

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2020

Pavla Petráňová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Statiny – jejich použití, mechanismus účinku,
vedlejší efekty.**

**Atorvastatin a možnosti jeho fotochemické
degradace v přírodních vodách.**

Bakalářská práce

Pavla Petráňová

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2020

Petráňová, P., 2020: **Statiny – jejich použití, mechanismus účinku, vedlejší efekty. Atorvastatin a možnosti jeho fotochemické degradace v přírodních vodách.** [Statins – applications, mechanism of action, side effects. Atorvastatin and possibilities of its photochemical degradation in natural waters. Bc. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The Bachelor's thesis deals with a group of hypolipidemic drugs, statins. In the theoretical part, their development, characteristics, mechanism of action and side effects are presented. The experimental part is focused on one representant of statins, atorvastatin, its possible photochemical degradation in aqueous solution under light conditions relevant to natural waters, and a potential toxic effect of atorvastatin itself and of the mixture of products of atorvastatin photochemical degradation on a water plant *Lemna minor*.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 30. listopadu 2020

.....

Podpis

Cíl práce

Cílem práce bylo

- provést rešerši na téma statiny – jejich použití, mechanismus účinku a vedlejší efekty, a to se zaměřením zejména na atorvastatin jakožto nejvíce používaného zástupce této skupiny léků;
- provést ozařování roztoku atorvastatinu zdrojem imitujícím krátkovlnnou oblast slunečního záření dopadajícího na zemský povrch, ověřit vliv iontů železa jako případného katalyzátoru a vyhodnotit možnost fotochemické degradace atorvastatinu v přírodních vodách;
- provést test toxicity atorvastatinu a směsi produktů jeho fotodegradace na vodní rostlině *Lemna minor*.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce paní doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za cenné rady, věnovaný čas a nesmírnou ochotu odpovědět na jakýkoliv dotaz nejen ohledně bakalářské práce, ale i studia. Vždy si na mě udělala čas, výborně mi poradila a měla se mnou trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Pavle Fojtíkové, PhD. z laboratoře environmentální a analytické chemie za pomoc s obsluhou HPLC analyzátoru, za provedení HPLC analýz a za rady týkající interpretace výsledků.

Poděkování patří i Lindě Muškové, studentce bakalářského studia, obor Biologie a chemie pro vzdělávání, za poskytnutí okřehku pro testy toxicity.

Na závěr bych ráda poděkovala své nejbližší rodině za podporu nejen během psaní bakalářské práce, ale i během studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Statiny – vývoj a mechanismus účinku.....	3
1.2	Charakteristika statinů a jejich vedlejší efekty.....	9
1.3	Statiny v přírodních vodách – výskyt a možnosti degradace	11
2	Materiál a metody.....	13
3	Výsledky.....	16
4	Diskuze	22
5	Závěr.....	25
6	Seznam použité literatury	26
7	Přílohy	36

1 Úvod

Výskyt farmaceutických přípravků v přírodních vodách je do značné míry přičítán skutečnosti, že se léky stávají stále důležitějším a téměř nezbytným prvkem běžného života (Dietrich et al., 2002). Farmaceutické látky, konkrétně např. hypolipidemika, antibiotika a léky proti bolesti, byly detekovány v odpadních vodách z domácností, z komunálních, průmyslových a léčebných zařízení, ale též v povrchových, a dokonce i podzemních vodách (Chander et al., 2016). I když naměřené koncentrace jsou nízké (v řádech ng/l – µg/l), kontinuální uvolňování těchto látek do odpadních vod a odtud do přírodních toků představuje závažnou hrozbu pro vodní organismy různých trofických úrovní. Farmaceutické přípravky patří mezi tzv. emergentní polutanty, tedy nově se objevující znečišťující látky, jejichž zkoumání přitahuje v posledních letech stále větší pozornost po celém světě.

Statiny jsou skupinou léčiv široce používaných při léčbě hyperlipidémie (Santos et al., 2016). Jejich funkce spočívá v inhibici enzymu reduktázy 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA reduktáza), který je potřebný pro syntézu cholesterolu. Do této skupiny léčiv patří například pravastatin, rosuvastatin, simvastatin a atorvastatin, který je jedním z nejvíce užívaných statinů (Montanaro et al., 2009). V České republice se za rok 2018 prodalo přes 647 825 balení atorvastatinu o různých velikostech (SÚKL, 2018), čímž zaujal první místo v tabulce nejvíce užívaných léků. V jednom balení je 7 až 100 tablet s obsahem 10 mg aktivní látky, tedy při průměrném balení o 50 tabletách toto roční prodané množství představuje 324 tun atorvastatinu.

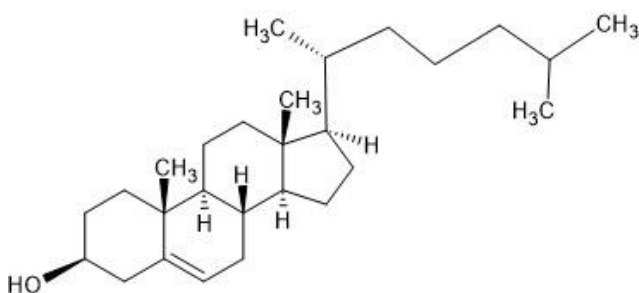
Atorvastatin je nejčastěji člověkem v nemetabolizované formě vylučován z těla ven (Gracia – Lor et al., 2012) nebo je i často z neopatrnosti nepoužitý rovnou spláchnut do kanalizace. Těmito způsoby se dostává do čistíren komunálních odpadních vod. Běžné čistírny odpadních vod nejsou speciálně navrženy k odstranění různorodých kontaminantů přítomných v nízkých koncentracích (Boleda et al., 2011; Wu et al., 2016), proto jsou zbytky léčiv, včetně atorvastatinu, z velké části vypouštěny s vyčištěnou odpadní vodou dál do povrchových vod, i když v posledních letech čistírny zavádějí postupy na co největší odstranění i těchto mikrokontaminantů, např. sorpcí na aktivním uhlí (Katsigiannis et al., 2015).

Xenobiotické látky antropogenního původu mohou v přírodních vodách podléhat biologickým (mikrobiálním) i nebiologickým transformačním procesům (Wilde et al., 2016; Li et al., 2017). Mezi nebiologickými přeměnami, důležitými zejména u látek rezistentních k mikrobiálnímu odbourání, se uplatňují zejména hydrolytické a fotochemické reakce (Xia et al., 2009). Proto je fotochemické odbourávání farmaceutických i jiných mikropolutantů předmětem zájmu vědců.

1.1 Statiny – vývoj a mechanismus účinku

Cholesterol je nezbytný pro fungování všech lidských orgánů, protože je součástí buněčných membrán, avšak jeho nadbytek v organismu může být příčinou srdečních chorob. Za století výzkumu vědci podali řadu důkazů, které prokazují příčinnou souvislost mezi hladinou cholesterolu v krvi, aterosklerózou a srdečním onemocněním. Vědci a farmaceutický průmysl na základě těchto znalostí úspěšně vyvinuli pozoruhodně účinnou skupinu léků zvanou statiny, které snižují hladinu cholesterolu v krvi a v důsledku toho i počtu kardiovaskulárních onemocnění.

V roce 1784 byl cholesterol poprvé izolován ze žlučových kamenů a v roce 1888 přesně stanoven sumární vzorec cholesterolu (Li, 2009). Struktura molekuly cholesterolu byla vysvětlena až na počátku 30. let minulého století (Vance & Van den Bosch, 2000). Strukturální vzorec cholesterolu je znázorněn na Obr. 1.



Obr. 1: Strukturální vzorec cholesterolu (ChEBI).

Již během 19. století byl rozpoznán jev „kornatění tepen“, který se označuje termínem ateroskleróza. V roce 1910 Heindrich Otto Wieland a Adolf Windaus zjistili, že aterosklerotické plaky z aort lidských jedinců obsahují více než 20krát vyšší koncentrace cholesterolu než normální stěna aorty (Goldstein & Brown, 2003).

Zásadní výzkum úlohy cholesterolu v lidské ateroskleróze ve skutečnosti nezačal až do 40. let 20. století, a to kvůli názoru, že nemoc je důsledkem stárnutí organismu a nelze se vůči ní bránit. Teprve objevení genetické souvislosti mezi cholesterolem a srdečními infarkty bylo pro výzkum spojitosti cholesterolu se srdečními infarkty zásadní. Tento objev byl uskutečněn v roce 1939 norským lékařem Carlem Müllerem, který popsal několik velkých rodin, ve kterých se vyskytovaly vysoké hladiny krevního cholesterolu a docházelo k předčasným srdečním infarktům v mladém věku (Varghese, 2014).

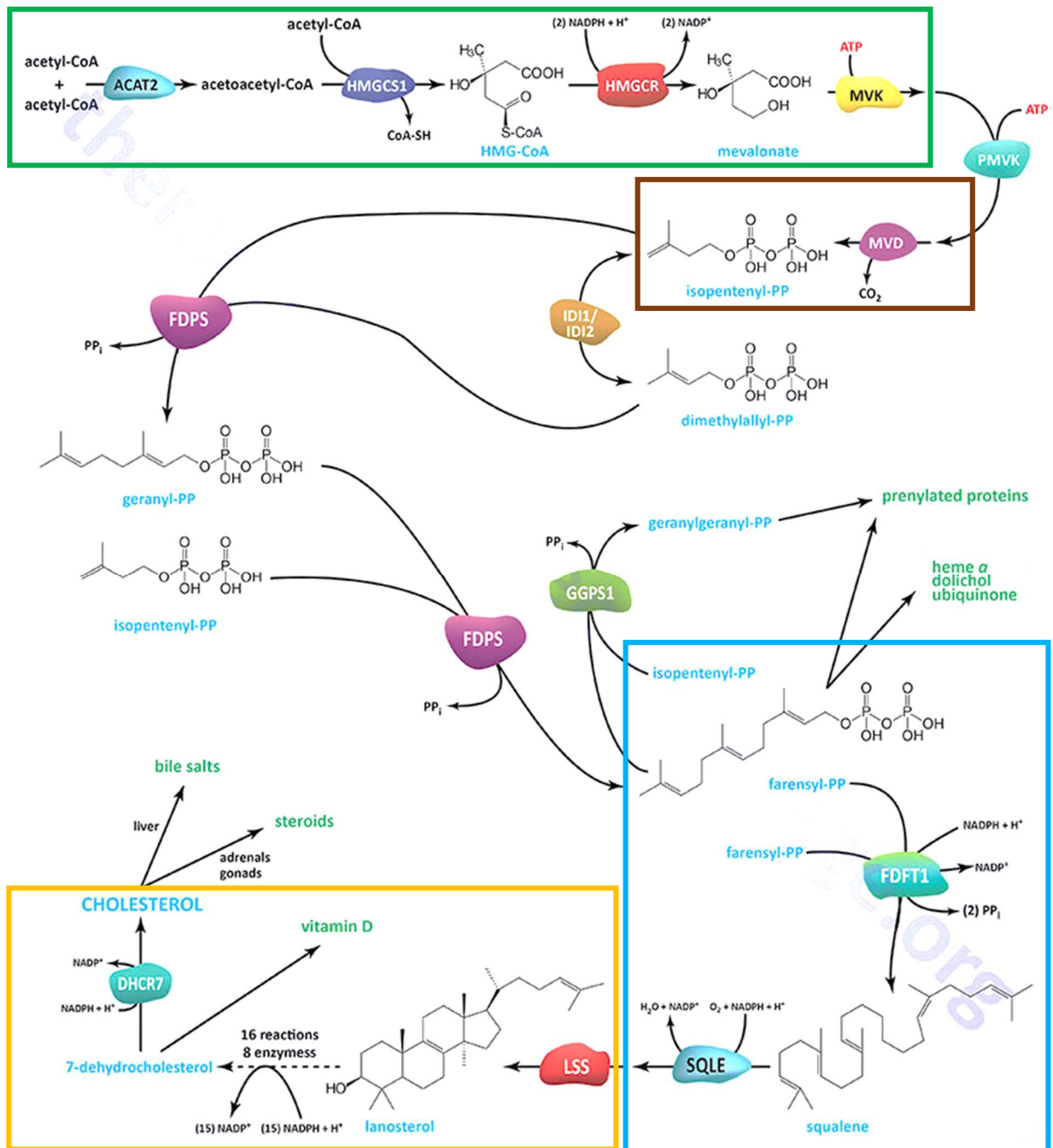
Ovšem až v polovině 60. let 20. století bylo obecně přijato genetické chápání tohoto syndromu, který se stal známým pod názvem familiární hypercholesterolemie, FH (Khachadurian, 1964).

Na počátku 50. let 20. století proběhly epidemiologické studie spojení cholesterolu a koronárních onemocnění, provedené Gofmanem a jeho spolupracovníky (Gofman et al., 1950; Gofman et al., 1956). Studie vedly nejen ke zjištění, že srdeční záchvaty korelovaly se zvýšenými hladinami cholesterolu v krvi, ale také k výsledku, že cholesterol byl obsažen v komplexu s lipoproteinem, který měl nižší hustotu než jiné lipoproteiny; proto tento lipoprotein dostal označení podle své nižší hustoty LDL (Low Density Lipoprotein). Studie provedené Gofmanem et al. (1950) navíc potvrdily, že srdeční infarkty byly méně časté, když krev obsahovala zároveň zvýšené hladiny jiného lipoproteinu, lipoproteinu o vysoké hustotě, označovaném zkratkou HDL (High Density Lipoprotein).

