

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2022

Adéla Vonešová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fotochemická degradace hypolipidemika
atorvastatinu s využitím heterogenní fotokatalýzy**

Bakalářská práce

Adéla Vonešová

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2022

Cíl práce

Cílem práce bylo

- popsat princip heterogenní fotokatalýzy s využitím polovodičů,
- popsat možnosti využití heterogenní fotokatalýzy při odstraňování mikropolutantů z odpadních vod,
- proměřit kinetiku degradace atorvastatinu v přítomnosti heterogenního fotokatalyzátoru (TiO_2),
- pokusit se identifikovat hlavní produkt/produkty fotodegradace a porovnat je s údaji v literatuře,
- provést test toxicity produktů fotochemické degradace atorvastatinu s použitím TiO_2 jako fotokatalyzátoru.

Vonešová A., 2022: **Fotochemická degradace hypolipidemika atorvastatinu s využitím heterogenní fotokatalýzy.** [Photochemical degradation of the atorvastatin hypolipidemic using heterogeneous photocatalysis. Bachelor Thesis, in Czech.] – 25 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The Bachelor's thesis is focused on hypolipidemic drugs statins and their representative atorvastatin. In the theoretical part of the thesis, the function of statins is introduced, studies about statins toxicity for freshwater organisms are presented, fundamentals of heterogeneous photocatalysis are explained and examples of usage of the method for pollutants degradation are given. Experimental part presents kinetics of atorvastatin degradation on TiO₂ photocatalyst and a test of toxicity of atorvastatin photoproducts 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.

V Českých Budějovicích 11. 4. 2022

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala mé školitelce paní doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za cenné rady, věnovaný čas a ochotu zodpovědět veškeré mé dotazy ohledně bakalářské práce, ale i studia. Poskytla mi konzultace vždy, když jsem je potřebovala a byla se mnou velmi trpělivá.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Pavle Fojtíkové, PhD. za vřelou pomoc při obsluze HPLC analyzátoru, za provedení HPLC analýz a za podnětné rady, jak správně interpretovat výsledky.

Mé poděkování patří i Bc. Lindě Muškové, která mi opatřila okřehek pro test toxicity.

Na závěr bych ráda poděkovala svým nejbližším za podporu, kterou mi po celou dobu psaní bakalářské práce dávali.

Obsah

Úvod.....	1
Statiny.....	1
Atorvastatin	3
Statiny ve vodním prostředí.....	4
Heterogenní fotokatalýza.....	6
Materiál a metody.....	10
Výsledky.....	14
Diskuze.....	18
Závěr.....	19
Seznam použité literatury	20

