

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Fotodegradace hydrokortizonu v homogenní a
heterogenní fotokatalytické reakci**

Diplomová práce

Bc. Lucie Doubková

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2015

Doubková, L., 2015: Fotodegradace hydrokortizonu v homogenní a heterogenní fotokatalytické reakci. [Photodegradation of hydrocortisone in homogeneous and heterogeneous photocatalytic reaction. Mgr. Thesis, in Czech.] - 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

The aim of this thesis was to measure the kinetics of photochemical degradation of hydrocortisone in heterogeneous photocatalytic reaction on immobilized TiO₂ and in homogeneous photocatalytic reaction with Fe(III) using UV-VIS and HPLC for measuring the degradation kinetics.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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.

České Budějovice, 20. 4. 2015

Lucie Doubková

Cíl práce

Cílem této práce bylo proměřit kinetiku fotochemického odbourávání hydrokortizonu v heterogenní fotokatalytické reakci na imobilizovaném TiO_2 a v homogenní fotokatalytické reakci s Fe(III) s využitím UV-VIS a HPLC pro měření kinetiky degradace.

Poděkování

Úvodem bych si dovolila poděkovat své školitelce doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za odborné vedení a výbornou spolupráci na tvorbě mé magisterské práce.

Můj dík patří také Ing. Gabriele Strnadové a Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za pomoc s ovládním přístroje HPLC, Ing. Tomáši Hubáčkovi z Hydrobiologického ústavu BC AV ČR za provedení analýzy železa na ICP-MS a Davidu Klementovi za pomoc s nákresem obrázků.

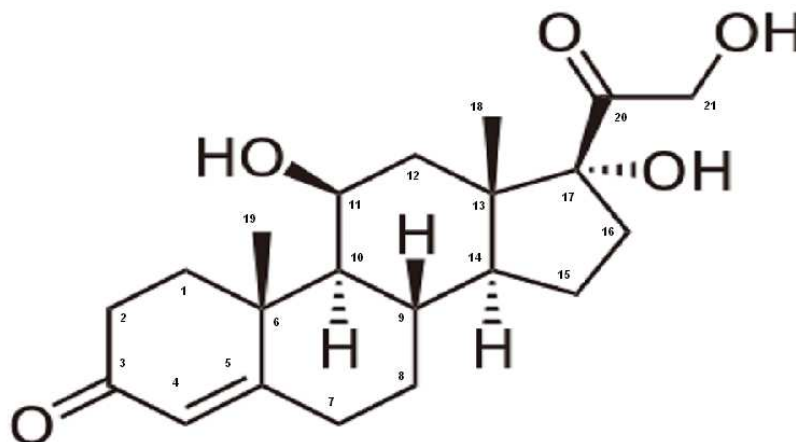
OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Základní charakteristika hydrokortizonu.....	1
1.2	Glukokortikoidy (kortikosteroidy).....	3
1.3	Biologické hladiny hydrokortizonu v organismu.....	3
1.4	Farmakologické použití hydrokortizonu	6
1.5	Hydrokortizon v přírodním vodním prostředí	6
1.6	Homogenní fotokatalytická degradace	7
1.7	Heterogenní fotokatalytická degradace	8
1.8	Analytické techniky – HPLC-MS, ICP-MS.....	10
2	MATERIÁL A METODY	14
3	VÝSLEDKY	17
4	DISKUZE	25
5	ZÁVĚR	27
6	LITERATURA	28

1 ÚVOD

1.1 Základní charakteristika hydrokortizonu

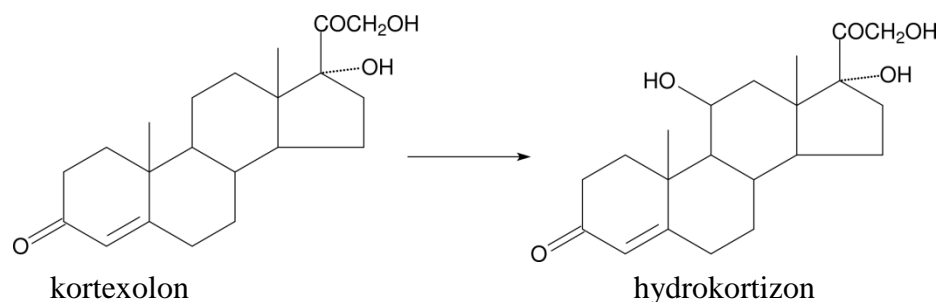
Hydrokortizon, léková forma endogenního glukokortikoidu kortizolu, má systematický název 11,17,21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion a sumární vzorec $C_{21}H_{30}O_5$. Jeho relativní molekulová hmotnost je 362,5. Vyskytuje se v podobě bílé, krystalické látky (Plenadren, 2011). Strukturní vzorec této látky je znázorněn na obr. 1 (Wikipedia1, 2007).



Obr. 1: Strukturní vzorec hydrokortizonu (Wikipedia1, 2007).

Hydrokortizon je hormon kůry nadledvin a patří mezi hlavní glukokortikoidní (kortikosteroidní) hormony. Je produkován v zona fasciculata a zona reticularis. Vylučování hydrokortizonu je řízeno adrenokortikotropním hormonem (ACTH), který je uvolňován lalokem hypofýzy. Vylučování ACTH je řízeno hypotalamickým peptidem kortikotropin. Centrální nervový systém tak řídí vylučování glukokortikoidů, což je názorný příklad úzké spolupráce mezi nervovým a endokrinním systémem. Hydrokortizon je také vylučován při stresu a při poklesu hladiny glukokortikoidů v krvi (Karlíková a kol., 2013).

Hydrokortizon byl syntetizován Wendlerem v roce 1950 (Melichar a kol., 1987). Přípravuje se selektivní mikrobiální hydroxylací jiného steroidního hormonu kortexolonu (tzv. Reihsteinova steroidu) v poloze 11 β pomocí hub rodu *Cunninghamella blakesleana*, jak je znázorněno na obr. 2. Esterifikace alkoholické skupiny v poloze 21 se provádí přes 21-halogenderivát, který reakcí s příslušnou solí kyseliny poskytne žádaný ester, nejčastěji octan nebo hydrogenjantarán (Melichar a kol., 1987).



Obr. 2: Příprava hydrokortizonu z kortexolonu selektivní mikrobiální hydroxylací v poloze 11β pomocí hub rodu *Cunninghamella blakesleana*.

Za den se vytvoří v lidském těle asi 25 mg hydrokortizonu. Většina (cca 80 %) hydrokortizonu v oběhu je vázána s vysokou afinitou na globulin vážící kortikosteroidy (transkortin). Biologicky aktivní frakce tvoří hydrokortizon slabě vázaný na albumin (cca 15 %) a hydrokortizon volný (cca 5 %). Více než 95 % metabolitů hydrokortizonu se v játrech konjuguje za vzniku glukuronidů nebo sulfátů a vylučuje se močí. Méně než 2 % hydrokortizonu se vylučuje močí v nezměněné podobě (Karlíková a kol., 2013).

Hlavní funkcí hydrokortizonu je zvyšování hladiny glukózy v krvi prostřednictvím glukoneogeneze, suprese imunitního systému a regulace metabolismu tuků, bílkovin a sacharidů. Stanovení hydrokortizonu se používá při diagnostice chorob spojených s nedostatečnou produkcí nebo nadprodukcí steroidních hormonů, např. Cushingova syndromu, nádorů nadledvin, Addisonovy choroby, deficitu ACTH (Karlíková a kol., 2013).

Hlavní účinky hydrokortizonu lze rozdělit do 3 kategorií, účinky na intermediární metabolismus, proteokatabolické účinky a protizánětlivé účinky (Trojan a kol., 2003).

Účinky na intermediární metabolismus se projevují v játrech a v tukové tkáni. V játrech hydrokortizon zvyšuje glukoneogenezu (tvorbu glukózy z necukerných substrátů) a potencuje účinek i jiných glukoneogenetických hormonů (glukagonu, katecholaminů). Zvyšuje tvorbu glykogenu (což závisí na přítomnosti inzulínu) a snižuje vychytávání glukózy ve svalech a v tuku – tím šetří glukózu vitálně nezbytnou pro mozek. Z homeostatického hlediska je významné, že nadbytek hydrokortizonu vede k hyperglykémii (tzv. steroidní diabetes, když dojde k vyčerpání B-buněk) a nedostatek hypoglykémii (pro zástavu glukoneogeneze). V tukové tkáni hydrokortizon zvyšuje lipolýzu (uvolnění mastných kyselin a glycerolu a jejich další využitování).