Spojení z pohledu epidemiologie mezi cholesterolem v krvi a koronární aterosklerózou bylo definitivně prokázáno výzkumnou skupinou pod vedením Ancela Keyse (Keys et al., 1955; Keys et al., 1966), která sledovala výskyt srdečních záchvatů u 15 000 mužů ve středním věku po dobu 10 let. Bylo zjištěno, že množství tuku v potravě má významný vliv na koncentraci cholesterolu v krevním séru.

Klinické důsledky zvýšené hladiny cholesterolu v organismu stimulovaly od 50. let intenzivní výzkum syntézy cholesterolu v lidském těle. Většina zásadních kroků v syntéze cholesterolu, zahrnujících 30 enzymatických reakcí, byla objasněna koncem 50. a v průběhu 60. let minulého století (Bucher et al., 1960; Popják et al., 1962; Bloch, 1965; Dietschy & Wilson, 1968).

Syntéza cholesterolu probíhá v játrech, a to ve čtyřech fázích, které jsou znázorněny na Obr. 2. První fáze zahrnuje kondenzaci tří acetátových jednotek za vzniku šestiuhlíkatého meziproduktu zvaného mevalonát za účasti enzymu reduktázy 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA reduktáza); tento krok je hlavním bodem regulace na cestě k cholesterolu, právě inhibicí této reakce je dosahováno snížení hladiny cholesterolu. Druhou fází je syntéza isopentenylidifosfátu, tedy přeměna mevalonátu na aktivované izoprenové jednotky. Třetí fáze zahrnuje syntézu skvalenu, který vzniká reduktivní dimerací farenilydifosfátu. Čtvrtá fáze, v níž se tvoří tetracyklické struktury ze skvalenu, vede ke konečnému produktu – cholesterolu.

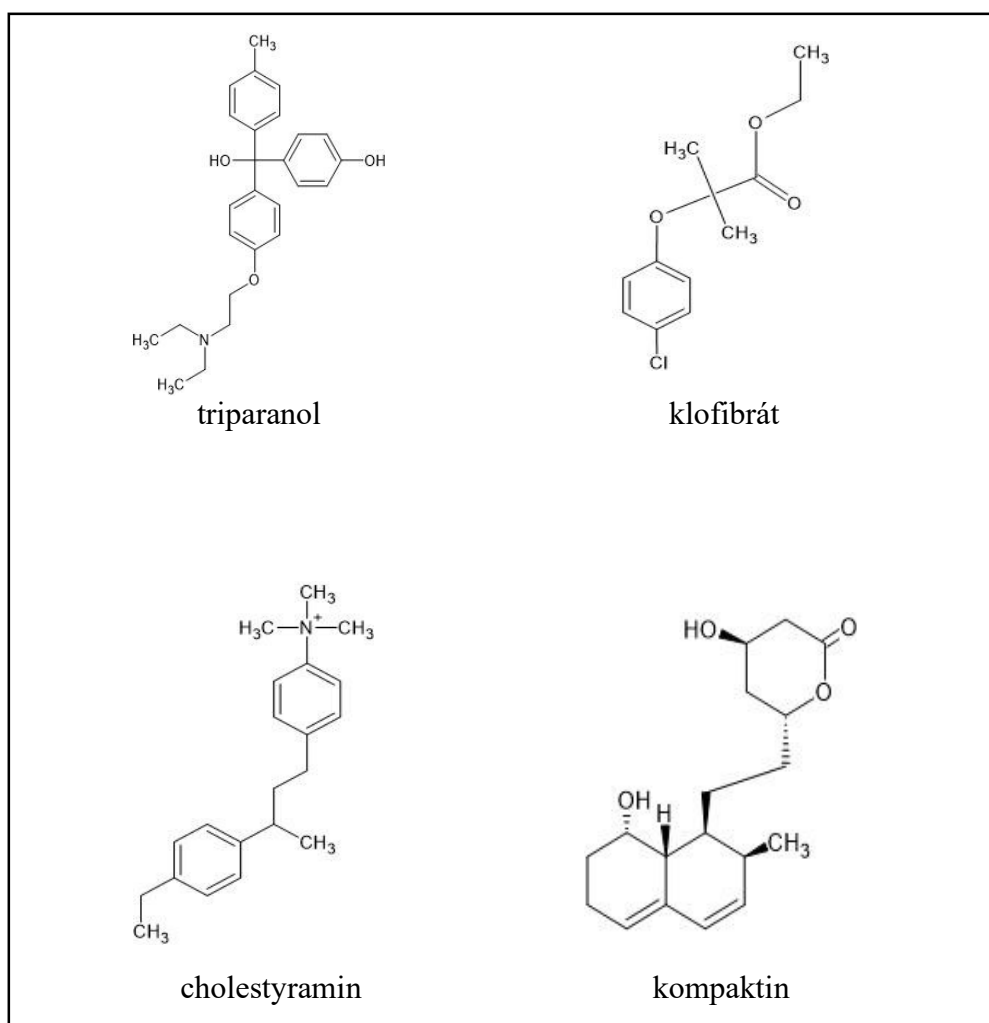


Obr. 2: Syntéza cholesterolu v lidském organismu (upraveno dle Medical Biochemistry) – znázornění základních čtyř fází syntézy: fáze 1 – zelený rámeček, fáze 2 – hnědý rámeček, fáze 3 – modrý rámeček, fáze 4 – žlutý rámeček.

Od konce 50. let mnoho farmaceutických společností hledalo látky, které by blokovaly jeden ze 30 kroků syntézy cholesterolu z acetyl-koenzymu A (Steinberg, 2006). První synteticky připravenou látkou, snižující hladinu cholesterolu, byl triparanol, který byl ale brzy stažen kvůli závažným vedlejším účinkům (Kirby, 1967).

Postupně byly jako do jisté míry účinné prokázány kyselina nikotinová, fibráty, (např. klofibrát) a cholestyramin.

Nadějným preparátem, vyzolovaným z plísně *Penicillium citrinum*, byl tzv. kompaktin, který inhiboval syntézu sterolů, a to inhibicí enzymu 3-HMG-CoA reduktázy. Ovšem testy na zvířatech měly překvapivé výsledky, protože u některých druhů test nevedl ke snížení hladiny cholesterolu v krvi (krysy, psy, opice), naopak např. u slepic a koček byl vysoce účinný (Endo, 1992). Vzorce vybraných předchůdců statinů jsou znázorněny na Obr. 3.



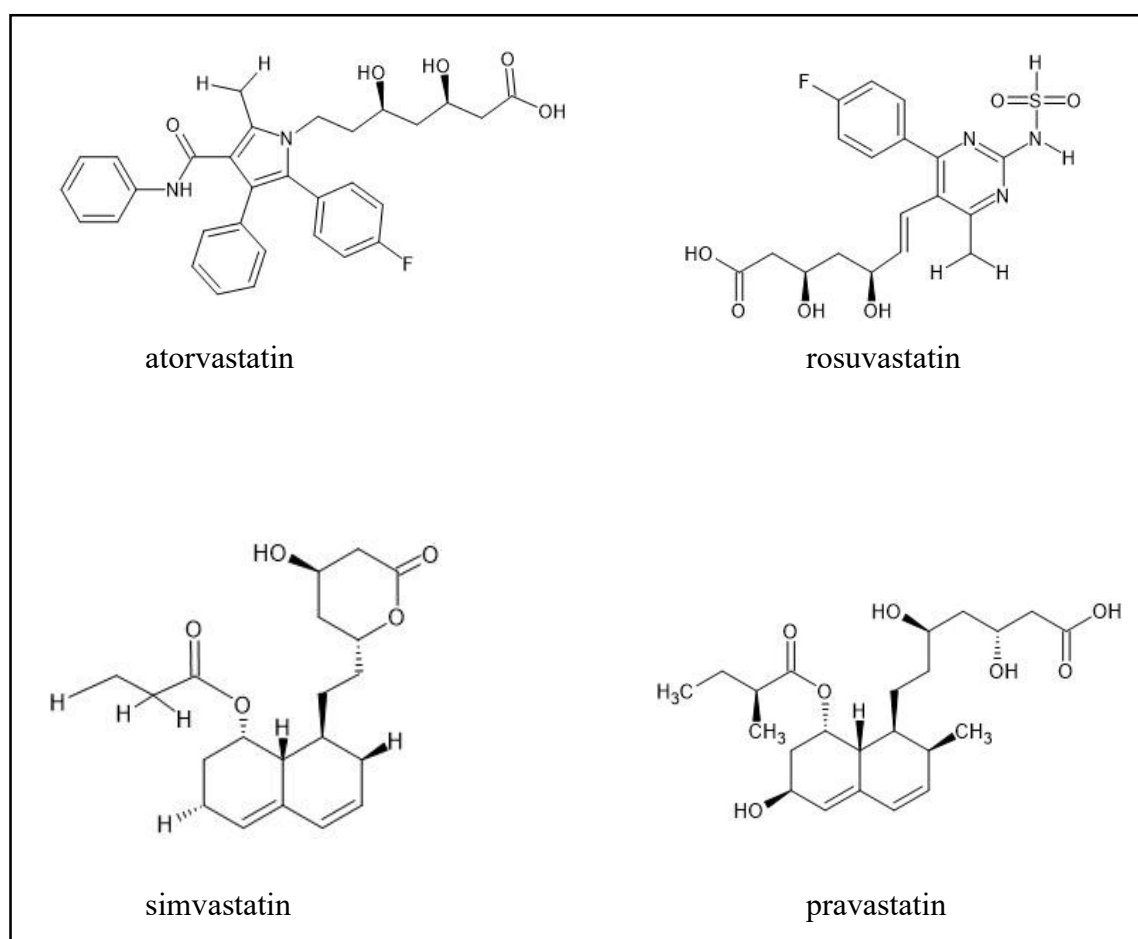
Obr. 3: Strukturální vzorce triparanolu, klofibrátu, cholestyraminu a kompaktinu (ChEBI; PubChem).

V předběžných testech s lidskými pacienty se ukázalo, že hladina cholesterolu, při užívání kompaktinu, v průměru klesla o 27 %, přičemž nebyly zaznamenány žádné závažnější vedlejší účinky (Yamamoto et al., 1980). Podobné výsledky poskytly i následné klinické testy (Mabuchi et al., 1983).

Protože ale testy na zvířatech, kterým byly dlouhodobě podávány velmi vysoké dávky (0,1 – 0,2 g/kg/d¹), prokázaly iniciaci k tvorbě lymfomů, byla podpořena snaha o nalezení jiných látek podobné struktury, které by nedisponovaly takovýmito vedlejšími účinky (Endo, 2017).

V roce 1980 byla publikována práce Albertse et al. o izolaci účinného inhibitoru 3-HMG-CoA reductázy izolovaného z kultury *Aspergillus terreus*, nazvaného mevinolin a později přejmenovaného na lovastatin (Vega & Grundy, 1987; Drugbank, 2020).

Na základě účinnosti těchto přírodních látek byly postupně uvedeny na trh syntetické látky s podobnými účinky s hromadným označením statiny (Endo, 2017), z nichž atorvastatin a rosuvastatin jsou nejúčinnějšími co do schopnosti snížení LDL cholesterolu. Další léky jako simvastatin a pravastatin, lovastatin a fluvastatin mají slabší účinky. Struktury nejvíce používaných látek jsou znázorněny na Obr. 4.



Obr. 4: Strukturální vzorce nejvíce používaných statinů: atorvastatin, rosuvastatin, simvastatin, a pravastatin (ChEBI).

¹ g/kg/d – Tato jednotka vyjadřuje gramy podávané látky na kilogram hmotnosti pokusného objektu za den.

Za vysoce intenzivní hypolipidemickou léčbu, u které předpokládáme snížení LDL cholesterolu o 50 % a více, lze označit užívání 20 – 40 mg rosuvastatinu nebo 40 – 80 mg atorvastatinu (proLékaře, 2019). Méně potentní statiny jsou i ve svých maximálních dávkách méně účinné, navíc bylo zjištěno, že zdvojnásobení dávky statinu vede k poklesu zhruba o 5 % v hladině celkového cholesterolu a poklesu o 7 % v hladině LDL cholesterolu.

Z toho vyplývá, že v případě nedostatečné terapeutické odpovědi se doporučuje, namísto zvyšování dávky, vystřídat méně potentní statin za účinnější molekulu. U pacientů vyžadujících agresivní hypolipidemickou léčbu pak volit rovnou rosuvastatin či atorvastatin.

1.2 Charakteristika statinů a jejich vedlejší efekty

Atorvastatin se řadí do skupiny syntetických statinů (Hájková et al., 2008), jehož sumární vzorec je $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ a název dle IUPAC² (3R,5R)-7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-propan-2-ylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid;2-methylpropan-2-amine (PubChem).

