým programem Clarity (DataApex) včetně přepočtu dle kalibrační závislosti.

Dále byly použity přístroje: laminární box (labox, ČR), pH-metr (IQ, Scientific instruments), magnetická míchačka IKA-basic, rotační vakuová odparka Heidolph Laborota Digital (SRN).

Použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce 2

Chemikálie	Kvalita	Výrobce
Anorganické chemikálie pro přípravu media	čistota p a.	Lachema, ČR
Sacharosa	čistota p.a.	Kulich, Hradec Králové
Myo-inositol	pro tkáňové kultury	Sigma
Voda	získaná přístrojem DEMIVA	Watek, ČR
Methanol	pro HPLC	Lab-Scan, UK
Acetonitril	pro HPLC	Lab-Scan, UK
Ethylacetát	rektifikační čištění(vlastní)	Lachema, ČR
Savo	komerční produkt	Bochemie s.r.o Bohunín
DMSO	pro tkáňové kultury	Sigma
Ibuprofen	dle atestu pro přípravek Ibalgin	Zentiva a.s.
Fytohormony (NAA, NA, kinetin, 2,4-D)	pro tkáňové kultury	Sigma
Vitamíny (thiamin, pyridoxin, myo-inositol)	kvalita dle lékopisu	Zentiva a.s.

Tab.2 Přehled užitých chemikálií.

6.2 Kultivace celých rostlin a fytoextrakční experimenty

Semena určená k experimentu byla nejprve sterilizována působením 70% ethanolu po dobu 1 min a následně 10% roztokem Sava po dobu 20 min. Poté byla třikrát promyta sterilní destilovanou vodou a přenesena za sterilních podmínek do Erlenmayerových baněk (250, 500ml) obsahujících sterilní médium. Do každé kultivační baňky bylo vneseno 5 semen. U Amarantu, který má semena velmi malá bylo dávkování provedeno pomocí sterilní špachtle, což odpovídalo cca. 15 rostlinám/1 baňku. Složení media pro jednotlivé rostlinné druhy je uvedeno v tabulce 3. Sterilizační proces byl proveden stejně pro všechny rostlinné druhy s tím, že pro bob koňský byla opakována expozice Savem.

Pro semena laskavce jedlého bylo použito médium MSB (pro tvorbu kalusů zpevněné agargelem 3g/l a následně tekuté bez přídavku agaru pro vytvoření suspenzní kultury), pro laskavec ocasatý a světlici barvířskou bylo nejvhodnější použití media MS a pro bob koňský medium MK3.

Semena byla dále kultivována při 25°C s dvanáctihodinovým světelným režimem světlo/tma. Kultivační baňky, u kterých byla zřejmá kontaminace byly průběžně odstraňovány.

Po dosažení optimální velikosti (3-5 týdnů) byl k rostlinám přidán ibuprofen jako roztok v DMSO tak, aby bylo dosaženo vstupních koncentrací v experimentu v intervalu 5-20 mg/l. Ibuprofen byl podáván ve formě zásobního roztoku o koncentraci 10 mg/l. Po přidání ibuprofenu bylo medium v kultivačním experimentu promícháno a okamžitě byl odebrán kontrolní vzorek pro stanovení aktuální výchozí koncentrace.

Další vzorky určené k HPLC analýze byly odebírány za sterilních podmínek v množství 0,5 ml, v prvním týdnu denně, následně po 2-3 dnech (přesný časový harmonogram je uveden pro každou rostlinnou species přímo u výsledků). Experiment byl vždy ukončen při počátečních příznacích odumírání rostliny nebo známkách kontaminace kultury.

Po skončení experimentu byly rostliny promyty destilovanou vodou, zváženy a změřen objem zbylého media. Rostliny i medium byly dále zamrazeny při -18°C za účelem dalších analýz.