Proteokatabolické účinky se projevují tak, že v některých tkáních hydrokortizon inhibuje tvorbu proteinů a zrychluje jejich rozpad. To nastává zejména v pojivové tkáni (kůže se při nadbytku hydrokortizonu ztenčuje a rovněž vznikají strie – rozestupy povrchních vrstev kůže s obnažením vaskulárních hlubších vrstev – proto jsou rudé). Zvýšená hladina hydrokortizonu zpomaluje hojení ran a v kostech jeho nadbytek působí proti tvorbě mineralizace kostí.

Protizánětlivé účinky hydrokortizonu potlačují zánětlivé projevy, a to i při alergických reakcích. Přestože hydrokortizon nemá léčebné účinky (neléčí příčinu), je farmakologicky využíván při léčbě specifických zánětů (např. revmatoidní artritida).

1.2 Glukokortikoidy (kortikosteroidy)

Glukokortikoidy jsou neúčinnějšími protizánětlivými léky v terapii astmatu, potlačují bronchiální zánět a snižují hyperreaktivitu bronchů, zlepšují funkci plic, zmírňují příznaky a snižují četnost a závažnost onemocnění, a tím také zlepšují kvalitu života pacienta s astmatem. Jejich léčba je symptomatická, a proto by měly být lékem „pomocným“. V poslední době jsou k dispozici nejrůznější deriváty glukokortikoidů, které se jednak vyznačují odlišnou účinností (Hynie, 2001).

Glukokortikoidní látky nemají pouze pozitivní vlastnosti využitelné pro farmaceutický průmysl, jejich přítomnost v povrchových vodách může mít i negativní vliv na organismy žijící v tomto prostředí, a proto se jejich koncentrace musejí hlídat (Besse, Garric, 2008). Mohou mít také nežádoucí účinky na člověka. U inhalačních glukokortikoidů může dojít k většímu výskytu dysfonie (chrapot) a kašle z horních cest dýchacích. Celkové nežádoucí účinky se vyskytují po inhalačních kortikosteroidech jen vzácně pro špatnou vstřebatelnost používaných látek (Hynie, 2001).

1.3 Biologické hladiny hydrokortizonu v organismu

Sekrece hydrokortizonu se s věkem nemění. V těhotenství dochází v důsledku zvýšení koncentrace transkortinu k progresivnímu nárůstu hladin hydrokortizonu. V pokročilém stupni těhotenství jsou hladiny zvýšeny až 2,5x. Sekrece hydrokortizonu se výrazně mění během dne. Hladiny hydrokortizonu jsou regulovány ACTH syntetizovaným hypofýzou v odpovědi na CRH (hormon uvolňující kortikotropin). CRH je cyklicky vylučován hypotalamem, a tak koncentrace hydrokortizonu a ACTH v plazmě vykazují denní vrchol mezi 6. - 8. hodinou ránní a denní minimum kolem 23. hodiny. Typické hladiny celkového hydrokortizonu v séru

nebo plazmě jsou znázorněny v tab. I. Hladiny hydrokortizonu lze též stanovovat v moči, což je zobrazeno v tab. II. Moč je sbírána v průběhu 24 hodin (Karlíková a kol., 2013).

Tab. I: Typické hladiny celkového kortizolu v séru nebo plazmě (Karlíková a kol., 2013).

Vzorek (sérum nebo plazma)	Referenční interval (nmol/l)
Pupečnicková krev:	138 – 469
Jedinec: 0 - 2 roky	27,6 – 966
Jedinec: 2 - 6 let	27,6 – 1049
Jedinec: 6 - 11 let	55,2 – 690
Jedinec: 11 - 15 let	27,6 – 856
Dospělí – změny v průběhu dne:	
8:00 hod	138 – 635
16:00 hod	83 – 441
20:00 hod	< 50 % hodnoty pro 8:00 hod
Těhotné ženy na konci těhotenství	1500 ± 86

Tab. II: Typické hladiny volného hydrokortizonu v moči (Karlíková a kol., 2013).

Vzorek (moč)	Referenční interval (nmol/l)
1 - 10 let	6,0 – 74
11 - 20 let	14 – 152
Dospělí	55 – 248

Zvýšená hladina hydrokortizonu a nepřítomnost denního kolísání byly nalezeny u pacientů s Cushingovou chorobou a také u pacientů s nádory nadledvin. Nízké hladiny hydrokortizonu se nacházejí u primární nedostatečnosti nadledvin (Addisonova choroba, vrozená adrenální hyperplazie) a u deficitu ACTH. Vzhledem k tomu, že hladiny hydrokortizonu se mění v průběhu dne, může být rozlišení normální a abnormální nízké hladiny hydrokortizonu obtížné. Proto se provádějí různé testy umožňující hodnocení funkce osy hypofýzy nadledvin včetně inzulínem indukované hypoglykémie, stimulace ACTH, stimulace CRH a umělého zablokování syntézy hydrokortizonu. Množství hydrokortizonu v plazmě při vybraných onemocněních je znázorněno v tab. III (Karlíková a kol., 2013).

Tab. III: Množství hydrokortizonu v plazmě při vybraných onemocněních (Karlíková a kol., 2013).

Hydrokortizon v plazmě	
Zvýšený	Snížený
Cushingův syndrom	Sheehanův syndrom
Depresivní poruchy	Addisonova choroba
Hypoglykémie	Tuberkulóza
Obezita	Vrozená adrenální hyperplazie
Hypertyreóza	Cirhóza
Mentální anorexie	Hepatitis

Mezi nejčastější nemoci spojené s obsahem hydrokortizonu v lidském těle patří Cushingův syndrom, Addisonova choroba, vrozená adrenální hyperplazie a Sheehanův syndrom.

Cushingův syndrom je nemoc způsobená nadbytkem glukokortikoidů v organismu. Mezi typické projevy Cushingova syndromu patří výrazně centralizovaná obezita, resp. přibývání na hmotnosti bez zjevné příčiny, měsícovitý obličej, kožní změny zejména ve smyslu purpurových strií a snadné tvorby hematomů, poruchy menstruace u žen ve fertilním věku, rozvoj osteoporózy, bolesti svalů a svalová slabost, změny psychické, atd. (Ďurovcová a kol., 2009).

Addisonova choroba je poměrně vzácné onemocnění způsobené sníženou funkcí kůry nadledvin, nejčastěji v důsledku poškození autoimunitním procesem. V klinickém obraze dominují únava, nevykonnost, nechutenství, bolesti břicha, zvracení, hubnutí, atd. K dramatickému zhoršení klinického stavu až k ohrožení života dochází typicky v zátěžových situacích, kdy stoupá potřeba hydrokortizonu (Chval, 2005).

Vrozená adrenální hyperplazie je heterogenní soubor onemocnění kůry nadledvin. Příčinou jsou deficity v enzymovém vybavení adrenální kůry, většinou jde o mutace genu, nejčastěji CYP 21c (gen pro 21-hydroxylázu). Uvádí se, že deficit 21-hydroxylázy se vyskytuje ve středoevropské populaci v počtu 1 postižené dítě na 10000 až 12000 novorozenců. V zemích provádějících novorozenecký screening je frekvence výskytu častější (Lisá, 2001).

Sheehanův syndrom neboli hypopituitarismus znamená snížení funkce hypofýzy, zejména předního laloku. Může být způsoben několika mechanismy. Jedním z nich je

poškození hypofýzy tumorem mozku, kdy tumor utlačuje hypofýzu. Další možností je přímo tumor hypofýzy vycházející z buněk vlastní hypofýzy, který svojí velikostí a tlakem poškodí zbytek zdravé tkáně a poškodí její funkci. Poškození může vzniknout i při poranění hlavy, krvácení nebo na podkladě poporodního odumření hypofýzy u mladých žen s komplikovaným porodem (Budíková, 2004).

1.4 Farmakologické použití hydrokortizonu

Hydrokortizon má poměrně vysoký mineralokortikoidní účinek (Melichar a kol., 1987). Mineralokortikoidní účinek znamená, že se jedná o hormony, které ovlivňují metabolismus minerálů v těle. Řídí především udržování normální hladiny sodíku a draslíku v krevní plazmě a objemu extracelulární tekutiny (Trojan a kol., 2003).