Poprvé byl syntetizován v roce 1985 americkým vědcem Bruce Rothem (Corey et al., 2008). Atorvastatin je produkován jako trihydrát atorvastatinu vápenatého nebo trihydrát hemivápenaté soli atorvastatinu, jejímž vzorcem je $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2Ca \times 3H_2O$. Atorvastatin uvedla na trh firma Warner Lambert ve spolupráci s firmou Pfizer v roce 1996. Ve Spojených státech amerických se prodává původní přípravek pod názvem Lipitor (Roth, 2002), v České republice pod názvem Sortis (Hájková et al., 2008), ale v současnosti existuje řada generik od různých firem se stejnou účinnou látkou (trihydrátem vápenaté soli atorvastatinu), např. Atorvastatin Aurovitas či Apo-Atorvastatin, oba s účinnou látkou v množství 10, 20, 40 a 80 mg na tabletu (SÚKL, 2020; Zdravotnictví a medicína, 2020).

Atorvastatin se z více než 98 % se váže na plazmatické bílkoviny (Vítovec et al., 2017). Po perorálním užití je rychle absorbován stěnou střeva, přičemž jeho maximální plazmatická koncentrace v krevní plazmě je dosažena po 1 – 2 hodinách po podání (Hájková et al., 2008). Systémově dosažitelná inhibiční aktivita HMG-CoA reductázy klesne na hodnotu 30 %. Průměrný eliminační poločas atorvastatinu je přibližně 14 hodin, zatímco poločas jeho aktivních metabolitů je 20-30 hodin (McIver & Siddique, 2020). Většina absorbovaného atorvastatinu (98 %) je vylučována v nezměněné podobě stolicí nebo močí, pouze asi 20 % je metabolizováno cytochromem P450 3A4 na hydroxylované metabolity, které také vykazují snížení hladiny cholesterolu (Vítovec et al., 2017). Z tohoto důvodu je riziko interakcí s léky metabolizovanými tímto cytochromem nízké. Souhrn charakteristik vybraných statinů je shrnut v Tab. I.

² IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry.

Tab. I: Základní charakteristika statinů – dávkování, setrvání v organismu a způsob vylučování (upraveno dle Vítovce et al., 2017).

příklady statinů	dávkování [mg]	setrvání v organismu (biologický poločas) [hod]	způsob vylučování moč/stolice [%]
atorvastatin	10–80	14	2/70
rosuvastatin	5–40	21	10/90
simvastatin	10–40	1,5	0/60
pravastatin	20–40	1,5	20/80

Z Tab. I vyplývá, že atorvastatin a rosuvastatin mají výrazně (řádově) delší biologický poločas než dva zbývající zástupci. U všech statinů převládá výrazně vylučování stolicí nad sekrecí močí.

Přestože statiny díky svým účinkům představují velmi účinný nástroj prevence náhlé mozkové příhody a vzniku aterosklerózy a vykazují kardioprotektivní účinek, mohou se u některých osob (zejména při užívání vyšších dávek) objevit některé nežádoucí účinky, které pak představují limitaci pro léčbu (Vítovec et al., 2017). Mezi nejvýznamnější patří neurologické projevy, zejména vliv na funkčnost svalů, kdy způsobují svalovou bolest nebo dokonce myopatii, postihující 3 – 5 % nemocných, která v extrémním případě může vést až k rozsáhlejšímu poškození svalů (Češka et al., 2015). Dalšími možnými nežádoucími účinky je nepříznivý efekt na spouštění funkce hnědého tuku a poškození až dysfunkce jater. Játra mohou být poškozena, jelikož jsou primárním cílem působení statinů (Balaz & Wolfrum, 2019). Statiny jsou též spojovány se zvýšeným výskytem diabetu 2. typu, ovšem mechanismus není jasný (Henriksbo et al., 2014).

1.3 Statiny v přírodních vodách – výskyt a možnosti degradace

V posledních letech se objevují práce, prokazující přítomnost statinů v přírodních vodách. Tak např. studie z Ontaria (Kanada) prokázala atorvastatin a rosuvastatin ve vzorcích všech 11 testovaných čističek s mediánem koncentrace na výstupu 77 ng/l pro atorvastatin a 324 ng/l pro rosuvastatin (Lee et al., 2009). V horním toku řeky Tennessee River (USA) byly na přítoku do několika čističek odpadních vod nalezeny koncentrace některých statinů v rozmezí 10 – 20 ng/l (Conley et al., 2008). Ve vodě z řeky Apies v blízkosti města Pretorie v Jihoafrické republice bylo detekováno pět statinů v koncentracích okolo 100 ng/l u každého jednotlivě (Tete et al. 2020). Langford a Thomas detekovali některé zástupce statinů v povrchových vodách v okolí hlavního města Norska v koncentracích až více než 100 ng/l (Langford & Thomas, 2011). V České republice byl atorvastatin přítomen v 21 vzorcích, a to v maximální koncentraci do 1,5 µg/l (Ministerstvo zemědělství, 2018), jiné statiny nebyly stanovovány.

Práce autorů Lam et al. (2004) a Lam & Mabury (2005) se zabývaly možnostmi fotochemických přeměn atorvastatinu v přírodních vodách. Lam et al. (2004) provedli experiment, při němž léčiva vystavili slunečnímu záření v rybniční vodě a ve sterilované rybniční vodě. U atorvastatinu zjistili, že poločas úbytku je v obou případech prakticky totožný, což vedlo k závěru, že biologické odbourávání není příčinou úbytku atorvastatinu, ale že je způsoben fotochemickými přeměnami. Zjistili také, že některé primárně vytvořené produkty fotodegradace jsou dále rozkládány, takže po 24hodinovém ozařování některé produkty z reakční směsi vymizely. Lam & Maruby (2005) zkoumali vliv rozpuštěných organických látek (DOM – dissolved organic matter)³ na fotodegradaci atorvastatinu; výsledky ukázaly, že přítomnost rozpuštěných organických látek má pozitivní vliv na rychlost odstraňování atorvastatinu. Navíc zjistili, že kromě organických látek mohou mít na fotochemickou degradaci pozitivní vliv i anorganické ionty, např. NO_3^- , tak i HCO_3^- . Razavi et al. (2011) zkoumali vliv rozpuštěných organických látek (DOM – dissolved organic matter) na fotodegradaci atorvastatinu s použitím standardu fulvokyseliny izolovaného z řeky Suwannee a podíl reaktivních sloučenin kyslíku, jako $^1\text{O}_2$ nebo $\cdot\text{OH}$ na degradaci.

³ Zkratkou DOM (dissolved organic matter) se označuje různorodá skupina přírodních organických látek proměnné velikosti a chemické struktury, které ve vodě vznikají rozkladem organických látek a syntézou nových produktů. Frakce DOM je definována jako ty látky rozptýlené ve vodě, které projdou filtrem o velikosti pórů 0,45µm. Ve větším množství dodávají vodě žlutohnědé zbarvení.

Poločas přetrvání atorvastatinu v čisté vodě byl stanoven na 6,9 hodin, zatímco v přítomnosti rozpuštěných organických látek v koncentraci 67 mg organického uhlíku/l klesl až na 0,6 hodin (Razavi et al., 2011).

Statiny svou přítomností v přírodních vodách mohou mít vliv na vodní organismy. Experimenty na rybách *Danio rerio* (Thorpe et al., 2004) a *Oncorhynchus mykiss* (Estey et al., 2008; Ellesat et al., 2010) prokázaly pokles metabolické aktivity. Expozice mořského mlže *Mytilus edulis* atorvastatinu v koncentraci 1,2 µg/l měla za následek vyčerpání tělesných zásob nejen lipidů, ale též cukrů a bílkovin, ale i potlačenou transkripci klíčových enzymů mitochondriální biogeneze (Falfushynska et al., 2019). Liu et al. ve studii simvastatinu na vodního korýše *Daphnia magna* pozorovali, že dlouhodobá expozice (21denní test) vede ke snížení produkce vajíček a nižší růstové rychlosti (Liu et al., 2019).

Kromě vodních živočichů mohou emergentní polutanty ovlivňovat i rostliny. V této souvislosti se uplatňují testy na okřehek (*Lemna* sp.), protože se jedná o organismus, který je rozšířen po celém světě. *Lemna* sp. jsou cévnaté rostliny volně plovoucí po vodní hladině. Vzhledem k jejich malé velikosti, jednoduché struktuře (rostlinné tělo redukováné na stélku s jedním kořínkem), vegetativnímu způsobu rozmnožování a snadné kultivaci jsou ideálním testovacím organismem (Mkandawire et al., 2013). Doba trvání testů toxicity se obvykle udává 4 nebo 7 dní (OECD, 2002). Nejčastěji jsou měřeny parametry jako je listová plocha a délka kořínků. U *Lemna gibba* pozorovali Brain et al. (2006) ve své studii, zaměřené na látky v biosyntéze mevalonové kyseliny, snížené koncentrace stigmasterolu a β-sitosterolu, což jsou kritické komponenty rostlinných membrán a regulátory morfogeneze a vývoje. Pro atorvastatin stanovili hodnotu EC₁₀⁴ na 26 µg/l.

⁴ EC₁₀-je efektivní koncentrace obvykle udávaná v mg/l nebo µg/l., která má za následek měřitelný efekt v 10 % testovaných organismů, např. redukci fotosyntetické aktivity o 10 % v biotestu s použitím *Lemna* sp.

2 Materiál a metody

Atorvastatin byl zakoupen od firmy Merck v čistotě $\leq 99,9\%$. Pro další použití byl atorvastatin rozpouštěn v Milli-Q[®] vodě na koncentraci cca 50 mg/l, což odpovídá molární koncentraci $4,1 \times 10^{-5}$ mol/l. FeCl₃ od firmy Lachema byl rozpuštěn v HCl o koncentraci 0,2 mol/l na výslednou koncentraci 26 g Fe/l.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru Shimadzu UV-1601 se softwarem UV-Probe.

Ozařování bylo provedeno ve fotochemickém reaktoru Rayonet R100 osazeném lampami RPR 3000Å, které emitují záření 250–350 nm. Záření o vlnových délkách kratších než 300 nm bylo odfiltrováno optickým sklem (ozařování bylo prováděno ve skleněných kyvetách opatřených víčkem). Zářivý tok (energie všech vlnových délek v detekčním rozmezí přístroje vyzářená za jednotku času) byl měřen přístrojem Lutron UV A, po přepočtení na ozařovanou plochu jeho hodnota činila 4,5 W.

Chromatografická stanovení byla prováděna na přístroji Thermo Scientific Dionex Ultimate system 3000 (USA) se spektrofotometrickou a fluorescenční detekcí na koloně Kinetex C18 (150 x 3,0 mm; 5µm). Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu (40 %) a vody s přidavkem 0,001% kyseliny mravenčí (60 %). Použitý průtok byl 1 ml/min, nástríkový objem vzorku 5 µl. Eluce byla prováděna isokraticky. Detekce byla prováděna spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem PDA 3000RS s využitím vlnové délky 247 nm a fluorescenčním detektorem FLD 3000RS s excitační vlnovou délkou 245 nm a emisní vlnovou délkou 390 nm. Pro zpracování chromatografických dat byl použit program Chromeleon.

Stanovení dvojmocného železa v ozářené reakční směsi bylo provedeno s použitím 1,10 – fenantrolinu jako komplexačního činidla, absorbance vzniklého komplexu byla měřena při 510 nm.

Test toxicity atorvastatinu a produktů jeho fotochemické degradace byl provedena na vodní rostlině jménem okřehek (*Lemna minor*) podle metodiky OECD Guideline 221 (OECD, 2002). Okřehek byl odebrán z Mollerovského rybníka v Netolicích (jižní Čechy, souřadnice: 49°02'53";14°12'30").

Před testem byla rostlina kultivována po dobu 3 týdnů v médiu Swedish Standard *Lemma* Growth Medium (SIS). Pro přípravu tohoto média byla připraveny zásobní roztoky, jejichž složení udává Tab. II.

Tab. II: Složení zásobních roztoků pro přípravu růstového média (SIS média) pro okřehek.