<i>Typ zásobního roztoku/sloučeniny</i>	<i>MS</i>	<i>MSB</i>	<i>MK3</i>
Makro [ml]	25	25	25
Mikro [ml]	0,25	0,25	0,25
Fe-komplex [ml]	1,25	1,25	1,25
Pyridoxin[mg]	-	0,25	-
Thiamin [mg]	-	2,5	-
NAA [mg]	-	0,25	-
NA[mg]	-	0,25	-
Kinetin [mg]	-	0,25	-
2,4,-D[mg]	-	0,5	-
Myo-inositol [mg]	25	25	25
Sacharosa[g]	7,5	7,5	-
voda	ad 250 ml	ad 250 ml	ad 250 ml

pH před autoklávováním nastaveno na 5,8-6,0

Tab. 3 Složení užitých medií. (Všechna média vychází ze základního media dle Murashiga a Skooga [19].

<i>Chemikálie</i>	<i>Koncentrace (mg/l)</i>
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170

Tab. 4 Makro - složení.

<i>Chemikálie</i>	<i>Koncentrace (mg/l)</i>
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6
Komplexon I	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025

Tab.5 Mikro - složení.

<i>Chemikálie</i>	<i>Koncentrace (mg/l)</i>
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8

Tab.6 Fe-komplex - složení.

6.3 Izolace produktů biotransformace ibuprofenu

6.3.1 Izolace z media

Pro možnou následnou analýzu produktů biotransformace ibuprofenu byly rostliny i media extrahovány ethyl-acetátem. Na 100 ml media bylo použito 25 ml ethyl-acetátu a extrakce probíhala za intenzivního míchání magnetickým míchadlem v Erlenmeyerově baňce při 90°C po dobu 5 minut. Po ochlazení byla v dělicí nálevce oddělena organická fáze a medium bylo opět extrahováno další, stejnou dávkou ethyl-acetátu. Spojené organické extrakty byly vysušeny bezvodým síranem hořečnatým. Sušidlo bylo odděleno filtrací a rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Odparek byl uložen při – 18°C pro další analýzy.

6.3.2 Izolace z rostlin

Za použití malého množství mořského písku byly rostliny homogenizovány v třecí misce, převrstveny ethyl-acetátem a vloženy do ultrazvukové vany po dobu 20 min. Poté byla vrstva etyl-acetátu oddělena. Celá extrakce byla ještě jednou opakována. Získané extrakty byly spojeny a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Zbýlý postup byl stejný jako při izolaci z media.

6.3.3 Izolace ze suspenzní kultury kalusů

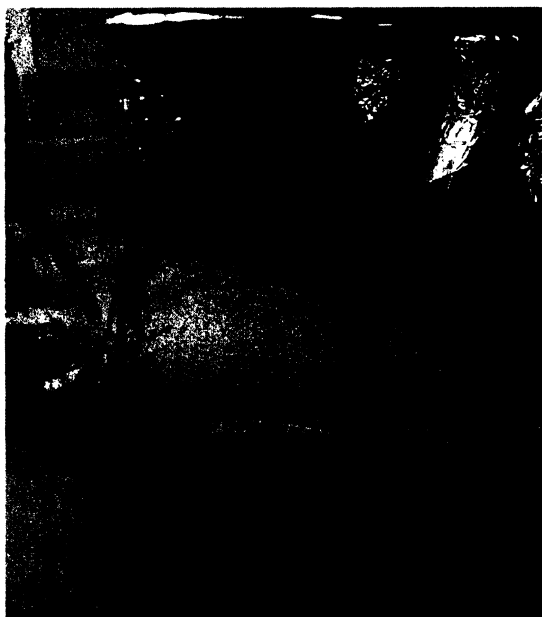
Postup extrakce byl identický s izolacemi z rostlin a media.