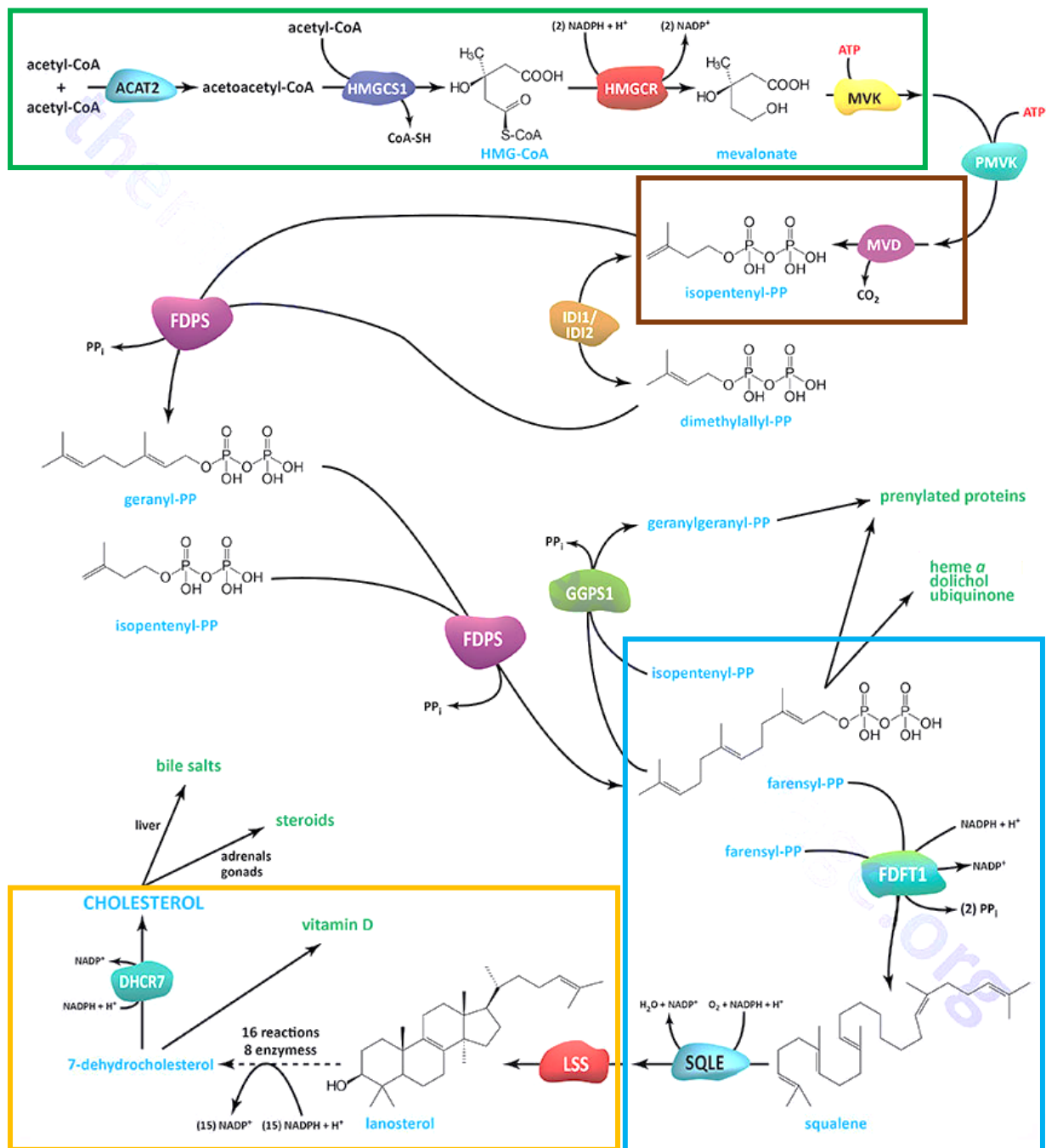
Úvod

Statiny

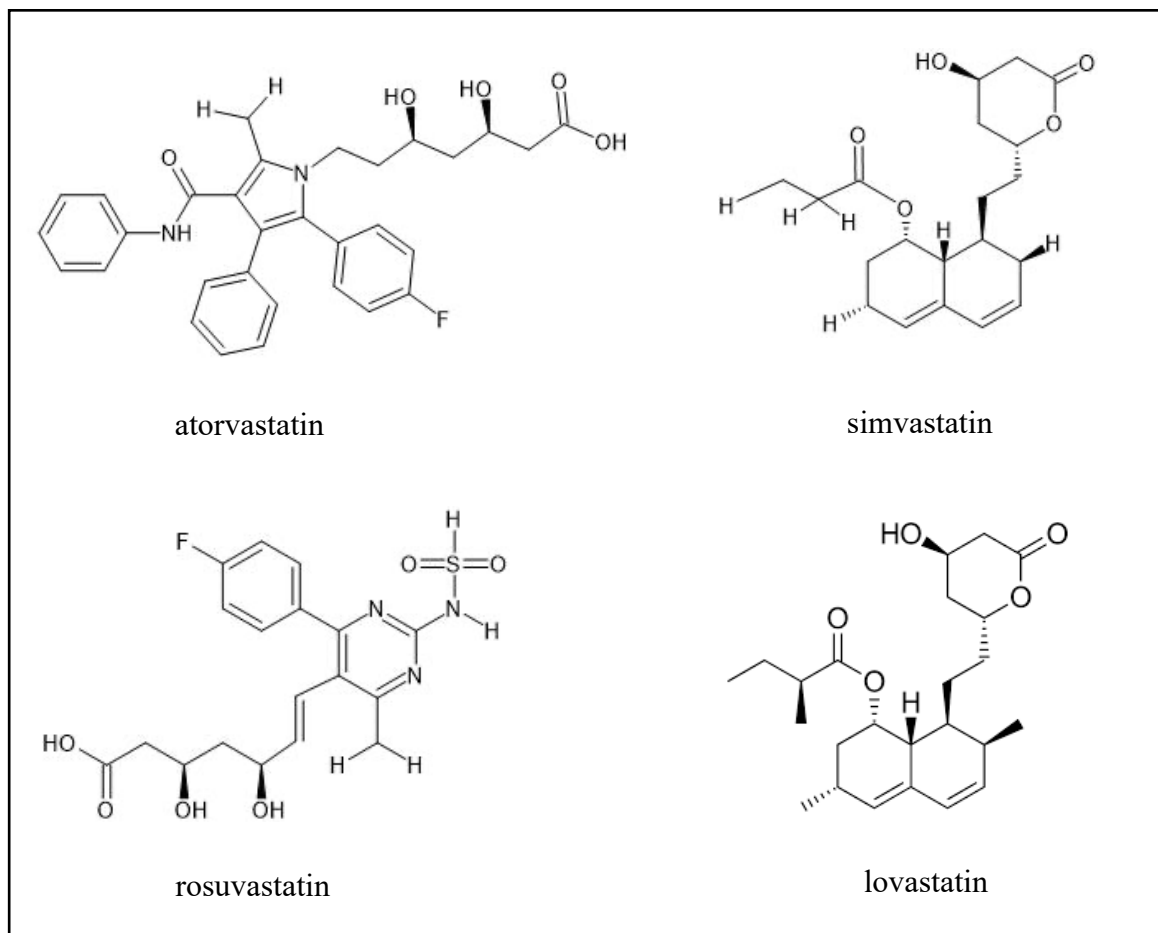
Statiny jsou léčiva fungující jako hypolipidemika, tedy léky používané k ovlivnění hladiny krevních tuků. Jejich cílem je snížit riziko vzniku závažných komplikací aterosklerózy, zejména infarktu myokardu a mozkové příhody (Goláň, 2003, Gotto 2003). První statin nazvaný mevastatin byl izolován v Japonsku na počátku 70. let 20. století z plísně *Penicillium citricum* (Endo, 2004). Samotný mevastatin nebyl nikdy používán v praxi. Koncem 70. let byla z houby *Monascus ruber* izolována látka s hypolipidemickými účinky, která později dostala jméno lovastatin (Endo, 2004). Další sloučeniny s hypolipidemickými účinky byly z přírodních produktů získány chemickou modifikací, později byly statiny připravovány synteticky (Endo, 2004).

Statiny jsou vysoce účinné léky na snížení plazmatických hladin cholesterolu (Goláň, 2003). Blokují syntézu cholesterolu v játrech inhibicí enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymu A reduktázy (HMG-CoA reduktázy), což má za následek zvýšení funkce LDL-receptorů v játrech a zvýšené vychytávání LDL-cholesterolu z krve, v důsledku čehož klesá hladina LDL-cholesterolu při léčbě statiny až o 35 % (Goláň, 2003). Enzym HMG-CoA reduktáza se účastní první ze čtyř fází syntézy cholesterolu, jak je ukázáno na Obr. 1.

Statiny představují jednu z nejpoužívanějších skupin léků – globální trh za rok 2020 činil 14,1 miliardy dolarů (Maximize Market Research, 2021). Bylo prokázáno, že snižují významně nejen hladinu cholesterolu, ale jako jediná hypolipidemika také morbiditu a mortalitu spojenou s kardiovaskulárními nemocemi (Gotto, 2003). V současné době lze v České republice vybírat ze 6 statinů: nejčastěji předepisovanými jsou atorvastatin, simvastatin a rosuvastatin, pouze zlomek preskripce připadá na fluvastatin, pravastatin a lovastatin (Pro lékaře, 2019). Strukturní vzorce nejčastěji předepisovaných statinů jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 1: Syntéza cholesterolu v lidském organismu – znázornění základních čtyř fází syntézy: fáze 1 – zelený rámeček, fáze 2 – hnědý rámeček, fáze 3 – modrý rámeček, fáze 4 – žlutý rámeček (Petraňová, 2020 – upraveno dle Medical Biochemistry).



Obr. 2: Strukturální vzorce nejvíce používaných statinů, atorvastatinu, simvastatinu, rosuvastatinu a lovastatinu (Chebi).

Atorvastatin

Atorvastatin patří do lékové skupiny synteticky připravených statinů (Hájková et al., 2008). Jeho sumární vzorec je $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ a název podle IUPAC¹: kyselina (3R, 5R)-7-[2-(4-fluorfenyl)-3-fenyl-4-(fenylkarbamoyl)-5-propan-2-ylpyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanová (PubChem, 2022).

Atorvastatin poprvé syntetizovali vědci firmy Warner Lambert roku 1985 a následně zažádali o první patent na syntézu vápenaté soli atorvastatinu (Hájková et al., 2008). Nový statin byl upraven do pevné lékové formy a uveden na trh pod názvem Lipitor. Dle

¹ IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry.

databázi AISLP² a SUKL³ se v současné době atorvastatin v lékových formách vyskytuje buď jako atorvastatin vápenatý trihydrát, či jako atorvastatin vápenatý. Celosvětový prodej atorvastatinu od roku 2003 přesahuje hranici 10 miliard dolarů, přičemž největší spotřeba připadá na Spojené státy americké (Hájková et al., 2008). Tablety jsou vyráběny v síle 10, 20, 40 a 80 mg aktivní substance a podávají se jednou denně buď ráno, či večer (Hájková et al., 2008). Po perorálním podání nastává rychlá absorpce atorvastatinu stěnou střeva (Lennernäs, 2003), maximální plazmatická koncentrace nastává po 1 – 2 hodinách (Hájková et al., 2008). Atorvastatin je z organismu vylučován z 98 % v nezměněné podobě, jen cca 2 % jsou přeměněna na hydroxylové metabolity (Vítovec et al., 2017). Studie prokázaly, že výskyt nežádoucích účinků při užívání atorvastatinu je nízký a jen výjimečně dochází kvůli nežádoucím účinkům k vysazení léku. Možné nežádoucí účinky jsou např. záněty svalů, zánět slinivky břišní, zánět jater a žloutenka (Hájková et al., 2008).

Statiny ve vodním prostředí

Léčiva jsou v dnešní době považována za nezbytnou součást našich životů. Uplatňují se jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně (Dietrich et al, 2002). Statiny jsou běžně předepisovanými léky, a protože v organismu nejsou prakticky metabolizovány, dostávají se do městských splaškových vod, kde jejich koncentrace činí až 77 µg/l (Ellesat et al, 2010, Lee et al., 2009). Protože čističky odpadních vod nejsou schopny zachytávat širokou paletu látek vyskytujících se v malých koncentracích (což je případ farmakologických, kosmetických a dalších přípravků), dostávají se následně tyto látky do povrchových vod. V této souvislosti se v posledních letech používá pro tento typ látek termín emergentní polutanty. Geissen et al. (2015) uvádí, že v době vydání jejich práce bylo v Evropě evidováno pro vodní ekosystémy více než 700 emergentních polutantů.