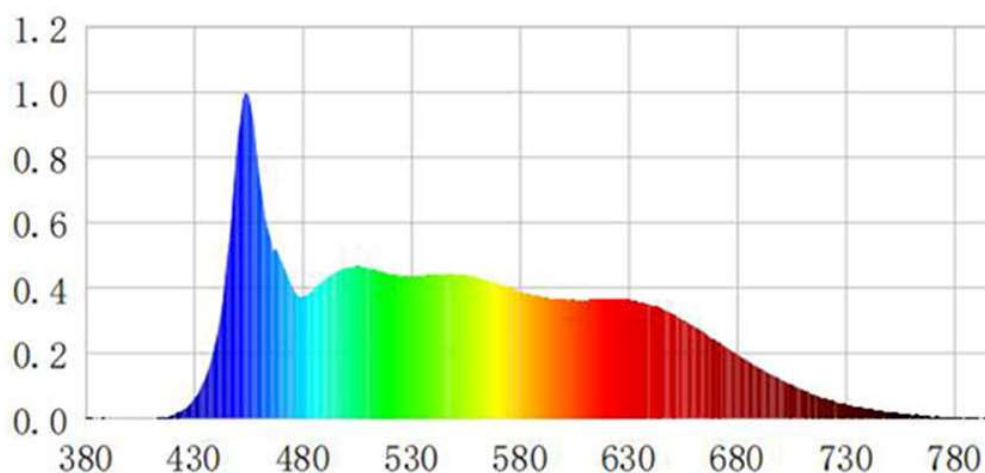
roztok	složení	koncentrace [g/l]
I	NaNO ₃	8,5
	KH ₂ PO ₄	1,34
II	MgSO ₄ .7H ₂ O	15
III	CaCl ₂ .2H ₂ O	7,2
IV	Na ₂ CO ₃	4
V	H ₃ BO ₃	1,0
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,2
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,01
VI	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,17
	Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	0,28
VII	MOPS (buffer)	490

Pro přípravu 1 litru SIS média bylo do kádinky na objem 1 litr k cca 750 ml Milli-Q[®] vody přidáno:

- 10 ml zásobního roztoku I
- 5 ml zásobního roztoku II
- 5 ml zásobního roztoku III
- 5 ml zásobního roztoku IV
- 1 ml zásobního roztoku V
- 5 ml zásobního roztoku VI
- 1 ml zásobního roztoku VII

Následovala úprava pH na hodnotu 6,5 (doporučené rozmezí je $6,5 \pm 0,2$, k úpravě hodnoty pH na výslednou hodnotu v rozmezí $6,5 \pm 0,2$ je doporučeno použít 0,1 NaOH nebo 1 M HCl, v této práci byl použit výhradně roztok NaOH). Po úpravě pH byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn Milli-Q[®] vodou na objem 1 litr. Roztok kultivačního média i zásobní roztoky k jeho přípravě byly uchovávány při 4 °C bez přístupu světla. Zásobní kultivar okřešku byl jedenkrát týdně přeočkováván do čerstvého kultivačního média.

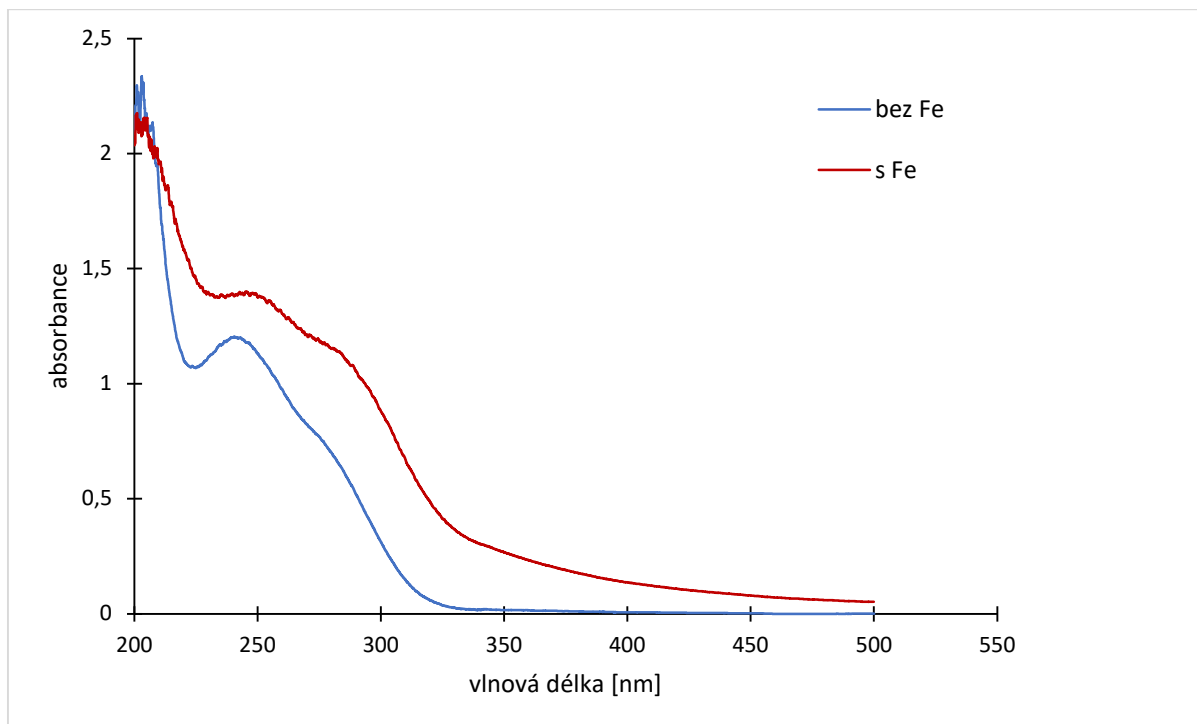
Pro vlastní test bylo do krystalizační misky o průměru 9,5 cm přeneseno pinzetou cca 12 lístků okřešku do 120 ml média. Inkubace v několika paralelních stanoveních (minimálně ve třech, ale při opakování stanovení s velkým rozptylem hodnot pak ve čtyřech nebo v pěti). Okřehek byl kultivován při pokojové teplotě (22 – 25 °C), v podmračených dnech byl v denních hodinách přisvětlován LED osvětlením (LED CRI-300-W, barva bílá 6000 – 6500 K), jehož spektrální charakteristika je znázorněna na Obr. 5; intenzita přisvětlení se pohybovala v rozmezí 2800 – 3500 lx (měřeno luxmetrem Elvos LM 1010). V posledním pokusu testu toxicity fotoproduktů byl ponechán bez přisvětlování. Pro vyhodnocení dopadu atorvastatinu a produktů jeho fotochemické degradace na celkový počet potomků a velikosti těla okřešků byl použit vyhodnocovací program Easy leaf area software jednak v mobilní aplikaci jednak v aplikaci pro PC.



Obr. 5: Emisní spektrum LED CRI-300-W (Aliexpress, 2020).

3 Výsledky

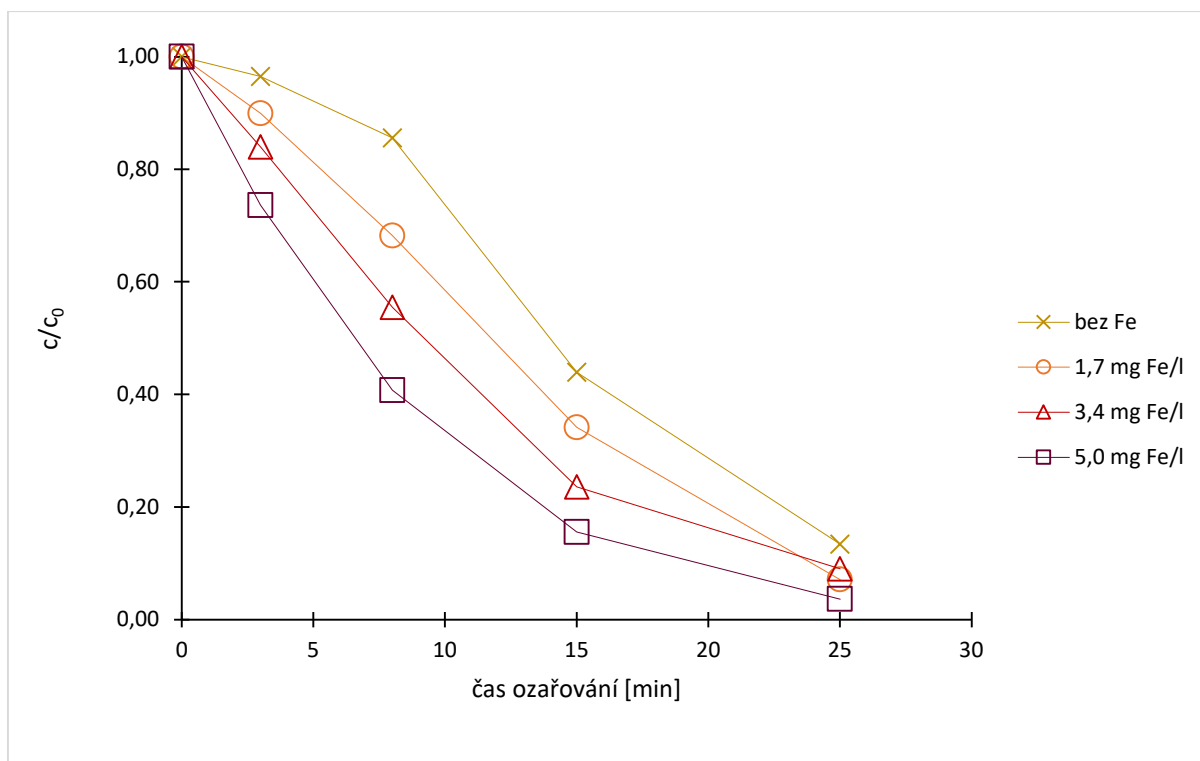
Obrázek 6 ukazuje absorpční spektrum atorvastatinu a směsi atorvastatinu s přidanými železitými ionty.



Obr. 6: Absorpční spektra roztoku atorvastatinu o koncentraci 36 mg/l a téhož roztoku atorvastatinu s přidavkem železitých iontů o koncentraci 5,0 mg/l.

Z Obr. 6 je patrné, že i samotný atorvastatin vykazuje určitou absorpci v oblasti vlnových délek nad 300 nm (do cca 325 nm). Absorpce se výrazně zvyšuje přidavkem železitých iontů v koncentraci 5 mg/l a absorpční spektrum se rozšiřuje daleko do viditelné oblasti.

Průběh fotochemické degradace atorvastatinu ukazuje Obr. 7. Na obrázku je znázorněn jednak časový průběh odbourávání samotného atorvastatinu bez přídavku železitých iontů, jednak se třemi různými koncentracemi přidaného Fe^{3+} .



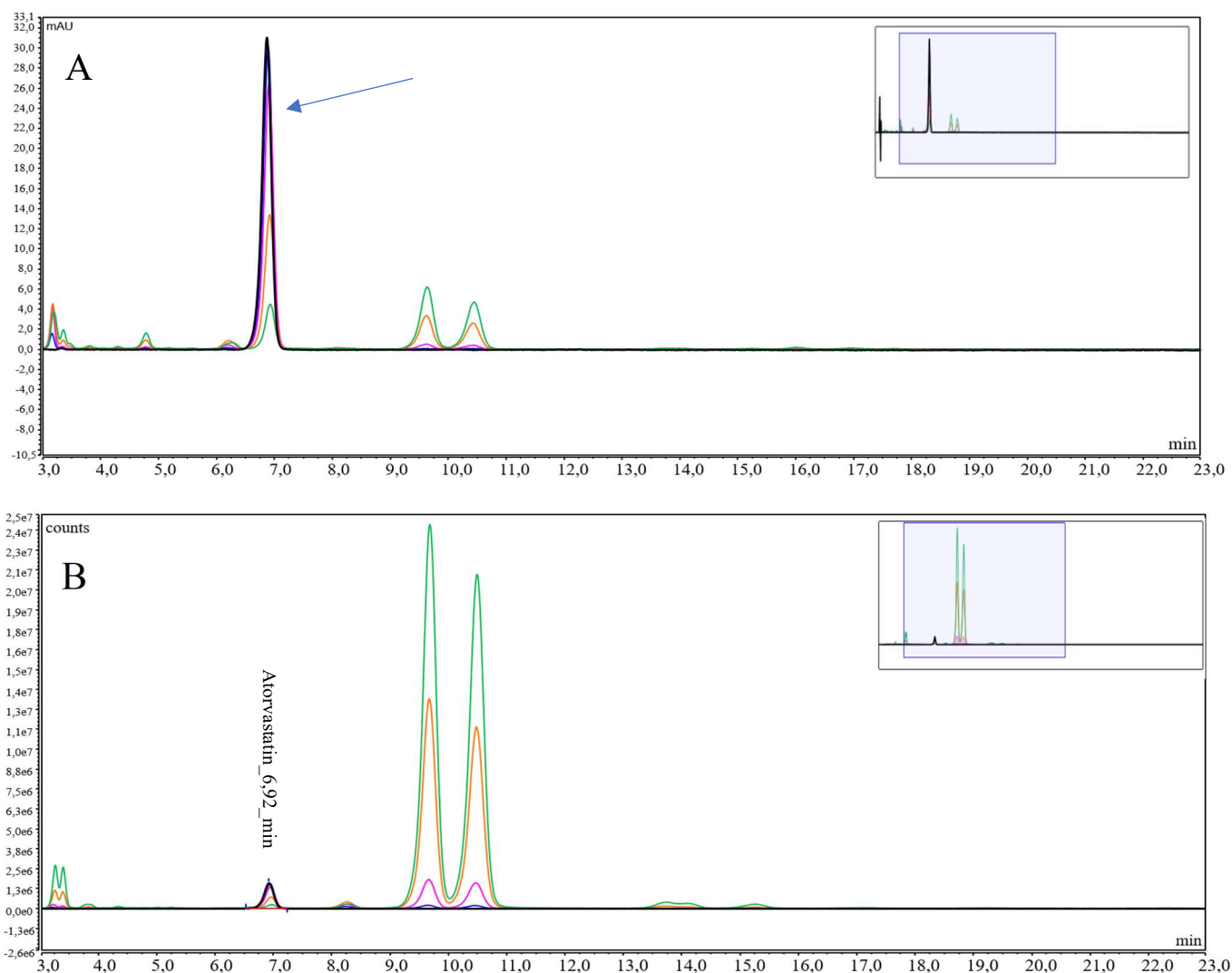
Obr. 7: Závislost degradace atorvastatinu na koncentraci přidaných železitých iontů.