7. Výsledky a diskuse

Základním bodem řešení projektu bylo vypracování metodiky sterilní *in vitro* kultivace rostlin a získání dostatečného množství sterilního rostlinného materiálu pro provedení fytoextrakčních pokusů. Kultura laskavce sice byla již dříve v laboratoři provozována, nicméně z důvodu nedostatku semenného materiálu bylo nutné přejít na jiný, v současné době dostupný kultivar. Vzhledem k tomu, že rozdílné kultivary téhož druhu se mohou chovat vůči sterilizaci a *in vitro* kultivaci odlišně, bylo nutné ověřit či modifikovat zavedený postup. Ukázalo se, že iniciaci kultur je možné provést za již dříve používaných podmínek s tím, že citlivost vůči roztoku chlomanu sodného je poněkud větší a rezultuje v nižší klíčivost vysazených semen. Zkrácení doby sterilizace či snížení koncentrace dezinfekční látky nebylo testováno, protože z předchozích zkušeností by to nejspíše vedlo k vyššímu úhynu kultur z důvodů bakteriální či kvasinkové kontaminace. Pro světlici barvířskou byly aplikovány tytéž podmínky a vedly k úspěšné iniciaci kultur v jednotlivých kultivačních baňkách. U bobu koňského se dlouho nedařilo získat sterilní kulturu, nasazená semena podléhala kvasným procesům a hnilobě. Odstranění tohoto problému loupáním povrchových slupek po nabobtnání ve sterilní vodě se nezdařilo a problém byl částečně vyřešen dvojnásobnou sterilizací, která sice nepůsobí dobře na klíčivost, ale umožňuje získat sterilní kulturu, neboť semena a rostliny bobu jsou

velké a nechá se s nimi v prostředí laminárního boxu přijatelně manipulovat. I tak je ale kultivace tohoto druhu prozatím problematická, nicméně je zase vysoce atraktivní z hlediska praktického využití, nárůstu biomasy a jednoduché agrotechniky.

Větším problémem obvykle bývá získání kalusové kultury, která je mimořádně vhodná pro studium metabolitů přidaných xenobiotik. Obecným principem je, že se sterilizovaná část rostliny umístí na medium s vhodným obsahem fytohormonů (auxin, cytokinin) a dojde ke spontánní tvorbě nediferencované tkáně – kalusu. Množství fytohormonů a dalších komponent media nelze přímo odvodit, ale stanovuje se zkusem a ze série experimentů na různě modifikovaných živných půdách se vybere ten, který produkuje světlý, rychle rostoucí a ve vodném roztoku rozpadavý kalus, což má velký význam pro následné převedení do formy suspenzní kultury s výhodou používané pro metabolické experimenty. Jako zdroj biologického materiálu byly zvoleny sterilní semenáčky laskavce vyklíčené přímo na kultivačním mediu. Není to zcela obvyklý postup nicméně vyklíčené rostliny jsou tak nepatrné, že jakákoliv manipulace s nimi je bez mechanického poškození prakticky nemožná. Pro indukci kalusu byla testována řada obvyklých medií používaných v laboratoři školitele a nejlepším se ukázalo medium na bázi Murashige-Skoogovy směsi anorganických solí s přidanou sacharosou (30 g/l), *myo*-inositolem (100 mg/l), vitamíny pyridoxinem (1 mg/l) a thiaminem (10 mg/l) a kombinací fytohormonů NAA, NA a kinetin (každý 10 mg/l) a 2,4-D (2 mg/l). Vzniklý kalus byl odstraněn od zbytků mateřského pletiva a pasážován na čerstvé medium se stejným složením. Objem kalusu se za daných kultivačních podmínek zdesetinásobí přibližně za tři týdny kultivace. Vzniklá kalusová kultura *Amaranthus* sp. VH0107AS/s byla použita pro přípravu suspenzní kultury přenesením cca. 1 g kalusové hmoty do 50 ml kapalného média o stejném složení a kultivována na orbitální třepačce za teplotně a světelně obdobných podmínek jako v případě kalusu. Z násady řady suspenzních kultur byly poté selektovány ty, které rostly jako převážně homogenní suspenze. Pokusy, které vedly ke vzniku velkých buněčných shluků, byly likvidovány. Homogenní suspenze je vyžadována právě při biotransformačních experimentech k zajištění maximální výměnné plochy mezi buňkami a roztokem xenobiotika v mediu. Ukázky kalusové a suspenzní kultury jsou na obrázcích 5 a 6.