Použití hydrokortizonu je velmi široké zvláště v terapii zánětlivých a alergických onemocnění, např. při akutních a chronických artritidách, Addisonově chorobě, stavech po hepatitidě a řadě dalších nemocí. U nás se vyrábí *Hydrocortison Spofa tablety* s obsahem 20 mg hydrokortizonu v tabletě, dále *Hydrocortison Spofa suspense* pro inj. obsahující 125 mg hydrokortizonacetátu v 5 ml mikrokrytalické suspence a *Hydrocortison Spofa solubile* s obsahem 133,7 mg sodné soli hydrokortizonsukcinátu (= 100 mg hydrokortizonu) v 1 lahvičce po 10 ml (Melichar a kol., 1987).

V dermatologii se používá při léčení různých ekzémů mast *Hydrocortison M Spofa* s obsahem 50 mg nebo 100 mg mikrokrytalického hydrokortizonacetátu v 10 g masti. *Ophthalmo-Hydrocortison Spofa ung.* obsahuje 25 mg mikrokrytalického hydrokortizonacetátu v 5 g masti. Používá se jí při alergických zánětech spojivky a rohovky a rovněž při nosních a ušních alergózách (Melichar a kol., 1987).

1.5 Hydrokortizon v přírodním vodním prostředí

Ve vodním prostředí je přítomno mnoho lidských léčiv. Je velmi obtížné s určitostí zjistit, které z nich by mohly představovat hrozbu pro vodní organismy a které nezpůsobují žádné znepokojení ohledně životního prostředí. Proto je obtížné navrhnout výzkumnou strategii, která nejefektivněji maximalizuje možnost identifikace těchto léčiv představujících největší riziko. Runnalls a kol. (2010) analyzovali komplexní britské databáze zahrnující všechny předpisy léčiv určující roční využití všech steroidních a anti-steroidních léčiv. Zjistili, že gestageny i glukokortikoidy se používají v mnohem větším množství než estrogy, přičemž androgeny jsou používány v obdobných množstvích jako estrogy. Velmi důležité je

také používání anti-estrogenů, anti-androgenů a anti-mineralokortikoidů. U všech těchto léčiv je pravděpodobnost neustálého vstupu do vodního prostředí z čističek odpadních vod, přičemž předpokládaná koncentrace těchto léčiv v řekách je velmi nízká (v rozsahu ng/l nebo méně). Nicméně i tyto nízké koncentrace stále představují hrozbu pro vodní organismy, zejména pro ryby (Runnalls a kol., 2010). Jiní autoři také využili predikce koncentrace hydrokortizonu ve vodách z analýzy množství předepsaných farmak (Richardson, Bowron, 1985; Kostik, Lazorchak, 2008). V důsledku velmi malých množství nejsou k dispozici údaje o skutečných koncentracích v přírodních vodách (Boreen a kol., 2003). Stejně tak se literatura dosud nezabývá chemickou reaktivitou v přírodních vodních podmínkách a možnostmi degradace hydrokortizonu.

Ve studii Ellis a kol. (2004) byla studována koncentrace hydrokortizonu ve vodním prostředí uvolňovaného ze pstruhů právě při stresu ve srovnání s původní koncentrací obsaženou ve vodě, kde se pstruzi vyskytovali. Původní koncentrace ve vodním prostředí byla $2,7 \pm 0,3$ ng/l (Ellis a kol., 2004). Měření hladiny hydrokortizonu ve vodě se může ukázat jako užitečný ukazatel hladiny stresu, což bylo zjištěno i u kapra (*Cyprinus carpio*) žijícího v tancích. Po přidání velkého množství kaprů do nádrže došlo k nárůstu stresu, a tím se zvýšila i hladina hydrokortizonu (Ruane, Komen, 2003).

Vzhledem k neustálému vstupu farmakologických přípravků včetně hydrokortizonu do přírodních vod je účelné se zabývat modelovými mechanismy, které mohou přispívat k jejich transformaci v přírodním prostředí. Jedním z významných mechanismů jsou světlem iniciované přeměny, fotochemické reakce.

Hydrokortizon absorbuje záření v oblasti vlnových délek v rozmezí 220 - 275 nm, a proto přímá fotochemická reakce v přírodním prostředí (v přírodních vodách) není možná, protože hydrokortizon neabsorbuje sluneční záření dopadající na zemský povrch. Je ovšem účelné prozkoumat, zda změna absorpčního spektra po interakci např. s Fe (nejhojnějším kovem v povrchových přírodních vodách v našich podmínkách) či fotokatalytické účinky kovů mohou mít vliv na odbourání tohoto hormonu. Heterogenní fotokatalýza na polovodičích (např. TiO_2) může jednak do jisté míry modelovat podmínky na jílovitých mikročásticích v přírodních vodách, jednak vypovědět o možném způsobu odbourávání v odpadních vodách.

1.6 Homogenní fotokatalytická degradace

U homogenní fotokatalytické degradace je katalyzátor ve stejné fázi jako ostatní látky účastníci se reakce. Světlo u homogenní fotokatalytické degradace produkuje katalyticky

aktivní formy katalyzátoru, obvykle redukovanou formu daného kovu - např. Cu^{2+} nebo Fe^{3+} (Klementová, 2012), která vykazuje mnohem vyšší katalytickou aktivitu.

První reakcí při homogenní katalýze je fotochemická redukce katalyzátoru v přítomnosti donoru elektronu (obvykle organické látky, s níž je kov vázán v komplexu). Proces je shrnut v rovnici 1.



Druhou reakcí je pak vlastní katalyzovaná reakce substrátu, obvykle oxidace substrátu kyslíkem - rovnice 2.



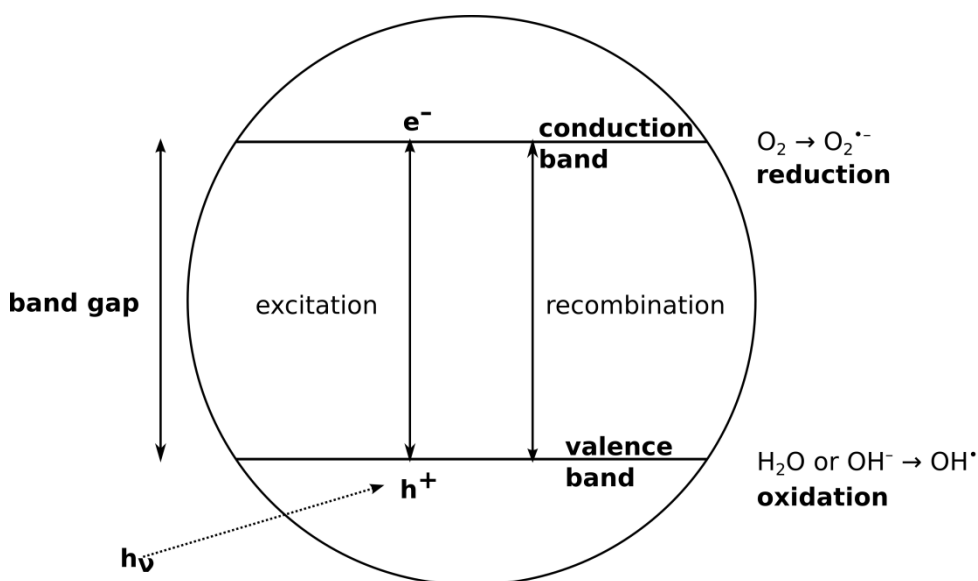
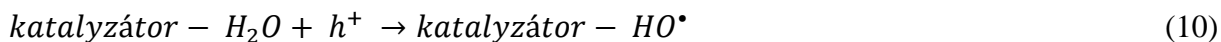
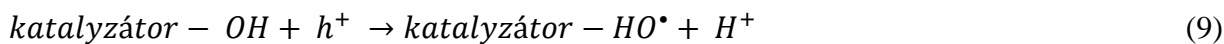
Tato následná katalytická reakce substrátu je tzv. *temná reakce* (dark reaction) - reakce nevyžadující světlo, kdy substrát vzniká i po skončení ozáření (Klementová, Wagnerová 1994).

1.7 Heterogenní fotokatalytická degradace

Heterogenní fotokatalytická degradace je metoda, při které dochází k fotochemickým reakcím na polovodiči, který je v pevném skupenství. Proces má několik fází: přenos kapalné či plynné fáze reaktantu difuzí na povrch katalyzátoru, adsorpce reaktantu na povrch katalyzátoru, reakce adsorbovaných molekul, desorpce produktů a odstranění produktů z oblasti povrchu katalyzátoru difuzí (Moore, 1979).