Z obrázku je vidět, že u atorvastatinu docházelo k fotochemickému odbourávání i v roztoku, kde byl přítomen samotný atorvastatin bez přídavku železitých iontů, ale odbourávání bylo zpočátku (v prvních 10 minutách) pomalé, při dalším ozařování se výrazně zrychlilo, takže po 25 minutách ozařování bylo v reakční směsi 13 % původního množství atorvastatinu.

Se zvyšujícím se množstvím přidávaných železitých iontů se reakce v počátečním stadiu zrychlovala, u nejvyšší použité koncentrace 5 mg Fe/l bylo možné modelovat reakční průběh exponenciální křivkou, reakce tedy v tomto případě probíhala podle kinetiky 1. řádu s rychlostní konstantou $0,130 \text{ min}^{-1}$. Po 25 minutách ozařování zbyla v reakční směsi jen 4 % z původního množství atorvastatinu.

Chromatogramy reakčních směsí bez přídavku železitých iontů a s přídavkem Fe^{3+} v koncentraci 5 mg/l v jednotlivých ozařovacích časech 0–25 minut pořízené UV a fluorescenčním detektorem jsou uvedeny na Obr. 8 a 9. Zvětšené chromatogramy se zvýrazněnými retenčními časy jsou v Přílohách 1–4.

Obr. 8 ukazuje HPLC diagramy vzorků atorvastatinu bez přídavku Fe^{3+} .



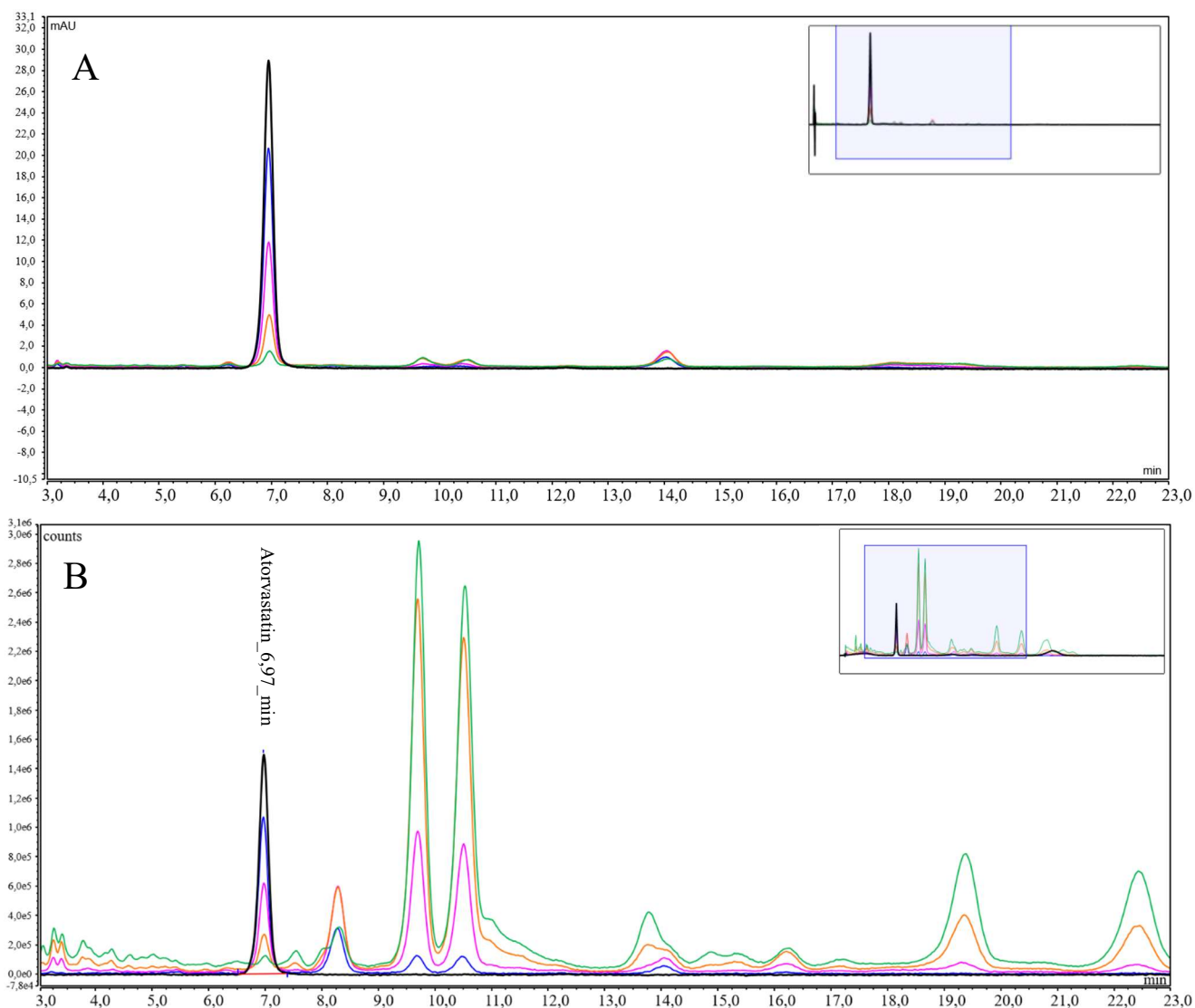
Obr. 8: HPLC diagramy atorvastatinu bez Fe^{3+} v časovém rozmezí ozařování 0 – 25 minut:

A – chromatogram z UV detektoru; B – chromatogram z fluorescenčního detektoru.

0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 8 min – růžová křivka, 15 min – oranžová křivka, 25 min – zelená křivka.

Na Obr. 8 v části A je šipkou označený pík představující atorvastatin, který se objevuje při retenčním čase 6,89 minut. Chromatogram se zvýrazněnými retenčními časy pro UV detektor se nachází v Příloze 1 a pro fluorescenční detektor v Příloze 2. Kromě atorvastatinu jsou na obrázku patrné dva produkty fotochemické degradace v retenčních časech 9,64 a 10,45 minut. Tyto produkty nevykazují výraznou absorpci v UV oblasti, ale významně fluoreskují (část B). S použitím fluorescenčního detektoru byly detekovatelné další minoritní produkty v retenčních časech 13,75 – 15,25 minut.

HPLC diagramy na Obr. 9 zobrazují reakční směsi atorvastatinu s přidavkem Fe^{3+} v koncentraci 5,0 mg/l.



Obr. 9: HPLC diagramy atorvastatinu s 5,0 mg Fe^{3+} /l v časovém rozmezí ozařování 0 – 25 minut: A – chromatogram z UV detektoru; B – chromatogram z fluorescenčního detektoru. 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 8 min – růžová křivka, 15 min – oranžová křivka, 25 min – zelená křivka.

V Obr. 9 jsou v části A (chromatogram s UV detekcí) vidět zřetelně čtyři nové produkty, fluorescenční detektor ale odhalil, že v přítomnosti Fe^{3+} vzniká celá řada nových produktů. Chromatogram se zvýrazněnými retenčními časy pro UV detektor se nachází v Příloze 3 a pro fluorescenční detektor v Příloze 4.

Chromatogramy se dvěma koncentracemi nižšími než nejvyšší použitá koncentrace železitých iontů 5 mg/l (1,7 mg/l a 3,4 mg/l) ukazují postupnou změnu v tvorbě produktů se zvyšující se koncentrací Fe^{3+} . V roztoku atorvastatinu s koncentrací železitých iontů 1,7 mg/l byla patrná tvorba jednoho nepatrného píku s retenčním časem 13,96, jinak nebyl zaznamenán rozdíl oproti reakční směsi při ozařování atorvastatinu bez přídavku Fe^{3+} . V chromatogramu s fluorescenční detekcí byla zřetelně vidět tvorba dalších píků s retenčním časem 13,75 – 22,4 minut. Z chromatogramů s koncentrací železitých iontů 3,4 mg/l z fluorescenčního detektoru byl patrný zvýšený počet fotoproduktů oproti UV detekci. Konkrétně v chromatogramu s UV detekcí se nachází pouze 3 fotoprodukty a s fluorescenční detekcí je jich celkem 8. Koncentrace fotoproduktů roste se zvyšujícím se ozařovacím časem, ale koncentrace fotoproduktu v retenčním čase 8,28 minut začíná od času ozáření – 15 minut klesat, produkt začíná degradovat.

V reakční směsi atorvastatinu + 5mg/l Fe^{3+} byl proveden test fotoredukce železitých iontů. Výsledek odhalil, že z celkového přidaného množství Fe^{3+} je po 1 minutě zredukováno cca 6 % přidaných iontů, ale toto množství se již s delším ozařováním nemění.

U roztoku atorvastatinu a roztoku reakční směsi po 25minutovém ozáření byla testována stabilita po dobu 7 dnů. U obou vzorků byla pozorována změna koncentrace do 5 %.

Pro test toxicity atorvastatinu na okřehku (*Lemna minor*) byly použity koncentrace 0, 25, 50, 100 a 200 $\mu\text{g/l}$. Bylo vyhodnocováno procento přírůstku plochy listů za 7 dní trvání testu. Výsledky jsou shrnuty v Tab. III.

Tab. III: Koncentrace neozářeného atorvastatinu a procentuální přírůstek plochy listů okřehku.

koncentrace atorvastatinu [$\mu\text{g/l}$]	0	25	50	100	200
přírůstky plochy listů [%]	86	151	152	150	155
	151	91	105	129	97
	133	87	111	82	100

Z Tab. III je vidět, že hodnoty v jednotlivých paralelních stanoveních výrazně kolísají, ale není patrný toxický efekt atorvastatinu se zvyšující se koncentrací.

Pro test toxicity směsi produktů fotochemické degradace atorvastatinu byl atorvastatin s přísávkem Fe^{3+} 5 mg/l ozařován po dobu 15 minut (po této době ozařování jsou již v reakční směsi přítomny všechny fotoprodukty). Testovány byly pouze vzorky kontroly a směs fotoproduktů odpovídající nejvyšší testované koncentraci samotného atorvastatinu. Protože zbytková koncentrace atorvastatinu ve směsi fotoproduktů po 15 minutách ozařování činila 15 % původní koncentrace, byl k okřehku přidán takový objem reakční směsi, aby v něm koncentrace atorvastatinu byla stejná jako v případě testu samotného atorvastatinu s koncentrací 200 $\mu\text{g/l}$, tj. 3040 μl . Pokus byl proveden nejprve ve třech paralelních opakováních, ale rozptyl přírůstků plochy listů byl příliš velký pro jakékoli vyhodnocení (u kontroly činily přírůstky plochy listů 122, 128 a 291 %, u fotoproduktů 120, 144 a 225 %). Pokus byl proto zopakován se čtyřmi paralelními stanoveními. Tentokrát přírůstky u fotoproduktů byly stabilnější u třech stanovení (83, 94 a 98 %), jedno stanovení se vymykalo (58 %), ovšem u kontroly byly získány dva páry naprosto odlišných hodnot (117 a 128 % a 300 a 300 %). Nicméně je vidět, že přírůstek plochy listů ve vzorcích se směsí produktů byl ve všech případech nižší než nejnižší hodnota nalezená u kontroly. Pokus byl tedy kvůli rozptylu hodnot kontrolních stanovení zopakován ještě jednou v pěti paralelních stanoveních, tentokrát bez přisvětlování. Výsledky tohoto pokusu jsou shrnuty v Tab. IV.

Tab. IV: Test toxicity produktů fotodegradace atorvastatinu (15 min) a procentuální přírůstek plochy listů v sedmidenním testu.

vzorek	přírůstek plochy listů [%]	vzorek	přírůstek plochy listů [%]
kontrola 1	61	fotoprodukty 1	14
kontrola 2	51	fotoprodukty 2	-8
kontrola 3	36	fotoprodukty 3	-7
kontrola 4	28	fotoprodukty 4	12
kontrola 5	56	fotoprodukty 5	-8

V Tab. IV jsou hodnoty přírůstku u kontroly i fotoproduktů výrazně nižší než v předchozím případě kvůli absenci přisvětlování, ale je jednoznačně vidět výrazně nižší přírůstky v prostředí se směsí fotoproduktů.