Obr. 5 Kalusová kultura Amarantu VH0107AS/s



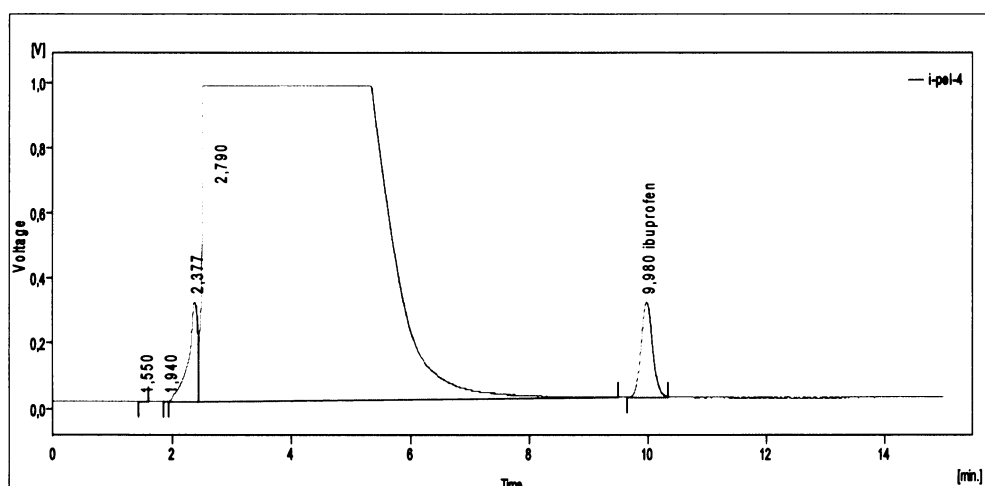
Obr. 6 Suspenzní kultura Amarantu VH0107AS/1

V jiné části práce byla pozornost zaměřena především na studium fytoextrakce v *in vitro* uspořádání.

Klíčovou otázkou je stanovení koncentrace ibuprofenu v kultivačním mediu. V práci byla použita metodika zavedená v laboratoři školitele pomocí HPLC s UV detekcí při 210 nm. Metoda umožňuje stanovení koncentrace z přímého nástřiku kultivačního media. Převzaté podmínky včetně kalibrace byly před vlastními

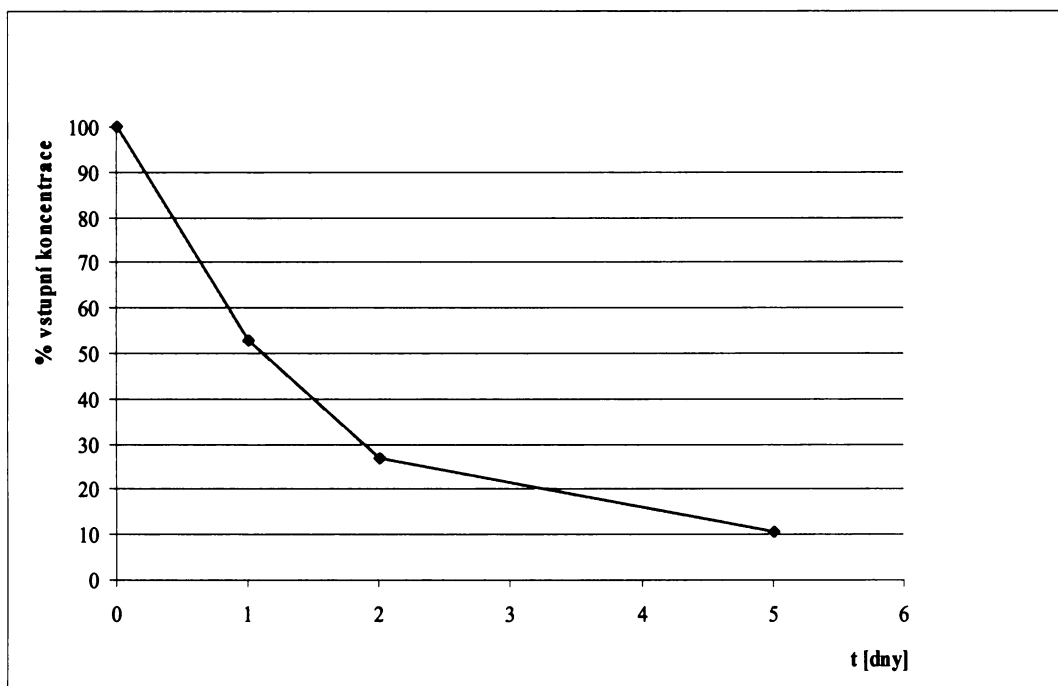
analýzami ověřeny několika zvlášť připravenými vzorky. Ukázka chromatogramu je na obr. 7.