Odstraňování těchto sloučenin může být zprostředkováno chemickými či biologickými procesy degradace během čištění odpadních vod nebo adsorpcí na pevnou fázi. Obecně lze ale říci, že u většiny těchto látek je eliminace neúplná, a to je hlavním důvodem, proč se výskyt farmaceutických sloučenin ve vodách stává nebezpečným pro životní prostředí a upoutává neustále větší zájem odborníků (Gracia-Lor et al, 2012).

² AISLP – Automatizovaný Informační Systém Léčivých Přípravků

³ SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv

Atorvastatin byl a je opakovaně nacházen v povrchových vodách v různých částech světa. V povrchových vodách ve státě Tennessee byla nalezená koncentrace atorvastatinu 101,3 µg/l, v norských sladkovodních ekosystémech 250 µg/l (Santos et al, 2016). V České republice hodnota koncentrace atorvastatinu v 21 vzorcích nepřesáhla hodnotu 1,5 µg/l (Ministerstvo zemědělství, 2018). Fakt, že se statiny ve vodním prostředí vyskytují, může znamenat ohrožení vodních organismů, které jsou těmto látkám vystaveny po celou dobu života.

Zkoumány byly účinky atorvastatinu na pstruzích duhových *Oncorhynchus mykiss* a zebříček *Danio rerio*, a to jak *in vivo*, tak *in vitro*. Zmíněný statin se injekčně vpravil do pstruha duhového, což vedlo ke snížení obsahu buněčného cholesterolu až o 30 %. U těchto pstruhů došlo také ke snížení plazmatické koncentrace kortizolu, díky čemuž odborníci předpokládají, že s úbytkem množství cholesterolu ztratily správnou reakci na stresové podmínky, nebo na stres nereagovaly vůbec (Al-Habsi, Aziz, 2014). U zebříček probíhal výzkum tak, že po dobu 30 dnů jim byly podáván atorvastatin spolu s potravou. Za těchto 30 dnů se obsah cholesterolu v celém těle snížil téměř o 30 % a došlo také k úbytku pohlavních steroidů (Al-Habsi, Aziz, 2014).

Práce Barrosové et al. (2018) se zabývala účinky simvastatinu na sladkovodní zebříčku *Danio rerio*. Zebříčky byly vystaveny působení simvastatinu v koncentracích v rozmezí 8 µg/l-1000 µg/l po dobu 90 dnů. U zebříček vystavených koncentracím od 8 µg/l do 200 µg/l nastalo snížení hladiny cholesterolu a triglyceridů v játrech (a to zejména u samic), snížení tělesné hmotnosti a došlo i ke změnám souvisejícím s transkripcí klíčových genů, které řídí biosyntézu cholesterolu. Vyšší koncentrace nad 200 µg/l nevykazovaly dle závěrů uvedené práce žádný efekt.

Potlačení transkripce klíčových enzymů mitochondriální biogeneze u mořského mlže *Mytilus edulis* při vystavení atorvastatinu v koncentraci 1,2 µg/l popisuje studie Falfushynske et al. (2019).

U vodního korýše *Daphnia magna* byla při 21denním testu se simvastatinem pozorováno snížení produkce vajíček a růstové rychlosti (Liu et al., 2019).

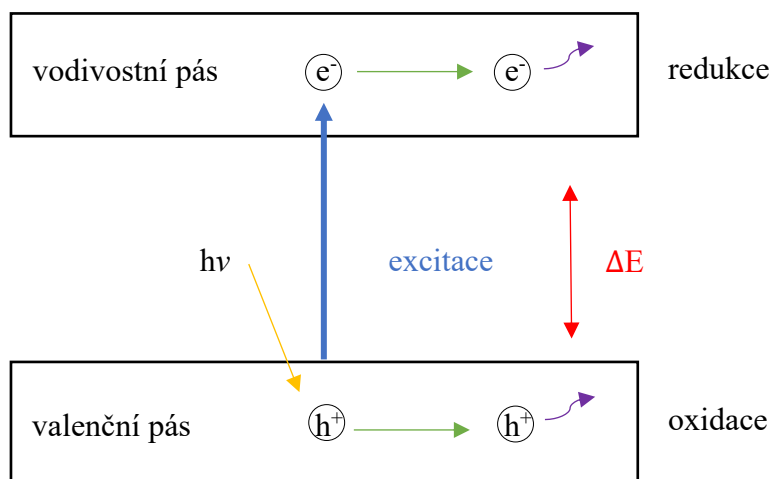
Kromě vodních živočichů byl studován vliv statinů i na vodních rostlinách. Práce Braina et al. (2006) na *Lemna gibba* uvádí snížení produkce některých komponent rostlinných membrán a regulátorů morfogeneze při expozici rostliny atorvastatinu a lovastatinu.

Heterogenní fotokatalýza

Heterogenní fotokatalýza s použitím polovodičů jako fotokatalyzátorů je jedním z nízkonákladových a ekologicky nezávadných nástrojů, jak odbourávat řadu znečišťujících látek (Ibhadon, Fitzpatrick, 2013). Poprvé ji objevil Fujishima roku 1972 při štěpení H_2O ve fotoelektrochemickém článku obsahujícím TiO_2 elektrodu (Wang et al., 2022). Jedná se o katalýzu, kde je katalyzátor přítomen v jiné fázi než samotná reagující látka. Reagující látky jsou přítomné v roztoku či plynném skupenství, katalyzátor je přítomen v pevné fázi, ale musí být v bezprostředním kontaktu s prostředím, v němž reakce probíhá. Aby reakce s tímto uspořádáním mohla proběhnout, musí se kromě vlastní katalýzy odehrát další nutné děje (Moore, 1979):

- Transport reaktantů k povrchu polovodiče je zajištěn pomocí difúze, odehrává se relativně pomalu a je obvykle krokem určujícím rychlost reakce.
- Adsorpce reaktantů na povrch vodiče je zásadní, protože bez přímého kontaktu s katalyzátorem by nebylo možné přenést náboj.
- Aktivace polovodiče neboli tvorba páru elektron + díra a následná vlastní reakce adsorbovaných látek, která je oxidačně redukčním procesem
- Desorpce produktů z povrchu katalyzátoru, a tím uvolnění aktivních míst pro další reakce.
- Odstranění produktů z blízkosti povrchu katalyzátoru, které je zprostředkováno opět difúzí.

Při fotochemické reakci s katalyzátorem v pevné fázi je jako katalyzátor používán polovodič. Polovodičová částice absorbuje fotony, jejichž energie je dostatečná k překonání energetické bariéry mezi valenčním a vodivostním pásem (ΔE) a tedy k excitaci elektronů z valenčního do vodivostního pásu, jak je naznačeno ve schématu na Obr. 3. Elektron na svém původním místě ve valenčním pásu zanechá kladné místo – díru. Tento proces tvorby párů elektron – díra je významný pro spuštění oxidačních a redukčních reakcí molekul přítomných v roztoku, protože elektron se chová jako redukující částice a díra jako oxidující částice (Xiao et al., 2015).

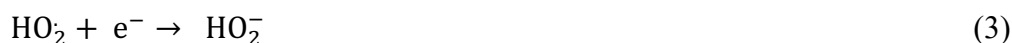


Obr. 3: Schéma tvorby páru elektron – díra v polovodiči.

Ve vodných roztocích může být excitovaný elektron z povrchu polovodiče navázán na rozpuštěný kyslík, čímž vznikne superoxidový anion radikál O_2^- , z něhož pak může vzniknout hydroperoxylový radikál HO_2 , jak ukazují rovnice 1 a 2.



Z vytvořeného hydroperoxylového radikálu pak může vznikat peroxid vodíku a hydroxylové radikály, jak je znázorněno v rovnicích 3 a 4 (Xiao et al., 2015)



Tyto reakce efektivně inhibují rekombinaci páru elektron díra, a tím prodlužují dobu života pozitivních děr, které reagují s vodou a hydroxidovými ionty za tvorby hydroxylových radikálů (Klementová, 2018), jak je znázorněno v rovnicích 5 a 6.