4 Diskuze

Wang et al. (2018) ve své práci uvádějí, že fotodegradace samotného atorvastatinu probíhala dle kinetiky prvního řádu s rychlostní konstantou $0,0369 \text{ hod}^{-1}$ (reakce prováděna ve fosfátovém pufru). Reakci v našem uspořádání u samotného atorvastatinu není možné modelovat kinetikou prvního řádu, neboť reakce probíhala v počátečních stádiích (prvních 10 minut) pomaleji než v následujících 15 minutách. Podobná lag fáze na počátku reakce byla pozorována při fotochemické degradaci verapamilu (Klementová et al., 2017), tam ale nebyl prvních 20 minut pozorován prakticky žádný úbytek a celkově pak za 50 minut ozařování bylo odbouráno cca 45 % verapamilu. Rychlost reakce atorvastatinu (úbytek cca 87 % v 25 minutách ozařování) byla proto dosti překvapivá, zejména když uvážíme slabou absorpci atorvastatinu v oblasti vlnových délek nad 300 nm. Protože reakce probíhala v Milli-Q[®] vodě, nelze považovat za pravděpodobné, že by docházelo ke katalýze stopovým množstvím iontů kovů. Vysvětlením může být buď přítomnost katalyzujících nečistot ve standardu nebo fotochemická tvorba produktu, který pak působí jako sensitizátor degradace atorvastatinu, tzv. self-sensitization (Calzaferri & Spahni, 1986). Self-sensitizaci atorvastatinu naznačují ve své práci v souvislosti s produkty fotodegradace atorvastatinu ve fosfátovém pufru i Wang et al. (2018) s tím, že excitovaný tripletový stav atorvastatinu může působit jako sensitizátor tvorby singletového kyslíku z kyslíku rozpuštěného v roztoku.

Wang et al. zkoumal též vliv různých látek na fotochemické odbourávání atorvastatinu, a to huminových látek, některých aniontů jako dusičnanů, síranů, hydrogenuhličitanů, a vliv iontů Fe^{3+} . Přídavek Fe^{3+} iontů v koncentraci přibližně stejné, jako byla nejnižší koncentrace použita v této práci, vedl k rychlostní konstantě $0,2864 \text{ hod}^{-1}$, konstanta byla získaná opět z modelu kinetiky 1. řádu. Ve zde předkládané práci byly použity nízké koncentrace přidaných železitých iontů, což znemožnilo použít kinetiku 1. řádu k získání rychlostní konstanty, protože degradace za těchto podmínek má zpočátku pomalejší průběh, než by odpovídalo exponenciálnímu průběhu. Teprve u koncentrace Fe^{3+} iontů 3,4 mg/l lze body proložit exponenciálou, ovšem až od třetí minuty ozařování – rychlostní konstanta by pro tento případ činila $0,103 \text{ min}^{-1}$, což odpovídá poločasu reakce 6,73 min. Pro koncentraci Fe^{3+} iontů 5 mg/l odpovídá průběh kinetice 1. řádu, rychlostní konstantě $0,130 \text{ min}^{-1}$ a tedy poločasu reakce 5,33 min. Hodnoty rychlostních konstant (a poločasů) získané v této práci jsou řádově odlišné od hodnoty získané Wangem et al. (2018).

Rozdíl by mohl být částečně způsoben odlišnou intenzitou použitého záření, ale tady přímé porovnání není možné, protože Wang et al. udávají intenzitu světla při jedné vlnové délce (365 nm), v našem případě byl měřen celkový zářivý tok v oblasti citlivosti měřicího přístroje.

V reakčním systému byla pozorována fotochemická redukce Fe^{3+} iontů na Fe^{2+} ionty (pomocí komplexace s 1,10-fenantrolinem), ustálený stav redukované formy se ustavil velmi rychle – v průběhu první minuty ozařování, ale dosahoval relativně nízkých hodnot (cca 6 % celkového přidaného Fe) ve srovnání např. s hodnotami dosaženými při fotochemické degradaci hydrokortizonu, β -estradiolu, parabenů (Klementová et al., 2017) a verapamilu (Klementová et al., 2020), kde hodnoty redukované formy železa dosahovaly 60–70 % celkového přidaného množství. Z rychlosti vytvoření ustáleného stavu, z množství redukované formy železa v ustáleném stavu a z průběhů degradace při nižších koncentracích železa, není tedy možné předpokládat, že by fotoinicovaná reakce atorvastatinu probíhala fotokatalytickým mechanismem, kdy ozařování způsobí za přítomnosti organického substrátu, který je donorem elektronu, redukci iontů kovů, přičemž redukována forma je pak aktivní katalytickou formou (Klementová & Wagnerová, 1994). Spíše se bude jednat o přímou fotodegradaci v důsledku významného zvýšení absorpce komplexu atorvastatinu s Fe(III) .

Wang et al. (2018) navrhli schéma degradace atorvastatinu založené na procesu extrakce na pevné fázi a následné analýze ionexovou chromatografií a kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Ve své práci uvádějí podrobné schéma pro degradaci v přítomnosti všech komponent, které studovali (humínové látky, dusičnany, sírany, hydrogenuhličitan, železité ionty), v němž jsou patrné dvě základní cesty: Jedna spočívá v hydroxylaci na nefluorovaném fenylovém kruhu vázaném na pyrol, druhá v odštěpení dihydroxyheptanové kyseliny a následném rozštěpení pyrolového kruhu a jeho oxidací na diketon plus hydroxylací jako u první cesty. Cesta 1 pak vede dál k tvorbě laktonu z dihydroxyheptanového řetězce. Z celkového množství 9 navržených struktur jich v reakční směsi atorvastatinu ozařovaném ve fosfátovém pufru našli 7, ovšem výtěžky ve srovnání s reakční směsí s přidanými humínovými látkami a testovanými ionty byly významně nižší.

Z údajů prezentovaných v této práci není možné rozhodnout, zda vznikající produkty pozorované při HPLC analýze reakční směsi, mohou odpovídat některým z popsáných produktů Wanga et al., nicméně vzhledem k rozdílným kinetickým průběhům by bylo žádoucí v práci pokračovat a vznikající produkty porovnat.

Pokud jde o toxicitu atorvastatinu vůči okřehku, nebyl v této práci prokázán toxický vliv v rozmezí až do koncentrace atorvastatinu 200 µg/l, přestože Brain et al. (2006) fytotoxický efekt u *Lemna gibba* pozorovali, a to s hodnotou EC₁₀ rovnou 26 µg/l. Je ovšem možné, že jednotlivé variety *Lemna* sp. jsou různě citlivé k toxickým účinkům statinů.

U testu toxicity fotoproduktů se i přes velmi kolísavé hodnoty paralelních stanovení podařilo prokázat, že směs fotoproduktů má negativní vliv na růst okřehku. Z výsledků získaných v této práci není možné činit závěry ohledně skutečnosti, zda je za tento negativní efekt zodpovědný jeden určitý produkt, či zda se jedná o kumulativní vliv více látek, vznikajících fotochemickou degradací atorvastatinu.

Pro kolísání hodnot mezi paralelními stanoveními není vysvětlení – testy byly prováděny přesně podle návodu OECD, kultivace byla prováděna tak, aby všechny vzorky měly stejné světelné podmínky (ať už s přisvětlováním ve formě plošného panelu osazeného LED pásky nebo bez tohoto přisvětlování). V literatuře se nepodařilo najít vysvětlení ve vztahu k použité metodě vyhodnocování. Ahmad et al. (2015), kteří porovnávali manuální určování plochy s metodami digitálního zobrazování Easy Leaf Area and Image J, uvádějí, že našli rozdíl mezi digitálními technikami na jedné straně a manuálním odečítáním na straně druhé, neuvádějí ale ve své práci nic o rozdílech mezi paralelními stanoveními jednotlivými digitálními metodami. Autoři testu Easy Leaf Area (Easlon & Bloom, 2014) nenabízejí žádný klíč k vysvětlení takové variability.

5 Závěr

Navzdory slabé absorpci záření v oblasti nad 300 nm atorvastatin podléhá významné degradaci i bez přítomnosti přidaných iontů kovů. Za reaktivitu je patrně zodpovědná tzv. self – senzitivizace vznikajícím produktem.

Přídavek iontů kovů mění charakter závislosti, průběh odbourávání samotného atorvastatinu a atorvastatinu s nízkými přídávky Fe^{3+} nelze popsat kinetikou 1. řádu, při koncentraci Fe^{3+} 5 mg/l probíhá degradace podle kinetiky 1. řádu s rychlostní konstantou $0,130 \text{ min}^{-1}$.

Při degradaci jsou na HPLC diagramu patrné dva hlavní produkty, se zvyšující se koncentrací přidaných Fe^{3+} iontů se zvyšuje množství detekovatelných produktů.

Rozsah fotoredukce železitých iontů na železnaté naznačuje, že fotochemická degradace atorvastatinu neprobíhá fotokatalytickým mechanismem.

Test toxicity s použitím *Lemna minor* neprokázal toxický efekt atorvastatinu na růst této vodní rostliny ani v koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$. Byl prokázán negativní účinek směsi fotoproduktů na růst plochy listů.

6 Seznam použité literatury

- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., & Springer, J. (1980): Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol – lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77** (7), 3957-3961.
<https://doi.org/10.1073/pnas.77.7.3957> (staženo 23. 10. 2020).
- Aliexpress, LED strips. (2020): <https://www.aliexpress.com/i/4000063832513.html> (staženo 6. 10. 2020).
- Ahmad S., Ali H., ur Rehman, A., Khan, R. J. Z., Ahmad, W., Fatima, Z., Abbas, G., Irfan, M., Ali, H., Khan, M. A., & Hasanuzzaman, M. (2015): Measuring Leaf Area of Winter Cereals by Different Techniques: A Comparison. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, **13** (2), 117-125.
https://www.researchgate.net/publication/282249709_Measuring_Leaf_Area_of_Winter_Cereals_by_Different_Techniques_A_Comparison (staženo 26. 10. 2020).
- Balaz, M., & Wolfrum, C. (2019): Statins: benefits and risks revisited. *Aging (Albany NY)*, **11** (13), 4300–4302. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131517.20177.5a> (staženo 12. 10. 2019).
- Boleda, M. R., Galceran, M. T., & Ventura, F. (2011): Behavior of pharmaceuticals and drugs of abuse in a drinking water treatment plant (DWTP) using combined conventional and ultrafiltration and reverse osmosis (UF/RO) treatments. *Environmental Pollution*, **159** (6), 1584-1591.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.051> (staženo 27. 10. 2019).
- Bloch, K. (1965): The Biological Synthesis of Cholesterol. *Science*, **150** (3692), 19-28.
- Brain, R. A., Reitsma, S. T., Lissemore, L. I., Bestari, K. J., Sibley, P. K., & Solomon, K. R. (2006): Herbicidal Effects of Statin Pharmaceuticals in *Lemna gibba*. *Environmental Science & Technology*, **40**, 16, 5116-5123.
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0600274> (staženo 17. 8. 2020).

- Bucher, N. L. R., Overath, P., & Lynen, F. (1960): β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme a reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, **40**, 491-501.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91390-1](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)91390-1) (staženo 12. 10. 2019).
- Calzaferri, G., & Spahni, W. (1986): Self-sensitization of photo-chlorine evolution in aqueous dispersions of silver zeolites. *Journal of Photochemistry*, **32** (2), 151-155.
[https://doi.org/10.1016/0047-2670\(86\)87004-6](https://doi.org/10.1016/0047-2670(86)87004-6) (staženo 20. 10. 2020).
- Chander, V., Sharma, B., Negi, V., Aswal, R. S., Singh, P., Singh, R., & Dobhal, R. (2016): Pharmaceutical compounds in drinking water. *Journal of Xenobiotics*, **6**, 5774, 1-7.
<https://www.pagepressjournals.org/index.php/xeno/article/view/5774/5114>
(staženo 12. 10. 2019).
- Conley, J. M., Symes, S. J., Kindelberger, S. A., & Richards, S. M. (2008): Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. *Journal of Chromatography A*, **1185**, 206-215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.064> (staženo 27. 10. 2019).
- Corey, E. J., Czako, B., & Kürti, L. (2008): Antidiabetic and Cholesterol-Lowering Agents. V „Molecules and Medicine.“ Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008, str. 60-65. ISBN 978-0-470-26096-8.
- Češka, R., Freiburger, T., Vaclová, M., Bláha, V., & Urbanová, Z. (2015): Hypolipidemika. V „Familiární hypercholesterolemie.“ TRITON., Praha, 2015, str. 53-120. ISBN 978-80-7387-843-6.
- Dietrich, D. R., Webb, S. F., & Petry, T. (2002): Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. *Toxicology Letters*, **131** (1-2), 1-3.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00062-0) (staženo 27. 10. 2019).
- Dietschy, J. M., & Wilson, J. D. (1968): Cholesterol synthesis in the squirrel monkey: relative rates of synthesis in various tissues and mechanisms of control. *The Journal of Clinical Investigation*, **47** (1), 166-174.
<https://doi.org/10.1172/JCI105706> (staženo 23. 11. 2019).
- DrugBank. (2020): Detailed Drug and Drug Target Information.
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00227> (staženo 23. 10. 2020).