K aktivaci polovodiče dochází, jestliže ho ozáříme světlem o energii větší, než je energie tzv. zakázaného pásu polovodiče – v angličtině band gap energy – tedy energetické bariéry mezi pásem posledních obsazených molekulových orbitalů (HOMO – highest occupied molecular orbitals) a pásem vodivostním s prázdnými molekulovými orbitaly (LUMO – lowest unoccupied molecular orbitals).

Energie zakázaného pásu TiO_2 je cca 3,2 V, k aktivaci tohoto polovodiče je tedy nutné záření o vlnové délce kratší než 387 nm. Při aktivaci polovodiče dochází k excitaci elektronů (e^-) z valenčního pásu do vodivostního pásu polovodiče a ke vzniku kladně nabitých děr (h^+) ve valenčním páse (Fenoll a kol., 2012). Elektrony mohou redukovat přímo daný substrát nebo O_2 přítomný v reakční směsi na superoxidový anionradikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Díry mohou oxidovat organický substrát přímo, nebo nepřímo přes oxidaci vody či hydroxylových skupin na radikál HO^\bullet (Konstantinou, Albanis, 2003). Celý proces je znázorněn na obr. 3 (Klementová, 2012) a shrnut v reakcích 3 – 10 (Konstantinou, Albanis, 2003; Fenoll a kol., 2012):



Obr. 3: Schéma oxidace produktů během ozařování - aktivace polovodiče (Klementová, 2012).

Vznikající částice HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet -}$, HO_2^{\bullet} jsou vysoce reaktivní a jsou zodpovědné za oxidaci organických substrátů při heterogenní fotokatalytické degradaci. Předpokládá se, že oxidace organických molekul probíhá pravděpodobně přes tyto radikály, než přímo pomocí h^+ (Bianchi a kol., 2006).

Nejběžněji používaným katalyzátorem je TiO_2 (Pelizzetti a kol. 1990; Linsebigler a kol., 1995; Penuela, Barceló, 2000; Héquet a kol., 2001; Konstantinou a kol. 2001a; Hashimoto a kol., 2005) (forma anatas), jehož největšími výhodami je značná efektivita, stabilita vůči korozi, netoxicita a poměrně nízká pořizovací cena (Konstantinou, Albanis, 2003). Dalšími sloučeninami, které je možné využít jako katalyzátor, jsou ZnO (Byrappa a kol.

2006), CeO₂ (Yongging a kol., 2007), ZrO₂ (Botta a kol., 1999), WO₃ (Guo a kol., 2007) a mnoho dalších látek (Dunliang a kol., 2009).

Hájková a kol. (2007) se zabývali možnostmi fotochemického rozkladu steroidních hormonů jako biologicky aktivních kontaminantů životního prostředí. Hormon hydrokortizon jako zástupce steroidních hormonů v experimentu fotokatalyticky rozkládali pomocí tenkých vrstev TiO₂ připravených různými postupy depozice. Výsledky Hájkové a kol. (2007) ukazují, že při dlouhém ozařování (20 hodin) bez přítomnosti TiO₂ světlem výbojky Philips TLD 15W dojde k poklesu koncentrace hydrokortizonu na cca 70 % původní hodnoty. Tento výsledek je možné interpretovat tak, že ačkoli daná lampa emituje maximum záření u 365 nm, jsou v emitovaném záření obsaženy i kratší vlnové délky, které mohou být hydrokortizonem pohlcovány. Když ale byl hydrokortizon ozářen uvedenou lampou v roztoku, který byl ve styku s tenkým filmem TiO₂, záleželo velice na tom, o jaký film se jednalo.

Aktivní struktura TiO₂ byla struktura anatasu, což je termodynamicky nestabilní krystalová struktura TiO₂, která při zahřátí nad 500 °C přechází na rutil (Procházka, 2012).

Fotokatalytickou degradaci v homogenním i v heterogenním uspořádání lze popsat kinetikou prvního řádu. V obou případech se jedná vlastně o reakci pseudoprvního řádu, kdy u homogenního uspořádání předpokládáme, že rozpuštěný kyslík je v nadbytku k reagujícímu substrátu (Klementová, Wagnerová, 1994), u heterogenního uspořádání s polovodičem pak jsou v nadbytku hydroxylové radikály jakožto hlavní oxidační komponenta reakčního systému (Yang a kol., 2012).

Kinetika prvního řádu popisuje změnu koncentrace substrátu (S) s časem dle rovnice 11.

$$[S]_t = [S]_0 \cdot e^{-kt} \quad (11)$$

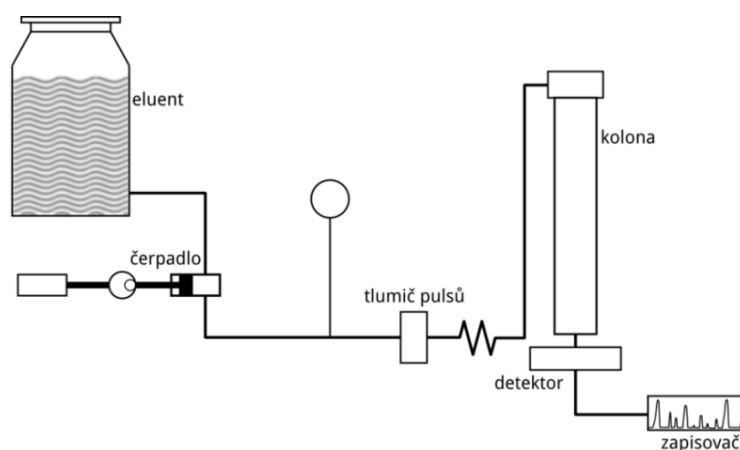
kde $[S]_t$ je koncentrace odbourávané látky (substrátu) v čase t, $[S]_0$ je počáteční koncentrace odbourávané látky (substrátu) a k je rychlostní konstanta.

1.8 Analytické techniky HPLC-MS, ICP-MS

Pro stanovování organických látek a produktů jejich chemických přeměn zejména v malých koncentracích patří vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (HPLC-MS). Metoda hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) se od svého zavedení v 80. letech minulého století rozvinula

tak, že lze stanovovat většinu prvků periodické tabulky (Profröck, Prange, 2012) a velmi často se kombinuje s chromatografickými technikami.

Všechny chromatografické separační metody jsou založeny na rovnovážné distribuci složek vzorku mezi dvě fáze - mobilní a stacionární. Mobilní fáze u HPLC je kapalná, vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla a odtud přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Kolona bývá obvykle vyrobena z nerez oceli či speciálního skla a bezprostředně za ni je připojen detektor. Schéma HPLC je uvedeno na obr. 4. V HPLC se běžně pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze v rozsahu od 0,1 do 10 ml/min. Jednou z možností dávkování vzorků u HPLC je nástřik mikrostříkačkou pomocí tzv. "stop flow" ventilu, který umožní krátkodobé rozpojení systému čerpadlo – kolona, po nástřiku dojde opět k propojení těchto částí systému. Pro HPLC se používají rovné kolony o délce nejčastěji 10 – 20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. U přírodních vzorků se často před vlastní kolonu zařazuje ochranná předklonka (kvůli ochraně kolony). Velikost zrn sorbentu v koloně se pohybuje nejčastěji mezi 5 – 10 μm (Drbal, Křížek, 1999).

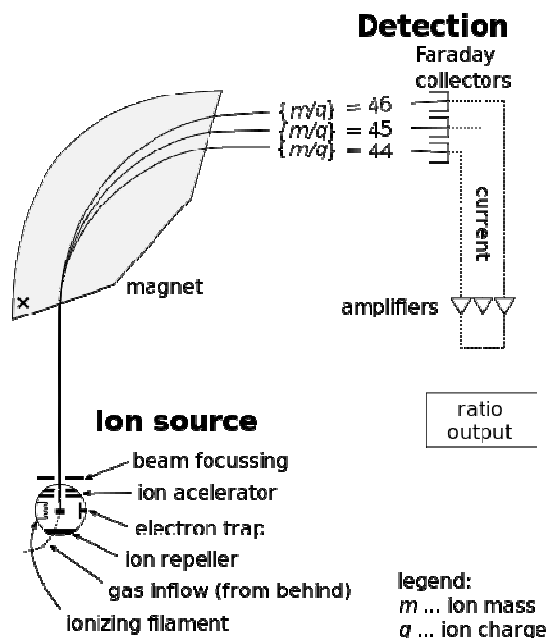


Obr. 4: Schéma HPLC.