Z uvedených rovnic je patrné, že částicemi generovanými při heterogenní fotokatalytické reakci za použití polovodičů jako katalyzátorů jsou radikály – superoxidové ionty, hydroperoxylové radikály a zejména hydroxylové radikály, které mohou nespecificky reagovat s organickými látkami a oxidovat je (Kaur et al., 2019).

Heterogenní fotokatalytické reakce jsou obvykle popisovány jako reakce probíhající podle kinetiky 1. řádu, ačkoli se vlastně jedná o reakce pseudoprvního řádu, kdy příslušné radikály jsou ve výrazném nadbytku oproti rozkládaným organickým látkám, takže reakce pak závisí vlastně jen na koncentraci rozkládané organické látky, protože koncentrace radikálů je prakticky konstantní.

Materiály, které se v dnešní době hojně využívají jako fotokatalyzátory, jsou např. TiO_2 , ZnO , WO_3 , CdS , CdSe , SnO_2 , MnO_2 , přičemž TiO_2 je nejvíce prozkoumaným a nejvíce používaným díky svým vlastnostem, zejména nízkým nákladům, nízké toxicitě a chemické stabilitě (Xiao et al., 2015).

Z různých forem TiO_2 , které byly studovány, má nejvyšší fotokatalytickou aktivitu Degussa P-25 TiO_2 , což je materiál složený ze dvou krystalových modifikací TiO_2 , anatasu a rutilu, v poměru 3:1 (Ohno et al., 2001)

Heterogenní fotokatalýza s použitím TiO_2 jako fotokatalyzátoru byla studována pro degradaci různých emergentních polutantů. Tak např. Maléterová et al. (2013) testovali TiO_2 imobilizovaný v tenké vrstvě na skleněném nosiči pro odbourávání 17-estradiolu v odpadních vodách. Pourata et al. (2009) studovali degradaci herbicidu bentazon v kontaminované vodě za přítomnosti práškového nanokrystalického TiO_2 . Verma et al. (2014) prokázali, že TiO_2 imobilizovaný na cementových kuličkách je účinný pro degradaci herbicidu isoproturonu a že degradace probíhá až na anorganické produkty, tedy vede k mineralizaci isoproturonu a to až z 90 %. Podobný výsledek popisují Tang et al. (2013) s herbicidem 2,4-dichlorfenoxyoctovou kyselinou, kde s využitím grafenem modifikovaného TiO_2 došlo k úplnému odstranění po 140 minutách ozařování simulovaným slunečním zářením. Asiri et al. (2011) použili TiO_2 k degradaci barviv používaných v biotechnologických aplikacích, rhodaminu G a fenolové červeně.

Nevýhodou TiO_2 je poměrně široký energetický rozdíl mezi valenčním a vodivostním pásem – 3,2 eV (Dette et al., 2014), což odpovídá vlnové délce potřebné k excitaci 387 nm. To znesnadňuje použití tohoto fotokatalyzátoru k fotodegradaci polutantů slunečním světlem, protože záření o vlnových délkách kratších než 387 nm tvoří jen malou část slunečního spektra. Proto bylo napřeno velké úsilí do pokusů posunout absorpci TiO_2 do viditelné oblasti dopováním TiO_2 za účelem snížení energetické bariéry. Byly k tomu použity ionty přechodných kovů, např. ionty paladia, mědi, vanadu, chromu, ale i organickými molekulami jako např. pomocí ftalocyaninů (Chen D. et al., 2020) či sensitizace pomocí přírodních

organických barviv jako např. antokyany z ibišku a borůvek, karotenoidy ze šafránu (Priyanka K. P. et al., 2017, Goulart S. et al., 2020). V poslední době se pozornost zaměřuje též na kompozity TiO₂ s grafenem (Tang et al., 2013, Etacheri V. et al., 2015).

Materiál a metody

Atorvastatin vápenatý trihydrát byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich v kvalitě European Pharmacopoeia Reference Standard. Zásobní roztok byl připravován rozpuštěním cca 5 mg (4,9 – 5,2 mg) atorvastatinu v 100 ml Milli-Q® vodě, za cca hodinového působení ultrazvuku v ultrazvukové lázni Netz K1. Zásobní roztok byl během rozpouštění zakryt před denním světlem, uchováván byl ve tmě při pokojové teplotě.

Ozařování: Jako zdroj světla byla použita lampa Philips TL-D 15W/08, která emituje záření o vlnových délkách 350-400 nm, s maximem u 365 nm. Pro ozařování bylo pipetou odměřeno 5 ml roztoku atorvastatinu do jednotlivých krystalizačních misek o průměru 4 cm. Dále bylo do misek vloženo mikroskopické sklíčko o ploše 4 cm² s imobilizovanou vrstvou TiO₂ (sklíčka s imobilizovaným TiO₂ byla poskytnuta z VŠCHT) a malé magnetické míchadlo. Krystalizační misky byly umístěny na pětimístnou magnetickou míchačku JK IKA, typ RO. Světelný výkon lampy na jednotlivých pozicích míchačky byl proměřen pomocí luxmetru UVA Light meter, model UVA-365, jeho hodnota činila 0,913 mW/cm² a 0,956 mW/cm² pro dvě krajní pozice a 1,623 mW/cm² – 1,692 mW/cm² pro tři vnitřní pozice. K ozařování vzorků byly používány pouze tři vnitřní pozice.

Reakční směs atorvastatinu byla po ozáření kvantitativně převedena do odměrných baněk o objemu 10 ml a doplněny Milli-Q® vodou na daný objem. Tento krok eliminoval různé odpaření vzorku při různých ozařovacích časech.

HPLC analýza: Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC na přístroji Thermo Scientific Dionex Ultimate systém (USA) s kolonou Arion®Polar 5 µm C18, 250 mm × 4,6 mm od výrobce Chromservis. Chromatografie byla prováděna izokraticky, mobilní fáze byla složena z vody s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (55 v/v %) a acetonitrilu (45 v/v %), průtok byl nastaven na 1 ml/min, objem nastříkovaného vzorku byl 5 µl. Detekce byla provedena spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem PDA 3000RS a zároveň fluorescenčním detektorem FLD 3000RS. Data byla následně zpracována v počítačovém programu Chromeleon.

Test toxicity: Toxicita atorvastatinu a produktů jeho fotochemické degradace byla testována na okřešku (*Lemna minor*) podle metodiky OECD Guideline 221 (OECD, 2002). Okřehek byl odebrán z tůňky u vrcholu Stráže v Mičovicích (jižní Čechy, GPS souřadnice: 48°99'87";14°14'20").

Médium, které bylo použito, se označuje jako Swedish Standard *Lemna* Growth Medium (SIS) a míchá se z několika zásobních roztoků, jejich složení udává Tab. I.

Tab. I: Složení zásobních roztoků použitých pro přípravu kultivačního média pro okřehek.

roztok	chemické 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)	98

Kultivační SIS médium bylo připraveno v kádince o objemu 1 litru. K cca 700 ml Milli Q[®] vody byly přidány objemy jednotlivých zásobních roztoků dle Tab. II.