- Easlon H. M., & Bloom A. J. (2014): Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Applications in Plant Sciences*, **2** (7), 1400033.
<https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.3732/apps.1400033>
(staženo 26. 10. 2020).
- Ellesat, K. S., Tollefsen, K. E., Asberg, A., Thomas, K. V., & Hylland, K. (2010): Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, **24** (6), 1610-1618.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.006> (staženo 31. 8. 2020).
- Endo, A. (1992): The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *The Journal of Lipid Research*, **33** (11), 1569-1582.
<https://www.jlr.org/content/33/11/1569.long> (staženo 12. 7. 2019).
- Endo, A. (2017): Discovery and development of statins. *Natural Product Communications*, **12** (8), 1153-1156.
<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1701200801>
(staženo 20. 10. 2020).
- Estey, C., Chen, X., & Moon, T. W. (2008): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rainbow trout: Effects of fasting and statin drugs on activities and mRNA transcripts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **147** (3), 386-398.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.008> (staženo 17. 8. 2020).
- Falfushynska, H., Sokolov, E. P., Haider, F., Oppermann, C., Kragl, U., Ruth, W., Stock, M., Glufke, S., Winkel, E. J., & Sokolova, I. M. (2019): Effects of a common pharmaceutical, atorvastatin, on energy metabolism and detoxification mechanisms of a marine bivalve *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, **208**, 47-61.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.022> (20. 10. 2020).
- Gofman, J. W., Lindgren, F., Elliott, H., Mantz, W., Hewitt, J., Strisower, B., Herring V., & Lyon, T.P. (1950): The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Science*, **111** (2877), 166-186.
- Gofman, J. W. (1956): Serum lipoproteins and the evaluation of atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Science*, **64** (4), 590-595.

- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2003): Cholesterol: A Century of Research. *HHMI* (= *Howard Hughes Medical Institute*) *Bulletin*, **16** (3), 10-19.
http://www4.utsouthwestern.edu/moleculargenetics/pdf/msb_cur_res/2003%20HHMI%20Bulletin%20Goldstein%2018.htm (staženo 23. 11. 2019).
- Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Serrano, R., & Hernández, F. (2012): Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, **87** (5), 453-462.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025> (staženo 27. 10. 2019).
- Hájková, M., Kratochvíl, B., & Rádl, S. (2008): Atorvastatin – nejprodávanější lék na světě. *Chemické listy*, **102**, 3-14.
- Henriksbo, B. D., Lau, T. C., Cavallari, J. F., Denou, E., Chi, W., Lally, J. S., Crane, J. D., Duggan, B. M., Foley, K. P., Fullerton, M. D., Tarnopolsky, M. A., Steinberg, G. R., & Schertzer, J. D. (2014): Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance. *Diabetes*, **63** (11), 3742-3747.
<https://doi.org/10.2337/db13-1398> (staženo 8. 9. 2020).
- ChEBI – Chemical Entities of Biological Interest database.
<https://www.ebi.ac.uk/chebi/> (staženo 30. 4. 2020).
- Cholesterol: Synthesis, Metabolism, and Regulation – The Medical Biochemistry Page.
<https://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol-synthesis-metabolism-and-regulation/> (staženo 25. 8. 2020).
- Katsigiannis, A., Noutsopoulos, C., Mantziaras, J., & Gioldasi, M. (2015): Removal of emerging pollutants through Granular Activated Carbon. *Chemical Engineering Journal*, **280**, 49-57.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.109> (staženo 23. 11. 2019).
- Keys, A., Anderson, J. T., Fidanza, F., Keys, M. H., & Swahn, B. (1955): Effects of Diet on Blood Lipids In Man: Particularly Cholesterol and Lipoproteins. *Clinical Chemistry*, **1** (1), 34-52. <https://doi.org/10.1093/clinchem/1.1.34> (staženo 23. 11. 2019).

- Keys, A., Aravanis, C., Blackburn, H. W., Van Buchem, F. S. P., Buzina, R., Djordjević, B. S., Dontas, A. S., Fidanza, F., Karvonen, M. J., Kimura, N., Lekos, D., Monti, M., Puddu, V., & Taylor, H. L. (1966): Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Medica Scandinavica Supplementum*, **460**, 1-392.
<https://edepot.wur.nl/385221> (staženo 23. 11. 2019).
- Khachadurian, A. K. (1964): The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *The American Journal of Medicine*, **37** (3), 402-407.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(64\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(64)90196-2) (staženo 23. 11. 2019).
- Kirby, T. J. (1967): Cataracts produced by triparanol. (MER-29). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, **65**, 494-543.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1310282/> (staženo 30. 10. 2020).
- Klementová, Š., & Wagnerová, D. M. (1994): Photocatalytic Effect of Fe(III) on Oxidation of Two-Carbon Organic Substances Related to Natural Waters. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **59** (6) 1066–1076.
- Klementova, S., Kahoun, D., Doubkova, L., Frejlichova, K., Dusakova, M., & Zlamal, M. (2017): Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **16** (1), 67-71. Abstract:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/PP/C6PP00164E#!divAbstract>
(staženo 17. 10. 2020).
- Klementová Š., Poncarová M., Kahoun D., Šorf M., Dokoupilová E., & Fojtíková P. (2020): Toxicity assessment of verapamil and its photodegradation products. *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 35650-35660.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-020-09830-w>
(staženo 20. 10. 2020).
- Lam, M. W., Young, C. J., Brain, R. A., Johnson, D. J., Hanson, M. A., Wilson, C. J., Richards, S. M., Solomon, K. R., & Mabury, S. A. (2004): Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Technology and Chemistry*, **23** (6), 1431-1440.
<https://doi.org/10.1897/03-421> (staženo 1. 11. 2019).

- Lam, M. W., & Mabury, S. A. (2005): Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences*, **67**, 177-188.
- Langford, K., & Thomas, K. V. (2011): Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring*, **13** (2), 416-421.
<https://doi.org/10.1039/c0em00342e> (staženo 26. 10. 2020).
- Lee, H. B., Peart, T. E., Svoboda, M. L., & Backus, S. (2009): Occurrence and fate of rosuvastatin, rosuvastatin lactone, and atorvastatin in Canadian sewage and surface water samples. *Chemosphere*, **77** (10), 1285-1291.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.068> (staženo 20. 10. 2020).
- Li, J. J. (2009): Cholesterol – The Janus Faced Molecule. V „Triumph of the Heart: The Story of Statins.“ Oxford University Press, New York, 2009, str. 4-11. ISBN-13: 978-0195323573.
- Li, J., Zhang, Y., Huang, Q., Shi, H., Yang, Y., Gao, S., Mao, L., & Yang X. (2017): Degradation of organic pollutants mediated by extracellular peroxidase in simulated sunlit humic waters: A case study with 17 β -estradiol. *Journal of Hazardous Materials*, **331**, 123-131.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.033> (staženo 1. 11. 2019).
- Liu, Y., Ding, R., Pan, B., Wang, L., Liu, S., & Nie, X. (2019): Simvastatin affect the expression of detoxification – related genes and enzymes in *Daphnia magna* and alter its life history parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **182**, 109389.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109389> (staženo 20. 10. 2020).
- Mabuchi, H., Sakai, T., Sakai, Y., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Koizumi, J., & Takeda, R. (1983): Reduction of Serum Cholesterol in Heterozygous Patients with Familial Hypercholesterolemia – Additive Effects of Compactin and Cholestyramine. *The New England Journal of Medicine*, **308** (11), 609-613.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198303173081101> (staženo 1. 11. 2020).
- Mclver, L. A., & Siddique, M. S. (2020): Atorvastatin. National Center for Biotechnology Information, StatPearls – NCBI Bookshelf [online].
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430779/> (staženo 25. 10. 2020).

Ministerstvo zemědělství. (2018): Zpráva o stavu vodního hospodářství České republiky v roce 2018.

http://eagri.cz/public/web/file/640731/Modra_zprava_2018_web.pdf

(staženo 10. 11. 2019).

Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., & Dudel, E. G. (2013): The *Lemna* Bioassay: Contemporary Issues as the Most Standardized Plant Bioassay for Aquatic Ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **44** (2), 154-197.

<https://doi.org/10.1080/10643389.2012.710451> (staženo 20. 10. 2020).

Montanaro, S., Lhiaubet-Vallet, V., Iesce, M. R., Previtera, L., & Miranda, M. A. (2009): A Mechanistic Study on the Phototoxicity of Atorvastatin: Singlet Oxygen Generation by a Phenanthrene-like Photoproduct. *Chemical Research in Toxicology*, **22** (1), 173-178. <https://doi.org/10.1021/tx800294z> (staženo 27. 10. 2019).

OECD. (2002): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Guideline 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test.

http://www.oecdilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhibition-test_9789264016194en;jsessionid=34s3quagr3op3.x-oecd-live-03

(staženo 7. 10. 2020).

Popják, G., Cornforth, J. W., Cornforth, R. H., Ryhage, R., & Goodman, D. S. (1962): Studies on the Biosynthesis of Cholesterol. XVI. Chemical synthesis of 1-H₂³-2C¹⁴- and 1-D₂-2-C¹⁴-trans-trans-farnesyl pyrophosphate and their utilization in squalene biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **237**, 56-61.

<https://www.jbc.org/content/237/1/56.long> (staženo 23. 11. 2019).

proLékaře. (2019): Kardiovaskulární rizika.

<https://www.prolekare.cz/tema/kardiovaskularni-rizika/detail/neni-statin-jako-statin-aneb-prakticky-prehled-rozdlu-jednotlivych-molekul-112435> (staženo 29. 4. 2020).

PubChem. (2019): Atorvastatin.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11635912> (staženo 1. 10. 2020).

PubChem. (2019): Cholestyramine.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/70695641> (staženo 11. 11. 2020).

- Razavi, B., Abdeimelek, S. B., Song, W., O'Shea, K. E., & Cooper, W. J. (2011): Photochemical fate of atorvastatin (lipitor) in simulated natural waters. *Water Research*, **45** (2), 625-631.
- Roth, B. D. (2002): 1 The Discovery and Development of Atorvastatin, A Potent Novel Hypolipidemic Agent. *Progress in Medicinal Chemistry*, **40**, 1-22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70080-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70080-8) (staženo 3. 3. 2020).
- Santos, M. M., Ruivo, R., Lopes-Marques, M., Torres, T., de los Santos, C. B., Castro, L. F. C., & Neuparth, T. (2016): Statins: An undesirable class of aquatic contaminants? *Aquatic Toxicology*, **174**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.001> (staženo 31. 8. 2020).
- Steinberg, D. (2006): Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: the discovery of the statins and the end of the controversy. *The Journal of Lipid Research*, **47**, 1339-1351.
- SÚKL. (2018): Vydané léčivé přípravky v ČR. <http://www.sukl.cz/informace-ziskane-z-hlaseni-lekaren-o-vydanych-lecivych30?source=rss> (staženo 10. 11. 2019).
- SÚKL. (2020): Souhrn údajů o přípravku. <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC154953.pdf&type=spc&as=atorvastatin-aurovitas-spc> (staženo 10. 11. 2019).
- Tete, V. S., Nyoni, H., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. (2020): Occurrence and spatial distribution of statins, fibrates and their metabolites in aquatic environments. *Arabian Journal of Chemistry*, **13** (2), 4358-4373. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.08.003> (staženo 23. 10. 2020).
- Thorpe, J. L., Doitsidou, M., Ho, S. Y., Raz, E., & Farber, S. A. (2004): Germ Cell Migration in Zebrafish is Dependent on HMGCoA Reductase Activity and Prenylation. *Developmental Cell*, **6** (2), 295-302. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00032-2) (staženo 31. 8. 2020).

- Vance, D. E., & Van den Bosch, H. (2000): Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1529** (1-3), 1-8.
[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00133-5) (staženo 23. 10. 2020).
- Varghese, M. J. (2014): Familial hypercholesterolemia: A review. *Annals of Pediatric Cardiology*, **7** (2), 107-117.
<https://doi.org/10.4103/0974-2069.132478> (staženo 17. 2. 2020).
- Vega, G. L., & Grundy, S. M. (1987): Treatment of Primary Moderate Hypercholesterolemia With Lovastatin (Mevinolin) and Colestipol. *JAMA (= Journal of American Medical Association) Network*, **257** (1), 33-38.
<https://doi.org/10.1001/jama.1987.03390010037024> (staženo 23. 10. 2020).
- Vítovec, J., Špinar, J., Špinarová, L. Elbl, L., Juhás, M., Kincl, V., Lábrová, R., Ludka, O., Michalcová, J., Novák, M., Nováková, Z., Olšovský, J., Panovský, R., Pařenica, J., Penka, M., Sikora, J., Soška, V., & Souček, M. (2017): Hypolipidemika. V „Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění“, Tiskárny Havlíčkův Brod, a.s., Havlíčkův Brod, 2017, str. 159-172. ISBN 978-80-247-4713-2.
- Wang, M., Li, J., Shi, H., Miao, D., Yang, Y., Qian, L., & Gao, S. (2018): Photolysis of atorvastatin in aquatic environment: Influencing factors, products, and pathways. *Chemosphere*, **212**, 467-475.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518315625>
(staženo 14. 10. 2019).
- Wilde, M. L., Menz, J., Trautwein, C., Leder, C., & Kümmerer, K. (2016): Environmental fate and effect assessment of thioridazine and its transformation products formed by photodegradation. *Environmental Pollution*, **213**, 658-670.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.018> (staženo 1. 11. 2019).
- Wu, X., Fu, Q., & Gan, J. (2016): Metabolism of pharmaceutical and personal care products by carrot cell cultures. *Environmental Pollution*, **211**, 141-147.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.050> (staženo 27. 10. 2019).
- Xia, X., Li, G., Yang, Z., Chen, Y., & Huang, G. H. (2009): Effects of fulvic acid concentration and origin on photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution: Importance of active oxygen. *Environmental Pollution*, **157** (4), 1352-1359.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.039> (staženo 1. 11. 2019).