Základním předpokladem úspěšného spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je účinné odstranění složek mobilní fáze před vlastní ionizací. K tomuto účelu byla vyvinuta specializovaná zařízení, tzv. rozhraní s pohybuícím se kovovým páskem (moving belt interface) (Jelínek, 2006).

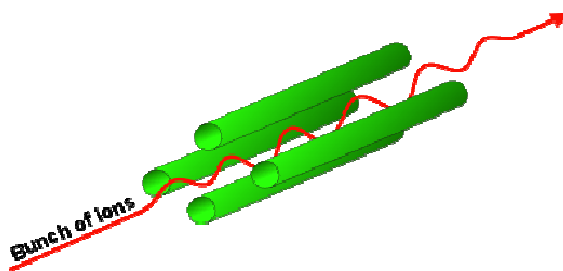
Hmotnostní analyzátor u HPLC-MS je tvořen ze tří složek: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Ionizátor převádí část vzorku na ionty. K dispozici je široká škála ionizačních technik v závislosti na fázi vzorku (pevná, plynná, kapalná) a účinnosti různých ionizačních mechanismů pro neznámé druhy. Odsáváním dochází k odstraňování iontů ze vzorku, které se přes hmotnostní analyzátor dostávají do detektoru.

Rozdíly v hmotnostech fragmentů umožňují hmotnostnímu analyzátoru třídit ionty na základě poměru m/z (hmotnost/náboj). Detektor měří hodnotu množství indikátoru, a tak poskytuje data pro výpočet nadbytku každého přítomného iontu (Wikipedia2). Popsaný HPLC-MS je znázorněn na obr. 5 (Wikipedia2).



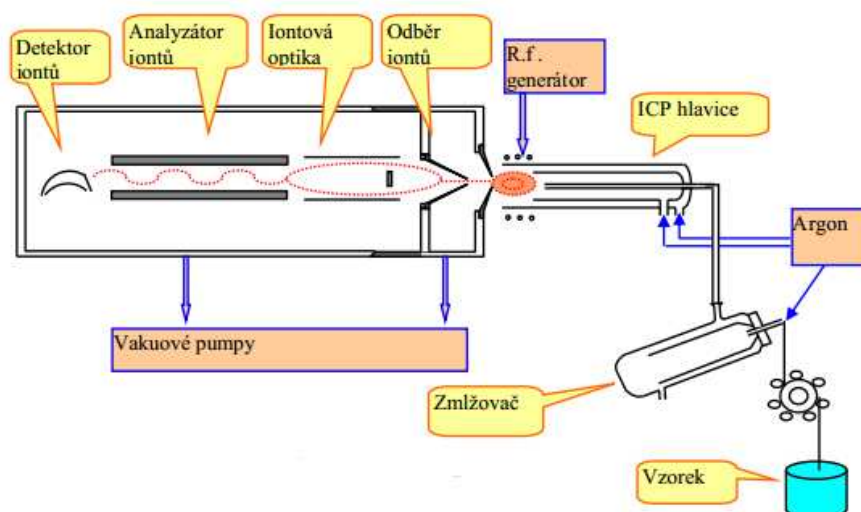
Obr. 5: Schéma HPLC-MS (Wikipedia2).

Konkrétní volba hmotnostního analyzátoru se řídí především požadovaným hmotnostním rozsahem, rozlišením a samozřejmě též hlediskem pořizovacích a provozních nákladů. V oblasti komerční instrumentace HPLC-MS je v současnosti stále ještě nejběžnější použití kvadrupólových hmotnostních analyzátorů. Kvadrupól se skládá ze čtyř paralelních kovových tyčí, kdy každá dvojice protilehlých tyčí je dohromady spojena elektricky a napětí radiové frekvence (RF) je přivedeno mezi jedním a dalším párem tyčí. Stejnoseměrné napětí je překryto RF napětím a ionty cestují po kvadrupólu mezi tyčemi. Pouze ionty s určitým poměrem m/z dosáhnou detektoru pro daný poměr napětí: jiné ionty mají nestabilní trajektorii a kolidují s tyčí. To umožňuje výběr iontu s určitým poměrem m/z nebo obsluhu skenování pro rozsah m/z hodnot tím, že se neustále mění aplikované napětí (Wikipedia3). Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je na obr. 6 (Wikipedia3).



Obr. 6: Kvadrupolový hmotnostní analyzátor (Wikipedia3).

Systém ICP-MS je tvořen zařízením ke zmlžování vzorků, hlavicí, v níž se tvoří plazma, iontovým filtrem a detektorem. Schéma ICP-MS je zachyceno na obr. 7 (Mestek, 2010).



Obr. 7: Schéma ICP-MS (Mestek, 2010).

Tvorba aerosolu je zajištěna zmlžovačem. Vznik aerosolu je způsoben kinetickou energií pracovního plynu (argonu) vytékajícího z trysky rychlostí podstatně vyšší než je rychlost proudění kapaliny, která je k jejímu ústí transportována buď nuceně, nebo přímo sacím efektem plynové trysky. Aerosol, který ve zmlžovači vzniká, má širokou distribuci velikosti částic a obsahuje vysoký podíl částic s příliš vysokým průměrem.

Vlastní plazmová hlavice je tvořena dvěma koncentrickými křemennými trubicemi. Osou hořáku prochází korundový nebo křemenný injektor, do kterého je přiváděn aerosol vzorku. Vnější křemennou trubicí proudí argon o průtoku 10 – 20 l/min, jeho funkcí je chránit stěny trubice a je hlavním zdrojem argonu pro plazma. Průtok argonu vnitřní křemennou trubicí je 0,5 – 1,5 l/min a jeho úkolem je chránit špičku injektoru před horkým plazmatem. Energie je do plazmatu předávána prostřednictvím vysokofrekvenčního elektromagnetického

pole vytvářeného závity indukční cívky. Cívka má tři až pět dutých měděných závitů chlazených průtokem vody nebo argonu (Mestek, 2010).

Odběr iontů z plazmového výboje pracujícího za atmosférického tlaku do vakuové části hmotnostního spektrometru je nejkritičtější částí přístroje ICP-MS. Plazma expanduje z atmosféry skrz otvor prvního kónusu (sampleru) do oblasti s tlakem dosahujícím řádově stovky pascalů. Tohoto vakua je dosaženo pomocí mechanické pumpy. Centrální oblast toku iontů prochází otvorem druhého kónusu (skimmeru) do vlastního hmotnostního spektrometru a vytvoří iontový paprsek. Materiál, ze kterého jsou vstupní kónusy vyrobeny, musí mít vysokou tepelnou a elektrickou vodivost, obvykle se jedná o nikl.

Po vstupu do vakuové části přístroje ICP-MS je iontový paprsek usměrněn pomocí iontové optiky do iontového filtru. Iontová optika se skládá z fotonové zarážky, která zabrání fotonům emitovaným z plazmatu vstup na detektor, který je na dopad fotonů také citlivý, a z iontové čočky. Čočka je tvořena jednou nebo více elektrodami ve tvaru dutého válce. Elektrické pole elektrod vychyluje dráhu iontů a do iontového filtru přivádí ionty s úzkým rozdělením kinetické energie. Potenciál iontové čočky ovlivňuje citlivost stanovení a měl by být optimalizován pro každou skupinu analytů s podobnou atomovou hmotností. Ve většině přístrojů ICP-MS je jako iontový filtr (analyzátor iontů) zabudován kvadrupólový analyzátor (Mestek, 2010).

2 MATERIÁL A METODY

Hydrokortizon v čistotě $\leq 98\%$ byl zakoupen od firmy Sigma. Zásobní roztoky hydrokortizonu byly připraveny rozpuštěním 5,9 mg v 200 ml a 5,6 mg v 200 ml a ponechány při pokojové teplotě 7 dní, aby vytvořily nasycený roztok.

Rozpouštědla: methanol v čistotě pro HPLC zakoupen od firmy Merck, acetonitril v čistotě pro HPLC zakoupen od firmy PENTA, deionizovaná ultračistá voda (deionizace přístrojem ULTRAPUR 10, WATREX), kyselina chlorovodíková v čistotě p.a. zakoupena od firmy Fisher Scientific (výrobce PENTA), Fe^{3+} v čistotě p.a. zakoupeném od firmy Fisher Scientific (výrobce PENTA), kyselina mravenčí v čistotě pro HPLC-MS zakoupena od firmy Sigma-Aldrich, methanol v čistotě pro HPCL-MS zakoupen od firmy Sigma-Aldrich.