Tab. II: Objem jednotlivých zásobních roztoků potřebných pro přípravu kultivačního SIS média.

zásobní roztok	objem (ml)
I	10
II	5
III	5
IV	5
V	1
VI	5
VII	5

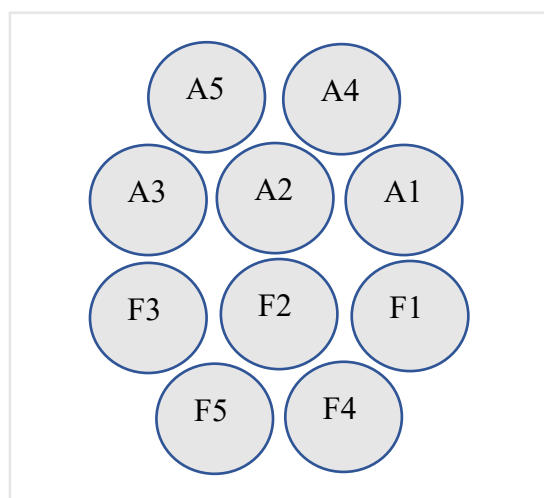
Následovala úprava pH na hodnotu 6,5 (doporučené rozmezí hodnot je $6,5 \pm 0,2$). Úprava hodnoty mohla být provedena 0,1 NaOH nebo 1 M HCl dle doporučení, v této práci byl použit pouze roztok NaOH. Po úpravě pH byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn Milli-Q[®] vodou na objem 1 litr.

Před samotným testem byl okřehek kultivován v médiu po dobu 3 týdnů, jedenkrát týdně byl v době kultivace přeočkován do čerstvého média.

Test toxicity fotoproduktů byl proveden s atorvastatinem jako slepým vzorkem s použitím pěti paralelních stanovení pro fotoprodukty i atorvastatin. Koncentrace atorvastatinu v kultivačním médiu činila 200 $\mu\text{g/l}$, fotoprodukty byly přidány v takovém objemu, aby zbytková koncentrace atorvastatinu po ozáření byla také 200 $\mu\text{g/l}$. Jako doba ozařování atorvastatinu byl zvolen čas 35 min, po této době zbývalo v reakční směsi 40 % nezreagovaného atorvastatinu.

Test byl proveden v krystalizačních miskách o průměru 9,5 cm, kam bylo pinzetou přeneseno cca 12 lístků okřehek (plocha listů 1 – 1,6 cm^2) do 120 ml média.

Okřehek byl kultivován při pokojové teplotě (22–25 °C), přes den podobu 7 hodin byl přisvěcován LED osvětlením (LED CRI-300-W, barva bílá 6000–6500 K), intenzita přisvícení byla v rozmezí 3620–4520 lx (měřeno luxmetrem Elvos Luxmesser LM 1010). Rozmístění misek je pod LED osvětlením je znázorněno na Obr. 4, misky s atorvastatinem mají označení A1-A5, zatímco misky s jeho fotoprodukty F1-F5.



Obr. 4: Rozmístění krystalizačních misek s okřehekem pod LED osvětlením.

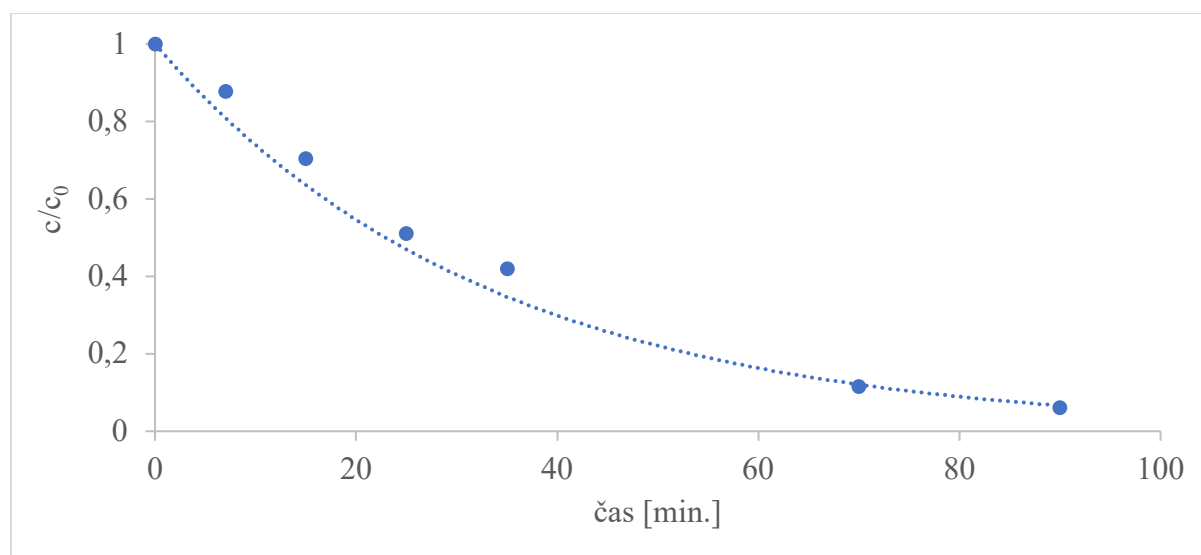
Pro vyhodnocení dopadu atorvastatinu a produktů jeho fotochemické degradace na plochu listů byl použit program Easy Leaf area software v mobilní aplikaci. Ke statistickému vyhodnocení výsledků testu toxicity byl použit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu.

Výsledky

Chromatogram samotného atorvastatinu a atorvastatinu s produkty ozařování za použití fluorescenčního detektoru ukazuje Obr. 5.

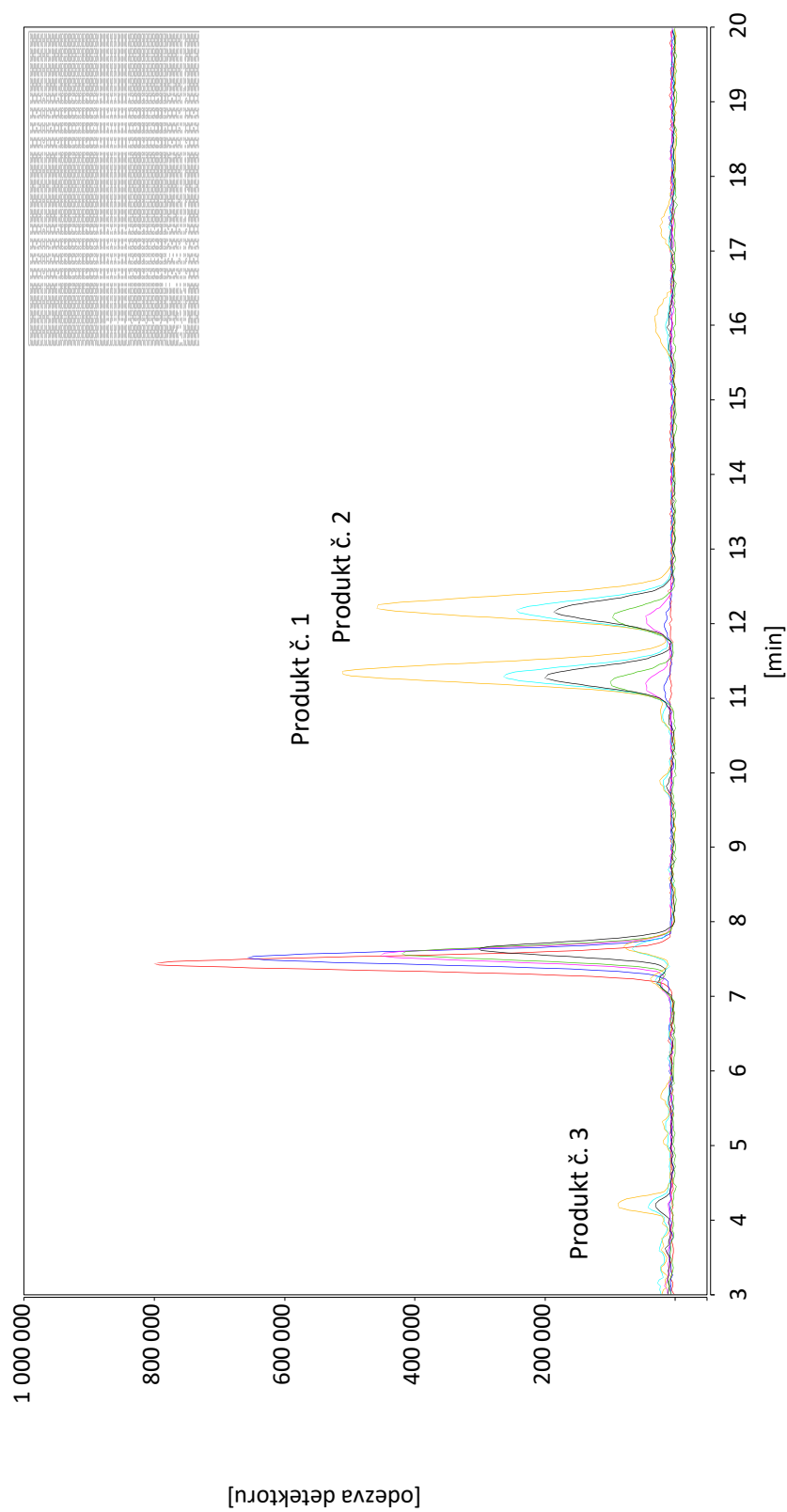
Z Obr. 5 je patrné, že většina degradačních produktů má retenční čas delší než samotný atorvastatin. Na chromatogramu jsou vidět dva hlavní degradační produkty, produkt 1 (retenční čas 10,9 minut) a produkt 2 (retenční čas 11,8 minut), které se objevují již od začátku ozařování – jsou rozeznatelné již po 9 minutách ozařování. Produkt 3 (retenční čas 3,9 minut) se objevil až po více než 40minutovém ozařování. Poslední dva na chromatogramu patrné minoritní produkty se u retenčních časů 16 minut a 17,3 minuty objevily až při 90 minutách ozařování.