Široký pík je důsledkem přítomnosti komponent media, vlastní signál ibuprofenu s retenčním časem těsně pod 10 minut je dostatečně separován a délka analýzy je i pro měření velkých sérií vzorků přijatelná.



Obr.7 Chromatogram ibuprofenu v kultivačním mediu (kolona 4×250 mm, Reprosil 100 C-18, mobilní fáze methanol/voda (8/2, v/v) s 0,1 % kyseliny octové, průtok 0,7 ml/min, detekce UV 210 nm).

V kultuře amarantu byly testovány vstupní koncentrace ibuprofenu v kultivačním mediu 5, 10 a 15 mg/l. Při výchozí koncentraci 5 mg/l bylo po 24 hodinách kultivace přítomno 38 % vstupní koncentrace, za dalších 24 hodin kleslo množství ibuprofenu na 5 % a 5 dnů od počátku kultivace bylo v průměru z 12 experimentů nalezeno pouhých 1,4 % vstupní koncentrace, přičemž v některých experimentech byly hodnoty pod limitem detekce (0,1 mg/l). Při vyšších vstupních koncentracích – 10 mg/l je pokles po 5 dnech na 2,6 % vstupní hodnoty (průměr ze 14 experimentů) a při 15 mg/l (14 experimentů) se naměřené hodnoty pohybují v rozsahu 5 – 37 % vstupní hodnoty, což již svědčí o možné toxicitě uvedené koncentrace ibuprofenu. Průměrná hmotnost rostlin v jednom experimentu odpovídá 1,4 g čerstvé hmotnosti a celková průměrná extrakční účinnost 0,32 mg ibuprofenu/g rostliny. Celkový průběh fytoextrakce jako průměr přes všechny použité koncentrace a experimenty je na obr. 8.



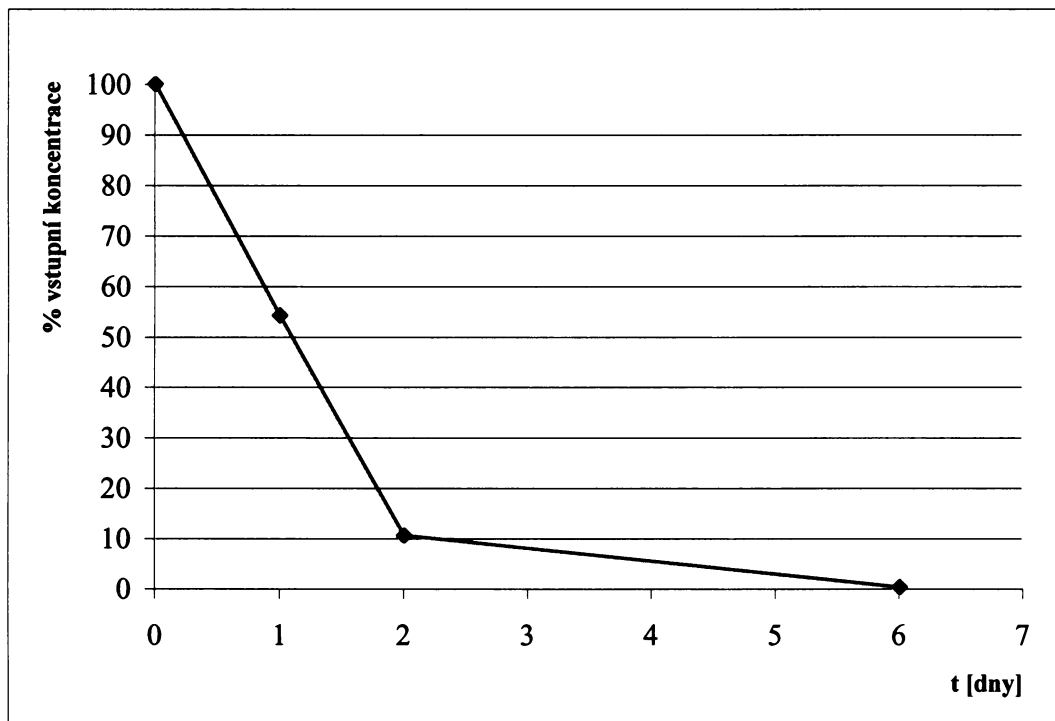
Obr. 8 Časový průběh fytoextrakce rostlinami Amarant (laskavec). Koncentrace v jednotlivých časových bodech jsou průměrem ze všech měření při všech vstupních koncentracích a jsou stanoveny HPLC/UV 210 nm.