K filtraci vzorků před ozáření byly použity filtry s póry 0,45 μm o průměru 25 mm, firmy MACHEREY-NAGEL (Chromafyl), před HPLC byly vzorky filtrovány přes filtry s póry 0,2 μm o průměru 13 mm, Nylon Membrane, Millex-GN, firmy MILLIPORE.

Roztok FeCl_3 byl připraven rozpuštěním 2,68 g Fe^{3+} v 100 ml 5 % HCl.

UV-VIS spektrum vzorků bylo měřeno UV-VIS spektrofotometrem Shimadzu UV-1601 se softwarem UV Probe.

HPLC analýza byla provedena pomocí vysokotlaké pumpy ConstaMetric 3200, UV detektoru Delta Chroma UVD 200 (Watrex) a kolony Phenomenex, Luna 5 μ C18, 250 x 4 mm. Mobilní fáze byla odplyněna pomocí ultrazvukové lázně Netz K2. Vzorky byly dávkovány mikrostříkačkou Hamilton po 20 μ l metodou přeplněné smyčky. Chromatografická data byla zpracována v programu ClarityLife.

HPLC-MS analýza byla provedena pomocí kolony Phenomenex, Luna 5 μ C18, 250 x 4 mm, jako iontový zdroj byl použit vyhřívaný elektrosprej (HESI II), pozitivní polarita, napětí na kapiláře 4000 V, teplota kapiláry iontového zdroje 350 °C, tlak zmlžujícího plynu 50 Arb, tlak pomocného plynu 25 Arb a teplota vstupní kapiláry do MS 350 °C. Do mobilní fáze methanol : voda v poměru 65 : 35 byla přidána kyselina mravenčí v množství 100 μ l/100 ml každého rozpouštědla.

ICP-MS analýza byla provedena na přístroji Agilent 8800 triple-quadrupole (ICP-MS/Agilent Technologies, Japan). Vnos vzorku byl zprostředkován autosamplermem. Pro zmlžování vzorku byl použit MicroMist zmlžovač v zapojení v tandemu s peristaltickou pumpou. Při měření byl pro minimalizaci interference ArO^+ použit kolizní mód s kolizním plynem He se zvýšeným potenciálním rozdílem v kolizní cele.

Fotochemická degradace byla uskutečněna ve dvou provedeních:

A) Ozařování na TiO_2 : Do krystalizační misky s plochým dnem o průměru 4 cm bylo napipetováno 5 ml vzorku, do misky byl vložen imobilizovaný TiO_2 – s tenkou vrstvou nanesenou na mikroskopovací podložní sklíčko (Klementová, Zlámal, 2013). Míchání vzorků v krystalizační misce po dobu ozařování bylo zajištěno pětimístnou magnetickou míchačkou JK IKA, typ RO 5. Jako zdroj světla byla použita fluorescenční lampa Philips TL-D 15W/08, která emituje záření o vlnových délkách 350 – 400 nm, s maximem u 365 nm. Intenzita světla byla 1,8 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ měřená pomocí Lutron UV light meter (UVA 365). Intenzita světla na jednotlivých pozicích byla srovnatelně vysoká (Keltnerová, 2014). Po skončení ozařování byly vzorky kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 10 ml, doplněny H_2O a přefiltrovány do lahvíček s těsným šroubovacím víčkem.

B) ozařování v homogenní fázi: vzorky (3 ml) byly ozařovány v reaktoru Rayonet osazeném lampami RPR-3000Å (21 W, $4\cdot 10^{17}$ fotonů za minutu) a přefiltrovány do lahvíček s těsným šroubovacím víčkem.

Množství fotonů dopadajících na kyvetu bylo zjištěno aktinometrií využívající šřavelanu železitého jako aktinometru. Chemikálie pro aktinometrii byly zakoupeny od firmy Sigma. Aktinometrie byla provedena podle Murov a kol. (1993) a je založena na reakci 12.



Množství železnatých iontů vzniklých během ozařování bylo změřeno spektrofotometrickým stanovením komplexu Fe^{2+} a 1,10-fenantrolinu při 510 nm. Pro aktinometrii byly připraveny následující roztoky:

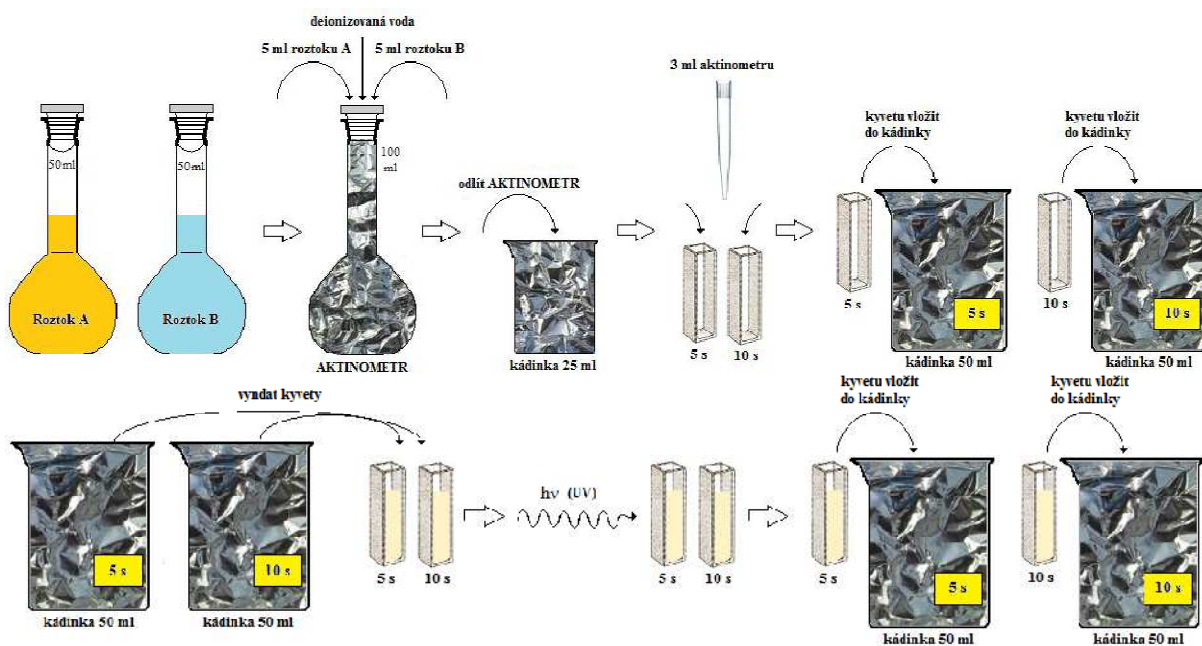
A) 0,2 M roztok $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ – bylo naváženo 5,09 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, navážené množství rozpuštěno v 20 ml deionizované vody, poté rozpuštěný $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky, přidáno 2,75 ml koncentrované H_2SO_4 a 0,15 g glycinu a odměrná baňka doplněna deionizovanou vodou na objem 50 ml.

B) 1,2 M roztok $\text{C}_2\text{K}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – bylo naváženo 12,14 g $\text{C}_2\text{K}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, navážené množství rozpuštěno v 20 ml deionizované vody a kvantitativně převedeno do 50 ml odměrné baňky doplněné deionizovanou vodou na objem 50 ml.

C) pufr – naváženo 6,81 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, navážené množství rozpuštěno v 20 ml deionizované vody, přidáno 0,5 ml koncentrované H_2SO_4 a vše kvantitativně převedeno do 50 ml odměrné baňky doplněné na objem 50 ml.

D) 0,2 % roztok fenantrolinu – naváženo 53,6 mg 1,10-fenantrolin monohydrátu do kádinky o objemu 25 ml, přidáno 25 ml deionizované vody a fenantrolin byl rozpuštěn na magnetické míchače.