Průběh odbourávání atorvastatinu s využitím imobilizovaného TiO_2 jako fotokatalyzátoru ukazuje Obr. 6.



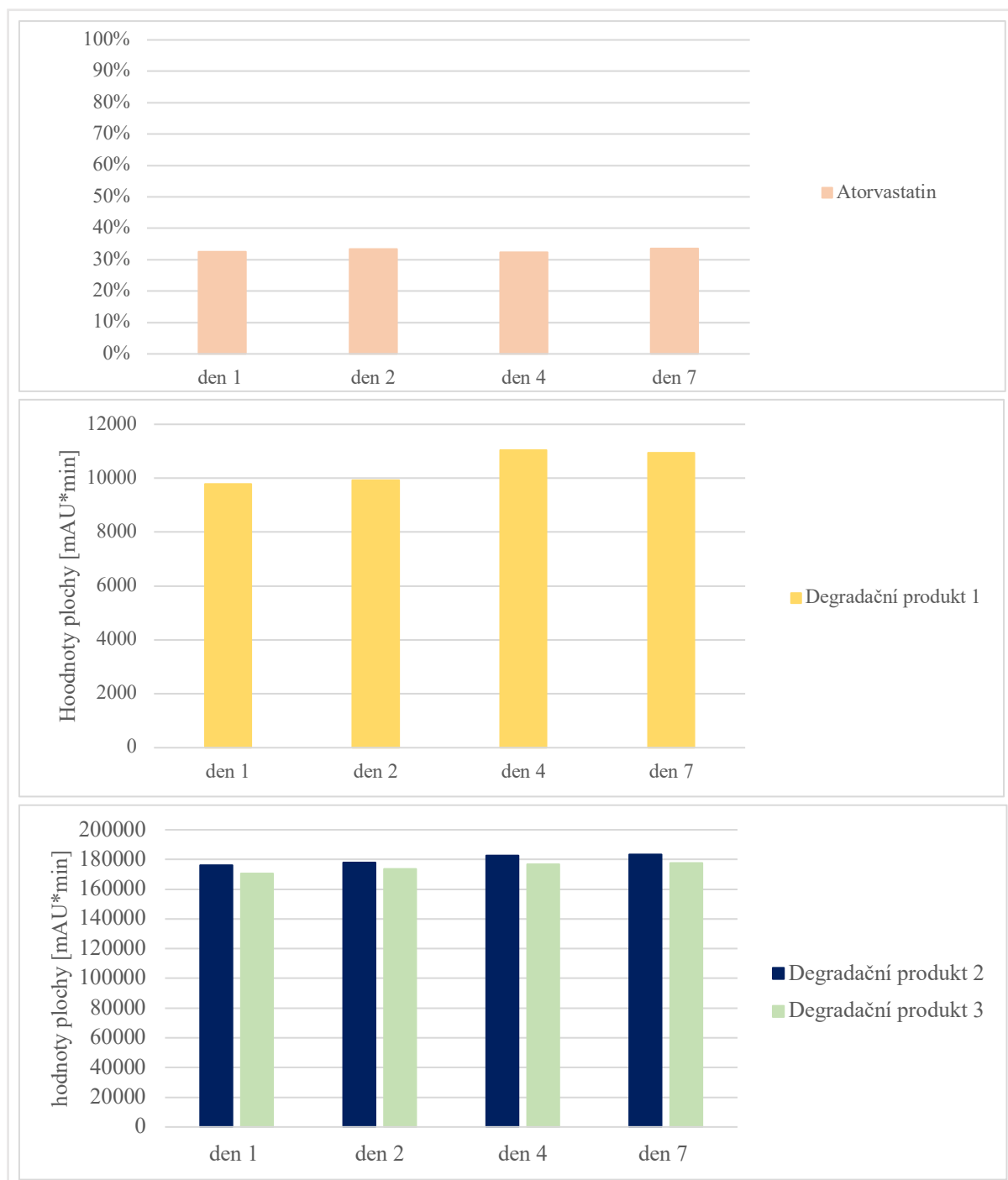
Obr. 6: Odbourávání atorvastatinu na imobilizovaném TiO_2 .

Z Obr. 6 je vidět, že za 90 minut ozařování na TiO_2 ubylo cca 95 % atorvastatinu. Rychlost odbourávání je možné popsat pomocí kinetiky 1. řádu s rovnicí $y = e^{-0,03x}$, rychlostní konstanta odbourávání činí $0,03 \text{ min}^{-1}$.



Obr. 5: Chromatogram atorvastatinu a degradačních produktů při ozařování na TiO_2 v různých ozařovacích časech: červená – atorvastatin neozařený, modrá – ozaření 9 min, fialová – 20 min, zelená – 32 min, černá – 47 min, tyrkysová – 67 min, žlutá – 90 min.

Výsledek sedmidenního testu stability zásobního roztoku atorvastatinu a reakční směsi po 90 minutách ozařování je znázorněn na Obr. 7.

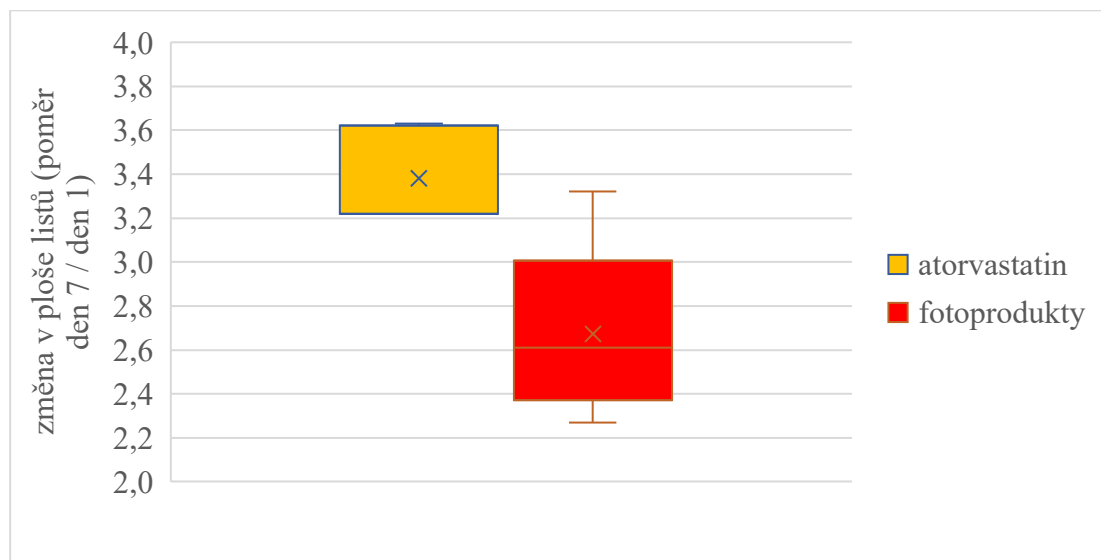


Obr. 7: Stabilita atorvastatinu a degradačních produktů vzniklých při ozařování po dobu 90 minut. Vzorky měřeny v den ozáření (den 1) a druhý, čtvrtý a sedmý den po ozáření.