U rostlin bobu koňského byly vzhledem ke kultivačním potížím vyhodnoceny pouze 4 experimenty v oblasti vstupních koncentrací 10 – 20 mg/l. U ostatních experimentů došlo k zakalení media, což je zřejmou známkou kontaminace a výsledky by byly superposicí biotransformace kontaminujícími mikroorganismy a vlastního fytoextrakčního pochodu. Jelikož kontaminace kultury je rovněž stresovým faktorem pro kultivovanou rostlinu, neměly by výsledky žádnou informační hodnotu. Průběh fytoextrakčního experimentu je uveden v tabulce 7

Experiment č.	Koncentrace v t = 0 (% výchozí koncentrace)	Koncentrace v t = 1 den [mg/l] (% výchozí koncentrace)	Koncentrace v t = 2 dny [mg/l] (% výchozí koncentrace)	Koncentrace v t = 6 dnů [mg/l] (% výchozí koncentrace)	Finální čerstvá hmotnost rostliny [g]
1	10,2 (100 %)	8,9 (87 %)	3,54 (3,5 %)	0,8 (8 %)	20,6
2	11,2 (100 %)	5,5 (49 %)	1,2 (11 %)	0,1 (1 %)	nestanoveno
3	11,4 (100 %)	5,1 (45 %)	2,1 (18 %)	0,2 (2 %)	16,5
4	19,6 (100 %)	7,0 (36 %)	1,9 (10 %)	0,2 (1 %)	18,1

Tab. 7 Protokol z experimentu fytoextrakce ibuprofenu bobem koňským (koncentrace stanoveny HPLC/UV 210 nm).

Časový průběh fytoextrakce bobem je znázorněn na obr. 9, kde jsou vyneseny průměrné koncentrace ze všech čtyř experimentů v jednotlivých časových bodech.