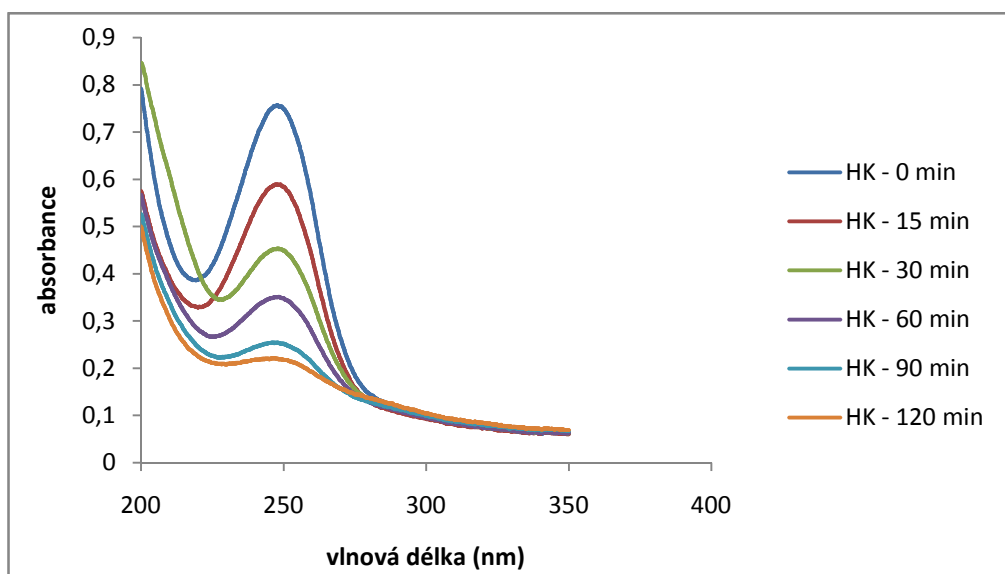
Po namíchání roztoků A až D došlo k přesunu do temné místnosti s červenou žárovkou a byl připraven aktinometrický roztok. Do 100 ml odměrné baňky obalené alobalem bylo přidáno 5 ml roztoku A a 5 ml roztoku B. Odměrná baňka byla doplněna deionizovanou vodou na objem 100 ml. Část aktinometrického roztoku byla odlila do 25 ml kádinky – také obalené alobalem. Z této kádinky bylo odebráno po 3 ml aktinometrického roztoku do dvou ozařovacích kyvet. Kyvety s aktinometrem byly umístěny do širokých 50 ml kádinek, také obalených alobalem, a následně ozařovány v reaktoru, který emitoval záření o vlnových délkách 300 – 400 nm, s maximem u 350 nm (Zemanová, 2008). Na obr. 8 je schéma postupu přípravy vzorků k měření a následné ozařování vzorků (Hořejší, 2015).



Obr. 8: Schéma postupu přípravy vzorků k měření a následné ozařování vzorků (Hořejší, 2015).

3 VÝSLEDKY

Odbourávání hydrokortizonu v přítomnosti imobilizovaného TiO_2 sledované jako pokles absorbance v maximu absorpce hydrokortizonu v závislosti na době ozařování je znázorněno na obr. 9. Z grafu je patrné, že ozáření hydrokortizonu blízkým UV zářením v přítomnosti TiO_2 vede k účinnému odbourání hydrokortizonu.



Obr. 9: Odbourávání hydrokortizonu na TiO_2 .

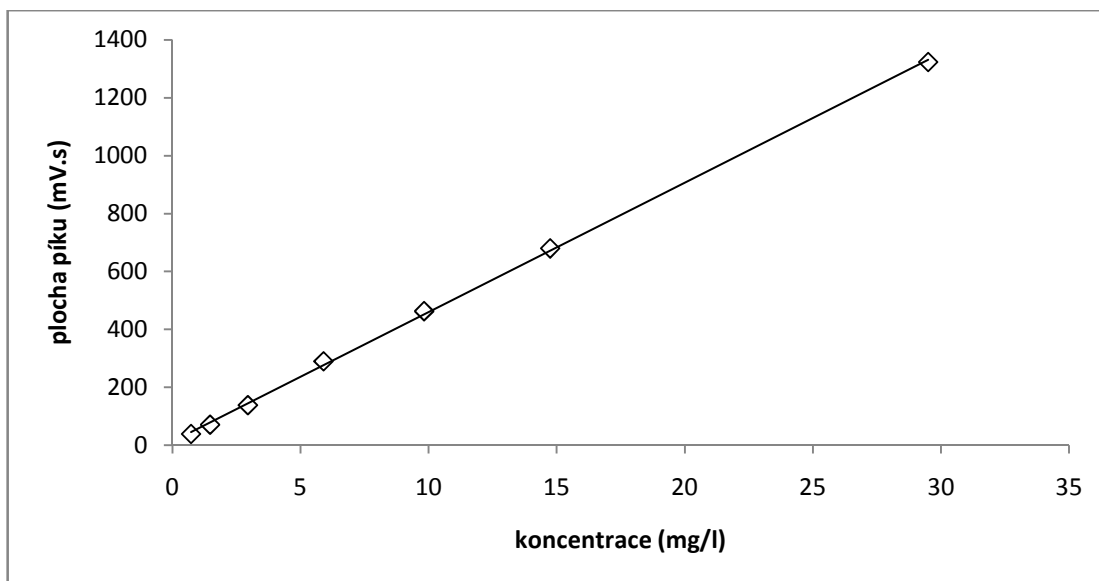
Aby bylo možné sledovat úbytek hydrokortizonu (a případně tvorbu produktů degradace) pomocí HPLC, bylo nejprve nutné najít vhodné eluční podmínky pro měření HPLC. Dle doporučené aplikace firmy Phenomenex Inc. byla vyzkoušena jako mobilní fáze směs acetonitril : voda v poměru 25 : 75 při vlnové délce $\lambda = 254$ nm a průtoku 2 ml/min. Protože při použití této aplikace nebyly na chromatogramu vůbec patrné produkty fotochemického odbourávání, byly zkušeny další mobilní fáze, různé vlnové délky detekce a průtok. Souhrn zkoušených podmínek je znázorněn v tab. IV.

Tab. IV: Parametry HPLC zkoušené pro detekci úbytku hydrokortizonu a vznikajících produktů.

Mobilní fáze	Poměr	Vlnová délka detekce (nm)	Průtok (ml/min)
acetonitril : voda	65 : 35	230	2
acetonitril : voda	70 : 30	230	2
acetonitril : voda	60 : 40	230, 210	2
acetonitril : voda	25 : 75	254	1,3
acetonitril : voda	25 : 75	209	2
acetonitril : voda	5 : 95	209	2
methanol : voda	65 : 35	230, 210	2
methanol : voda	65 : 35	254	1

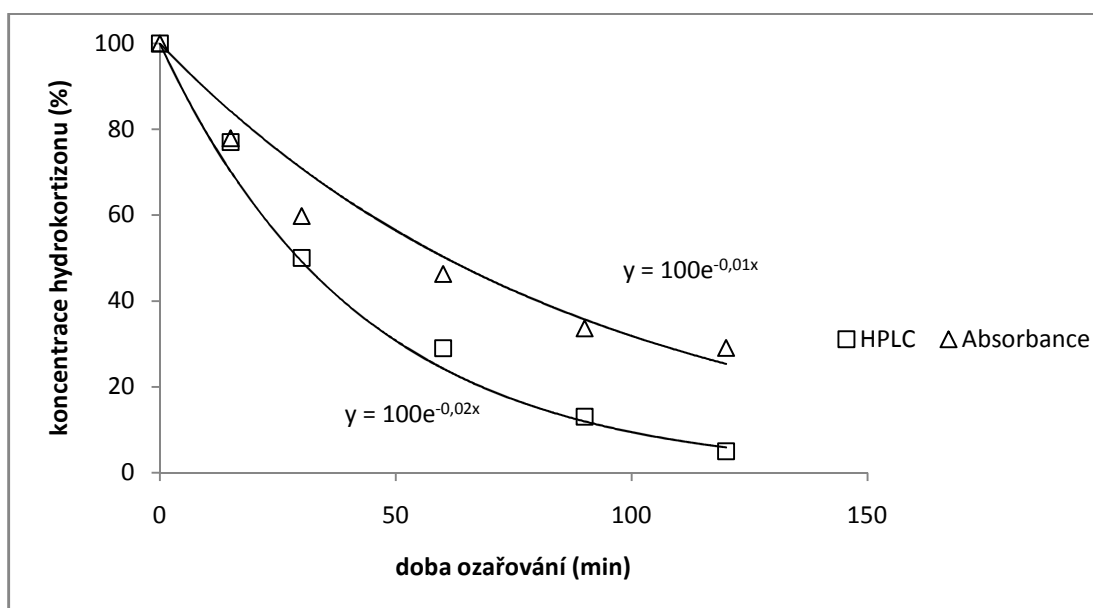
Nakonec byla jako mobilní fáze zvolena směs připravená z methanolu a deionizované ultračisté vody v poměru objemů 65 : 35, UV detektor nastaven na vlnovou délku 254 nm a průtoku 1 ml/min.