Yamamoto, A., Sudo, H., & Endo, A. (1980): Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **35** (3), 259-266.

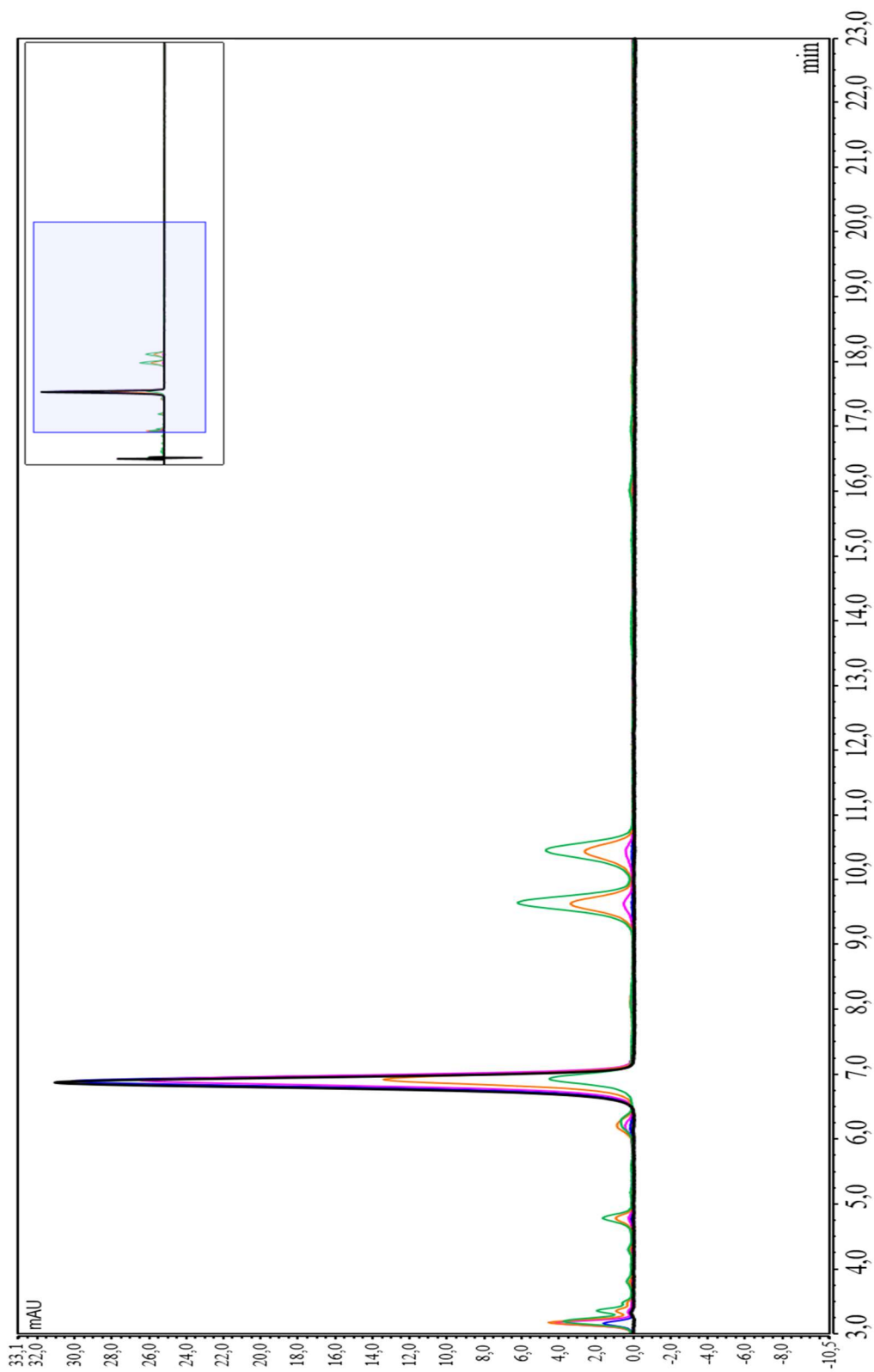
[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(80\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0021-9150(80)90124-0) (staženo 1. 11 .2019).

Zdravotnictví a medicína (ZAM). (2020): APO-ATORVASTATIN příbalový leták.

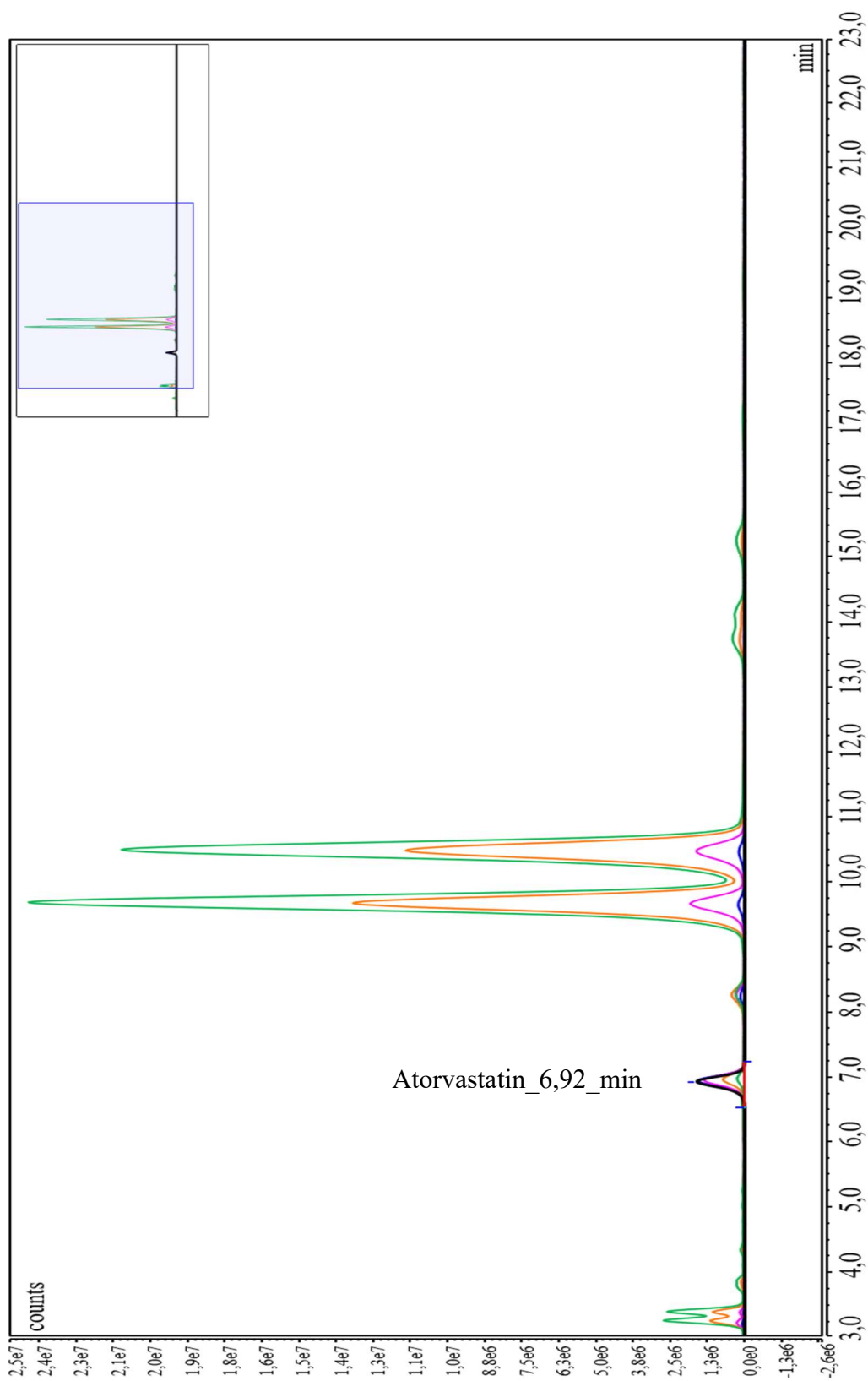
<https://zdravi.euro.cz/leky/apo-atorvastatin-pribalovy-letak/> (staženo 1. 9. 2020).

7 Přílohy

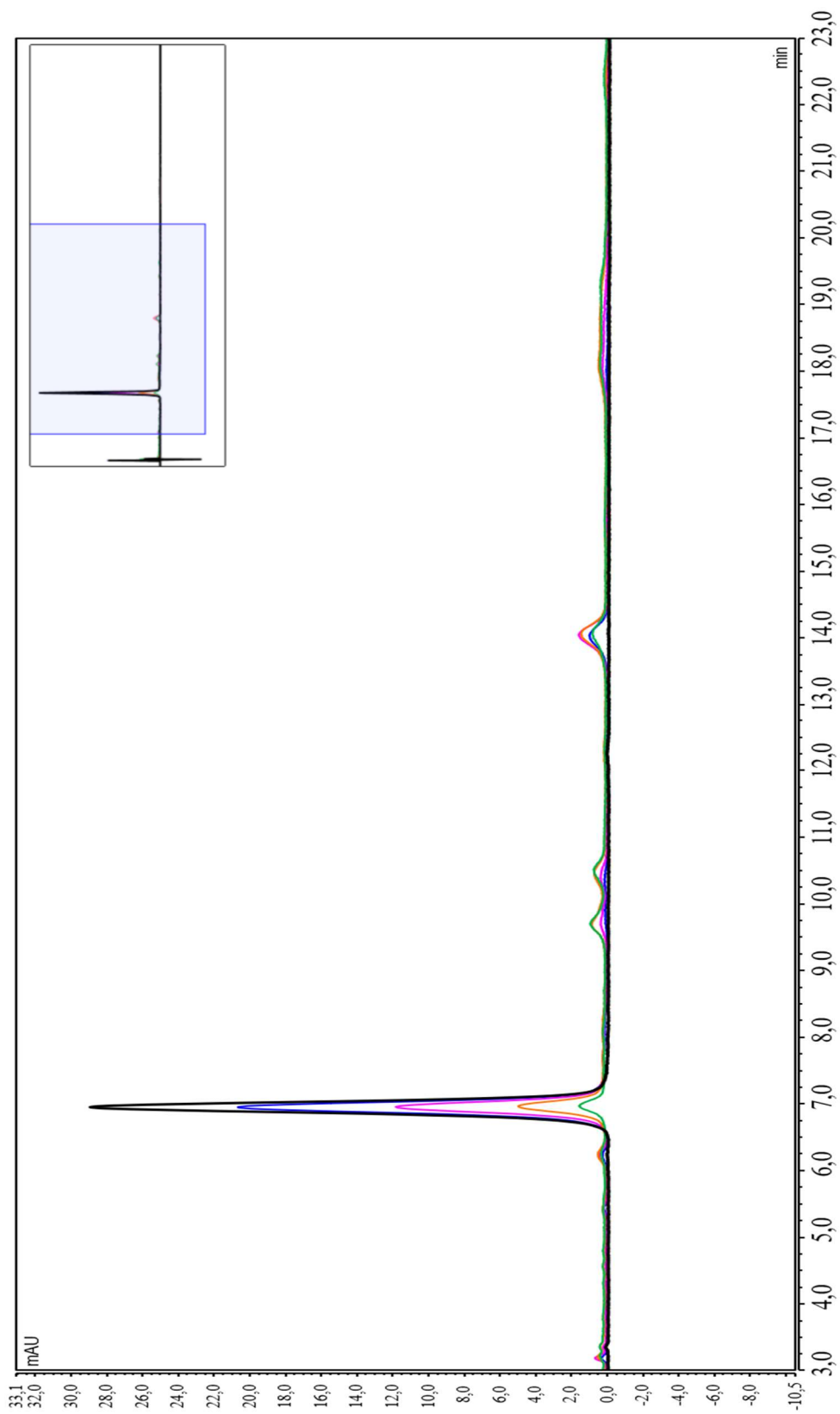
Příloha 1: Chromatogram vzorku atorvastatinu bez Fe^{3+} – UV detektor. Časové rozmezí ozařování 0 – 25 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 8 min – růžová křivka, 15 min – oranžová křivka, 25 min – zelená křivka.



Příloha 2: Chromatogramy vzorků atorvastatinu bez Fe^{3+} – fluorescenční detektor. Časové rozmezí ozařování 0 – 25 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 8 min – růžová křivka, 15 min – oranžová křivka, 25 min – zelená křivka.



Příloha 3: Chromatogram vzorku atorvastatinu s přidavkem Fe^{3+} v koncentraci 5 mg/l – UV detektor. Časové rozmezí ozařování 0 – 25 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 8 min – růžová křivka, 15 min – oranžová křivka, 25 min – zelená křivka.



Příloha 4: Chromatogram vzorku atorvastatinu s přídavkem Fe^{3+} v koncentraci 5 mg/l – fluorescenční detektor. Časové rozmezí ozařování 0 – 25 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 8 min – růžová křivka, 15 min – oranžová křivka, 25 min – zelená křivka.