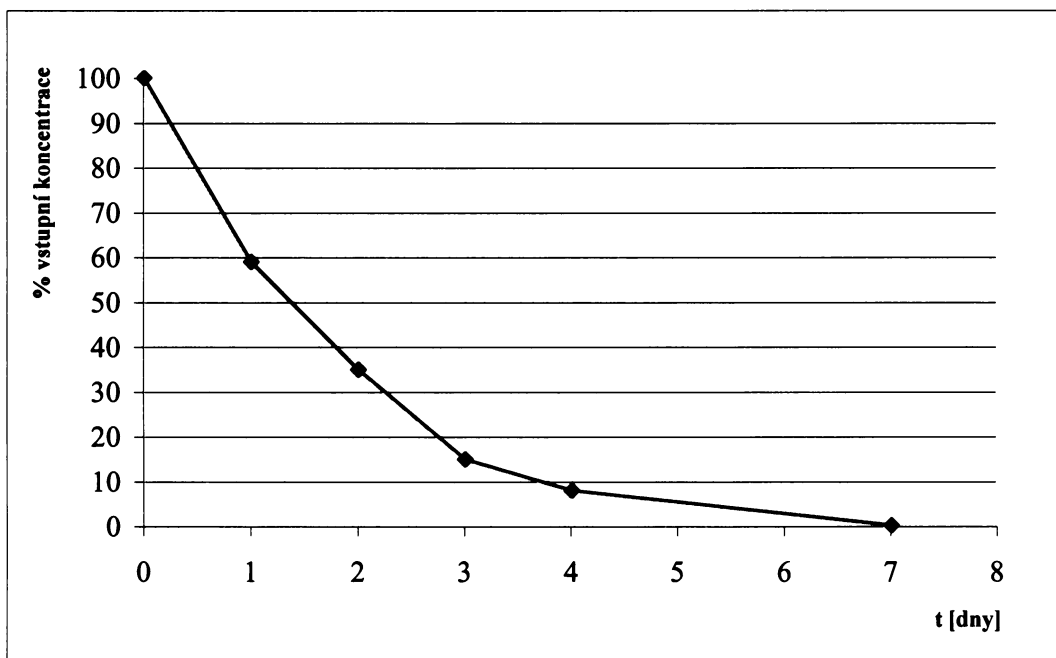


Obr. 9 Časový průběh fytoextrakce rostlinami bobu koňského. Koncentrace v jednotlivých časových bodech jsou průměrem ze všech měření při všech vstupních koncentracích a jsou stanoveny HPLC/UV 210 nm.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že rostliny bobu koňského jsou schopny během 6 dnů snížit aktuální koncentraci v mediu o 97 %. Dva z experimentů byly prodlouženy na 9 dnů, kdy koncentrace ibuprofenu již nebyly použitou metodou kvantifikovatelné. Průměrná extrakční schopnost je 0,6 mg ibuprofenu na 1g čerstvé hmotnosti rostliny.

Světlice barvířská byla studována z hlediska fytoextrakce ibuprofenu v oblasti koncentrací 1 – 20 mg/l ve 20 experimentech. Vyjádříme-li výsledky v průměrných hodnotách bylo po 24 hodinách kultivace nalezeno v mediu 59 % vstupní koncentrace, po 48 hodinách 35 % a po 72 hodinách 15 %. Další odběr byl v čase 96 hodin od začátku kultivace a prokázal, že došlo k dalšímu snížení koncentrace ibuprofenu až na 8 % výchozí hodnoty, v čase 7 dní pak byly nalezené hodnoty

kolem 0,2 %. To všechno při průměrné hmotnosti biologického materiálu v jednom experimentu 2,8 g čerstvé hmotnosti což odpovídá extrakční schopnosti až 4,7 mg ibuprofenu na 1 g čerstvé hmotnosti rostliny. Průběh extrakce je znázorněn na obr. 10.



Obr. 10 Časový průběh fytoextrakce rostlinami světlice barvířské. Koncentrace v jednotlivých časových bodech jsou průměrem ze všech měření při všech vstupních koncentracích a jsou stanoveny HPLC/UV 210 nm.

Vzhledem k výraznému snížení koncentrace ibuprofenu se zdá být světlice barvířská potenciálním kandidátem k praktické aplikaci, nutné je však dále zkoumat fytoextrakční účinnost v přiblížení se k reálným koncentracím a sledovat osud ibuprofenu v jejich tkáních.

Cílem práce nebylo studium metabolitů a to především z důvodů časových a z důvodu použité analytické metody pro fytoextrakční experimenty, která v daném uspořádání nedovoluje identifikovat metabolity, maximálně může podat výpověď o jejich existenci nebo spíše o vzniku extrahovatelných metabolitů, které jsou přítomny v rostlině ve volné a tedy extrahovatelné formě. Vzhledem k velkému množství získaného biologického materiálu z kultivací na ibuprofenem obohaceném mediu však bylo účelné připravit alespoň extrakty z medií a získaných rostlin a uchovat je pro řešení některého z navazujících projektů. Proto byla provedena příprava extraktů z jednotlivých kultivačních experimentů a tyto jsou ve vhodné

formě (vysušeny, - 18 ;C) uchovány pro analytické experimenty. Řešení případného obsahu metabolitů bude nutné provést citlivější analytickou metodou než byla použita v této práci, předpokládá se použití kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí, která zároveň podá i informace o možné struktuře nalezených sloučenin. Otázkou v tomto směru zůstává metodika přečištění extraktů a zbavení se balastních látek, především chlorofylu, který by mohl vést ke zničení chromatografické kolony v LC/MS systému. V rámci této práce byla provedena pouze analýza tenkovrstevnou chromatografií, která neposkytla z hlediska přítomnosti metabolitů jednoznačné výsledky. Je sice pravdou, že HPLC analýzy prokázaly výskyt několika nových signálů i v případě analýz media. Snaha identifikovat tyto látky z HPLC separace však prozatím nebyla úspěšná a nelze v dané chvíli zodpovědně konstatovat ani zda se jedná o metabolity ibuprofenu jako takové či pouze o substance vylučované do media xenobiotickým stresem. Stejný osud mají v současné době i připravené extrakty z kultivace suspenzní kultury laskavce, které budou analyzovány v rámci dalšího navazujícího projektu.