Degradační produkty na Obr. 7 jsou označeny podle rostoucího retenčního času. Produkt 1 má cca dvacetinásobně nižší odezvu než produkty 2 a 3. Z Obr. 7 vyplývá, že roztok atorvastatinu

je stabilní, u degradačního produktu 1 je vidět mírný nárůst mezi dnem 1 a dnem 3 (o 11 %), k dalšímu nárůstu v posledních dvou dnech již nedocházelo. Degradací produkty 2 a 3 se změnilo o 2,5 % (produkt 2) a o 4 % (produkt 3).

Výsledek testu toxicity je znázorněn graficky na Obr. 8.



Obr. 8: Toxicita atorvastatinu a jeho fotoproduktů stanovena jako změna plochy listů.

Na Obr. 8 je na ose y vynesena změna v ploše listů jako poměr plochy 7. den inkubace a plochy na začátku inkubace (1. den). Z Obr. 8 je patrné, že poměr plochy listů je výrazně vyšší u atorvastatinu než u směsi fotoproduktů, tj. že v atorvastatinu plocha listů přirůstala výrazně rychleji než ve směsi fotoproduktů. Střední hodnota tohoto poměru je pro atorvastatin 3,38 a pro směs fotoproduktů 2,67. Hodnota parametru p porovnání pro obě sady dat při použití dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu vyšla 0,0038.

Diskuze

Z křivky průběhu odbourávání atorvastatinu s použitím TiO_2 jako fotokatalyzátoru, kterou bylo možno modelovat kinetikou prvního řádu, byla stanovena rychlostní konstanta $0,03 \text{ min}^{-1}$, což odpovídá poločasu reakce 23 minuty. Pro atorvastatin není k dispozici hodnota z literatury pro srovnání. Piecha et al. (2010) uvádějí hodnoty poločasů několika jiných statinů (simvastatinu, lovastatinu a pravastatinu) v reakci s použitím TiO_2 jako katalyzátoru v rozmezí 8 – 19 minut. Tyto hodnoty jsou sice blízké hodnotě uváděné v této práci, nicméně vzhledem k odlišnosti struktur jimi studovaných statinů od atorvastatinu (viz Obr. 2) nelze považovat blízkost hodnot za zásadně relevantní. V práci Piechy et al. (2010) je uvedeno, že produkty, které autoři pozorovali při fotodegradaci statinů simvastatinu, lovastatinu a pravastatinu, vznikly hydroxylací původních substrátů. V předkládané práci produkty studovány nebyly, ale vzhledem k účasti hydroxylových radikálů na odbourávání atorvastatinu lze hydroxylaci přinejmenším jako první krok očekávat.

Test stability atorvastatinu potvrdil údaj z práce Petráňové (2020), že po dobu sedmi dnů, tedy po dobu potřebnou pro test toxicity na vodní rostlině, je roztok stabilní.

V reakční směsi po ozáření byly při analýze HPLC pozorovány dva hlavní produkty a dva minoritní produkty, které se objevily až po delším ozařování. Nalezené dva hlavní produkty i dva minoritní produkty jsou pravděpodobně totožné s produkty pozorovanými v práci Klementové et al. (2021), kde ozařování bylo prováděno v homogenní fázi s přídavkem železitých iontů jako fotokatalyzátoru. Za podmínek v citované práci uvedených byly pozorovány ještě dva další minoritní produkty s kratším retenčním časem, než je retenční čas atorvastatinu. Fotoprodukty odbourávání atorvastatinu v přítomnosti různých látek zkoumal Wang et al. (2018), ale jednalo se o fotochemické reakce v homogenní fázi s přídavkem např. huminových látek, anorganických aniontů a iontů Fe^{3+} . Jeho závěry tedy nejsou pro heterogenní fotokatalytickou reakci použitelné.

V práci Klementové et al. (2021) byla testována toxicita atorvastatinu na okřehek (*Lemna minor*) v rozmezí 0-200 mg/l, neboť již u koncentrace 26 mg/l je v práci Braina et al. (2006) uváděn toxický efekt (EC_{10}). V práci Klementové et al. 2021 ale nebyl toxický efekt potvrzen ani v nejvyšší použité koncentraci, zato byla prokázána toxicita fotoproduktů vzniklých při ozařování v homogenním roztoku s přídavkem železitých iontů jako fotokatalyzátoru. Proto byla v předkládané práci testována toxicita směsi fotoproduktů vzniklých při ozařování na TiO_2 , a to po 35- minutovém ozařování, kdy v reakční směsi bylo

již nahromaděno významné množství produktů fotochemické degradace. V testu toxicity u směsi degradačních produktů byl velký rozptyl hodnot, jak ukazuje Obr. 7, ale i s tímto velkým rozptylem byla hodnota p parametru ve dvouvýběrovém párovém t-testu na střední hodnotu 0,0038. Nulová hypotéza (tvrdící, že přírůstek plochy listů bude stejný v obou prostředích, tj. atorvastatinu i fotoproduktů) se zamítá v případě, že hodnota parametru p je menší než 0,05. Hodnota p parametru získaná v této práci je řádově nižší, takže fotoprodukty degradace s heterogenním fotokatalyzátorem byly prokázány jako toxické pro okřehek. V práci Klementové et al. (2021) byla získána hodnota p parametru 0,005 srovnatelná s hodnotou prezentovanou v této práci. To je i ve shodě se skutečností, že pozorované hlavní produkty, které jsou pravděpodobně za toxicitu zodpovědné, se zdají být (dle retenčních časů při HPLC analýze) shodné v obou případech, tj. ozařování v homogenní fázi i ozařování v přítomnosti TiO₂ jako fotokatalyzátoru, shodné.

Závěr

Atorvastatin podléhá fotochemické degradaci při heterogenní katalýze za použití TiO₂ jako fotokatalyzátoru s rychlostní konstantou 0,03 min⁻¹.

Při fotodegradaci se tvoří dva hlavní produkty a tři minoritní produkty, z nichž dva se objevují až při déletrvajícím ozařování (více než 60 minut).

Směs produktů fotochemické degradace atorvastatinu za použití TiO₂ jako fotokatalyzátoru vykazuje statisticky významnou toxicitu vůči vodní rostlině *Lemna minor*, parametr p ve dvouvýběrovém párovém t-testu na střední hodnotu měl hodnotu 0,0038.

Seznam použité literatury

Al-Habsi, Aziz (2014): The Effects of Statin and Fibrate Drugs on Cholesterol Metabolism and Steroid Production in Two Fish Species, 4-5.

https://ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/31587/1/Al-Habsi_Aziz_2014_thesis.pdf

Asiri A. M., Al-Amoudi M. S., Al-Talhi T. A., Al-Talhi A. D. (2011): Photodegradation of Rhodamine 6G and phenol red by nanosized TiO₂ under solar irradiation. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15(2), 121-128.

<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.005>

Barrosová S., Montesová R., Quintana J. B., Rodilová R., André A., Capitão A., Soaresová J., Santos M. M., Neuparthová T. (2018): Chronic environmentally relevant levels of simvastatin disrupt embryonic development, biochemical and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*), 201, 47-57.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.05.014>

Brain R.A., Reitsma S.T., Lissemore S.I., Bestari K.J., Sibley P.K., Solomon K.R. (2006). Herbicidal Effects of Statin Pharmaceuticals in *Lemna gibba*. *Environmental Science and Technology*, 40, 5116-5123.

<https://doi.org/10.1021/es0600274>

Dette Ch., Pérez-Osorio M. A., Kley Ch. S., Punke P., Patrick Ch. E., Jacobson P., Giustino F., Jung S. J., Kern K. (2014): TiO₂ anatase with a bandgap in the visible region. 14(11), 6533-8.

<https://doi.org/10.1021/nl503131s>

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)

Endo A. (2004): The origin of the statins. *Atherosclerosis Supplements* 5, 125–130

Ellesat K. S., Tollefsen K. E., Åsberg A., Thomas K. V.,
Hylland K. (2010): Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout
(*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. 24(6), 1610-1618.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.006>

Etacheri V., Di Valentin C., Schneider J., Bahnemann D., Pillai S. C. (2015): Visible-light
activation of TiO₂ photocatalysts: Advances in theory and experiments. Journal of
Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. 25, 1-29.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2015.08.003>

Falfushynska H., Sokolov E. P., Haider F., Oppermann Ch., 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. 208, 47-61.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.022>

Geissen V., Mol H. G. J., Klumpp E., Umlauf G. (2015): Emerging pollutants in the
environment: A challenge for water resource management. 49(1).
<https://10.1016/j.iswcr.2015.03.002>

Golán L. (2003): Chyby a úskalí terapie statiny. Interní Med. 11, 552-553.
https://www.internimedica.cz/artkey/int-200311-0006_Chyby_a_uskali_terapie_statiny.php

Gotto AM Jr. (2003): Risks and benefits of continued aggressive statin therapy. Clin Cardiol.
26, III3–12.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/clc.4960261503>

Goulart S., Nieves L. J. J., Dal Bó A. G., Bernardin A. M. (2020): Sensitization of
TiO₂ nanoparticles with natural dyes extracts for photocatalytic activity under visible light.
Dyes and Pigments. 182, 108654
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108654>

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. 87(5), 453-462

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.025>

Hájková M., Kratochvíl B. a Rádl S. (2008): Atorvastatin – Nejprodávanejší lék na světě. Chemické listy. 102, 3-14.

ChEBI – Chemical Entities of Biological Interest database.

<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>

Chen D., Cheng Y., Zhou N., Chen P., Wang Y., Li K., Huo S., Cheng P., Peng P., Zhang R., Wang L., Liu H., Liu Y., Ruan R. (2020): Photocatalytic degradation of organic pollutants using TiO₂-based photocatalysts: A review. Journal of Cleaner Production. 268, 121725

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121725>

Cholesterol: Synthesis, Metabolism, and Regulation.

<https://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol-synthesis-metabolism-and-regulation/>

Ibhadon A. O., Fitzpatrick P. Heterogenní fotokatalýza: Nedávné pokroky a aplikace. Katalyzátory. (2013): 3(1):189-218.

<https://doi.org/10.3390/catal3010189>

Klementová Š. (2018): Photochemical Degradation of Organic Xenobiotics in Natural Waters. In: Photochemistry and Photophysics – Fundamentals to Applications. Eds: Satyen Saha & Sankalan Mondal, IntechOpen. ISBN 978-1-78923-784-9. Dostupné z:

<http://mts.intechopen.com/articles/show/title/photochemical-degradation-of-organic-xenobiotics-in-natural-waters>

Kaur H., Hippargi G., Pophali G. R., Bansiwala A. K. (2019): 6 - Treatment methods for removal of pharmaceuticals and personal care products from domestic wastewater.

Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology. 129-150.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00006-8>

Klementová Š., Petráňová P., Fojtíková P. (2021): Photodegradation of Atorvastatin under Light Conditions Relevant to Natural Waters and Photoproducts Toxicity Assessment. *Open Journal of Applied Sciences*. 11, 489-499.

<https://doi.org/10.4236/ojapps.2021.114035>

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>

Lennernäs H. Klinická farmakokinetika atorvastatinu. *Clin Pharmacokinet* (2003): 42, 1141-1160

<https://doi.org/10.2165/00003088-200342130-00005>

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>

Maléterová Y., Krejčíková S., Spáčilová L., Cajthaml T., Kaštánek F., Šolcová O. (2013). Conference: Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi VI, Praha (CZ) Dostupné z:

http://www.ekomonitor.eu/sites/default/files/soubory/2013/maleterova_ft.pdf

<https://invenio.nusl.cz/record/161372>

Maximize Market Research (2021): global Statin Market: Industry Analysis and Forecast (2021-2027) – by Type, Technology, End User, and Region. Maximize Market Research PVT, LTD. Dostupné z:

<https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-statin-market/77560/>

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

Moore W. J. (1979): Povrchová katalýza. V knize Fyzikální chemie. SNTL Praha, 508.

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

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhibition-test_9789264016194-en

Ohno T., Sarukawa K., Tokieda K., Matsumura M. (2001): Morphology of a TiO₂ Photocatalyst (Degussa, P-25) Consisting of Anatase and Rutile Crystalline Phases. Journal of Catalysis 203(1):82-86.

<https://doi.org/10.1006/jcat.2001.3316>

Petráňová P. (2020): Statiny – jejich použití, mechanismus účinku, vedlejší efekty. Atorvastatin a možnosti jeho fotochemické degradace v přírodních vodách. Bakalářská práce, PřF JU, České Budějovice, ČR.

<https://wstag.jcu.cz/StagPortletsJSR168/CleanUrl?urlid=prohlizeni-prace-detail&praceIdno=59922>

Piecha M., Sarakha M., Trebše P. (2010): Photocatalytic degradation of cholesterol-lowering statin drugs by TiO₂-based catalyst. Kinetics, analytical studies and toxicity evaluation. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 213(1), 61-69.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.04.020>

Pourata R., Khataee A. R., Aber S., Daneshvar N. (2009): Removal of the herbicide Bentazon from contaminated water in the presence of synthesized nanocrystalline TiO₂ powders under irradiation of UV-C light. 249(1), 301-307

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.10.033>

Priyanka K. P., Sankararaman S., Balakrishna K. M., Varghese T. (2017): Enhanced visible light photocatalysis using TiO₂/phthalocyanine nanocomposites for the degradation of selected industrial dyes. Journal of Alloys and Compounds. 720, 541-549.

<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.05.308>

Pro lékaře (2019): Není statin jako statin aneb praktický přehled rozdílů jednotlivých molekul.
<https://www.prolekare.cz/tema/kardiovaskularni-rizika/detail/neni-statin-jako-statin-aneb-prakticky-prehled-rozdilu-jednotlivych-molekul-112435>

PubChem. (2022): Atorvastatin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60823>

Santos M. M., Ruivo R., Lopes-Marques M., Torres T., Santos C. B., Castro L. F. C., Neuparth T. (2016): Statins: An undesirable class of aquatic contaminants? 174, 1-9
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.001>

Tang Y., Zhang G., Liu C., Luo S., Xu X., Chen L., Wang B. (2013): Magnetic TiO₂-graphene composite as a high-performance and recyclable platform for efficient photocatalytic removal of herbicides from water. 252, 115-122
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.053>

Verma A., Prakash N. T., Toor A. P. (2014): An efficient TiO₂ coated immobilized system for the degradation studies of herbicide isoproturon: Durability studies. 109, 7-13
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.051>

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>

Xiao J., Xie Y., High H. (2015): Organic pollutants removal in wastewater by heterogeneous photocatalytic ozonation. 121, 1-17.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.072>