8. Závěr

V předložené práci byla jednoznačně prokázána schopnost použitých rostlinných druhů laskavce ocasatého, bobu koňského a světlice barvířské extrahovat ibuprofen z vodných roztoků v oblasti koncentrací 5 – 20 mg/l, přičemž bob koňský a světlice barvířská se ukázaly být poměrně rezistentní, pro rostliny laskavce byly koncentrace nad 10 mg/l již zřetelně toxické. Množství extrahovaného ibuprofenu v biologickém materiálu (mg ibuprofenu/g čerstvé hmotnosti) bylo nalezeno 0,32 pro rostliny laskavce, 0,6 pro bob koňský a 4,7 mg/g pro světlici barvířskou jako potenciálního kandidáta pro další zkoumání a praktické aplikace. Z rostlin a medií po kultivaci, stejně tak jako ze suspenzní kultury laskavce byly získány ethyl-acetátové extrakty vhodné pro další analýzy z hlediska metabolitů ibuprofenu či substancí vylučovaných xenobiotickým stresem.

9. Literatura

1. Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J.M.: *Water Res*, **39**, 4790 (2005).
2. Carballa, M.; Omil, F.; Lema, J.M.; Llupart, M.; Garcia-Jares, C.; Rodriguez, I.; Gomez, M.; Ternes, T.: *Water. Res.* **38**, 2918 (2004).
3. Antonič, J.; Heath, E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1337 (2007).
4. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Ziegler, A.: *Atlas Farmakologie*, Grada 1994.
5. <http://www.tga.gov.au/pi-ibuprofen1.vtf> (24.5. 2007).
6. <http://www.sukl.cz/cs02leciva/cs02vyhledavani.php?k=1&j=1&t=ibu&strana=2> (24.4.2007).
7. Buser, H-R.; Poiger, T.; Mueller, M.D.: *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2529 (1999).
8. Hutt, A. J.; Caldwell, J.: *J. Pharm. Pharmacol*, **35**, 693 (1983).
9. Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L.: *Water Res*, 163 (2004).
10. Sattelberger, R.: *Umweltbundesamt Sien*, 162 (1999).
11. Plassche, EJ van de.; Balk, F.: Environmental risk assessment of the polycyclic musks AHTN and HHCB according to the EU-TGD (Risico evaluatie van de polycyclische musken AHTN en HHCB in het milieu volgens de EU-TGD), RIVM rapport 601503008, 1997, abstract: <http://www.rivm.nl/lib/Reports/601503008.html> (29.11.2006).
12. <http://www.chemistry.org/portal/resources/ACS/ACSContent/education/greencem/case.pdf> (11.5.2007).
13. Lellák, J.; Kubíček, F: *Hydrobiologie*, Karolinum, Praha 1991.
14. http://www.campusecology.wsu.edu/jw_review_of_ppcps.pdf (25.7.2007).
15. http://www.campusecology.wsu.edu/m_roth_review_of_ppcps.pdf (25.7.2007).
16. Rimkus, G.; Butte, W.; Geyer, H.J.: *Chemosphere* **35** (7), 1497 (1997).
17. <http://www.ueb.cas.cz/laboratory%20of%20Plant%20Biotechnologies/fytoremediace.pdf> (17.4.2007).
18. http://recetox.muni.cz/sources/unido_narodni_inventura_03/POPsINV_cast_VII_Kapitola_16_Biodegradace_PCBs.pdf (22.6.2007).
19. Murashige T., Skoog F.: *Phys. Plantarum*, **15**, 473 (1962).

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi CSc., a ostatním členům laboratoře za odborné vedení, cenné rady, ochotu kdykoli poradit a pomoc a dále za poskytnutí příjemného zázemí.