Kalibrační křivku HPLC stanovení hydrokortizonu znázorňuje obr. 10. Z grafu je patrné, že závislost naměřených hodnot ploch píků na koncentraci hydrokortizonu je lineární v měřeném rozsahu koncentrací.



Obr. 10: Kalibrační křivka roztoku hydrokortizonu.

Úbytek hydrokortizonu měřený jako úbytek absorbance v maximu absorpčního maxima a úbytek hydrokortizonu měřený pomocí HPLC je znázorněn na obr. 11.

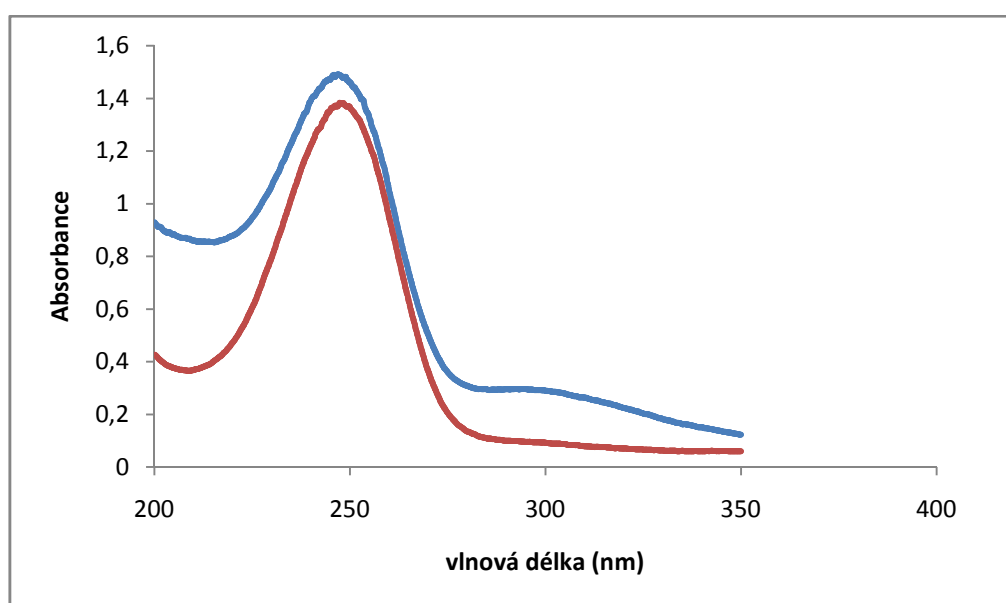


Obr. 11: Úbytek hydrokortizonu měřený jako úbytek absorbance a pomocí HPLC.

Experimentální body byly proloženy exponenciálními křivkami; rovnice pro úbytek hydrokortizonu měřený jako úbytek absorbance je $y = 100^{-0,01x}$ a rovnice pro úbytek hydrokortizonu sledovaný pomocí HPLC je $y = 100^{-0,02x}$. Rychlostní konstanty stanovené z jednotlivých křivek tedy činí $k_{(UV-VIS)} = 0,01 \text{ min}^{-1}$ a $k_{(HPLC)} = 0,02 \text{ min}^{-1}$.

Při experimentu s ozařováním v homogenní fázi bez TiO_2 jako fotokatalyzátoru byl roztok hydrokortizonu ozářen v přítomnosti Fe(III) – přidaného jako FeCl_3 – v molárním poměru hydrokortizon : Fe rovném 1 : 1. Emisní spektrum lamp v aparatuře je v rozsahu 250 – 350 nm, část spektra o vlnových délkách kratších než 300 nm byla odfiltrována tím, že ozáření bylo provedeno ve skleněných kyvetách, které propouštějí světlo o vlnové délce delší než 300 nm.

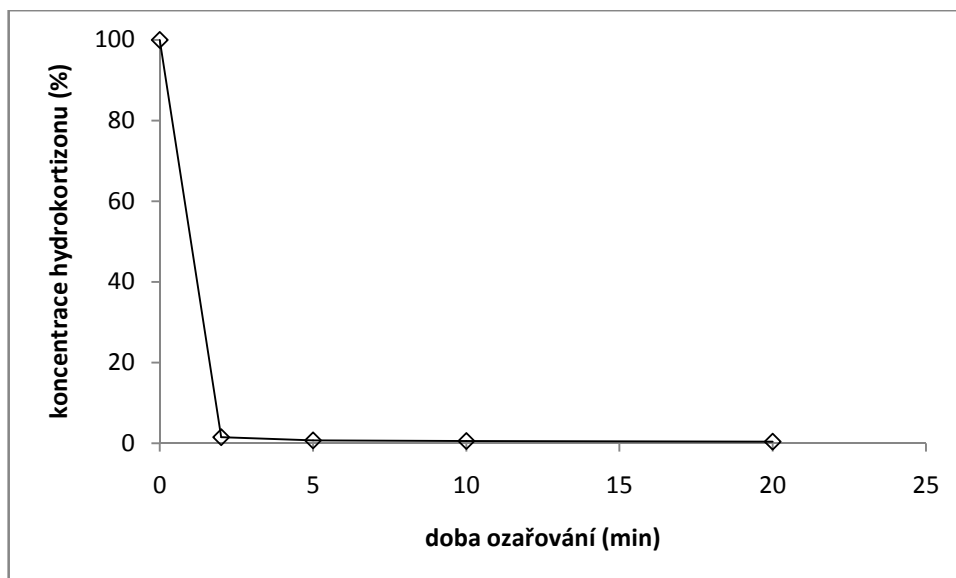
Na obr. 12 je znázorněno absorpční spektrum zásobního roztoku hydrokortizonu a roztoku hydrokortizonu s Fe(III) v uvedeném molárním poměru. Z obrázku je patrné, že železo tvoří s hydrokortizonem komplex, jehož absorpce zasahuje až do oblasti 350 nm.



Obr. 12: Absorpční spektrum roztoku hydrokortizonu a roztoku hydrokortizonu s Fe(III) v molárním poměru hydrokortizon : $\text{Fe} = 1 : 1$.

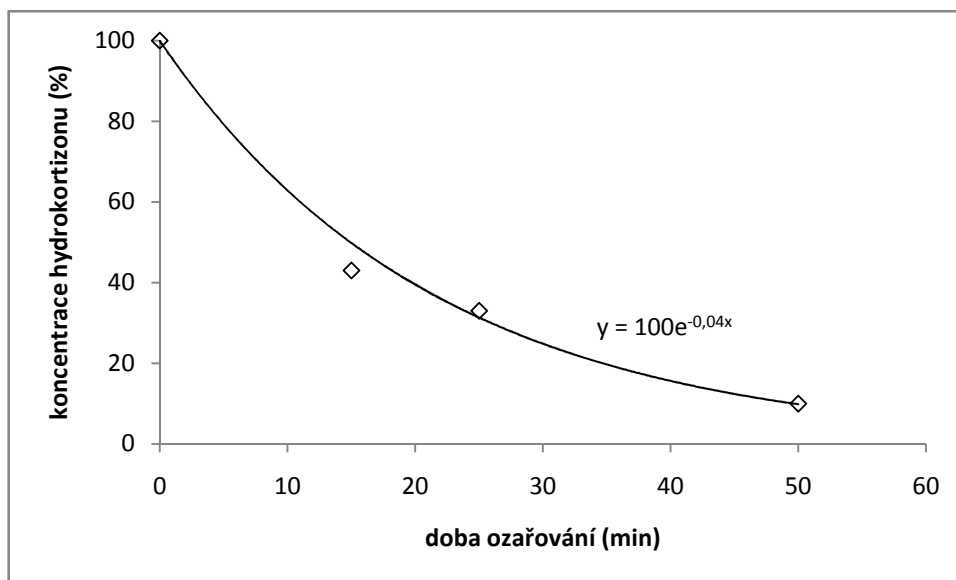
Při ozařování hydrokortizonu v přítomnosti Fe(III) v uvedené koncentraci došlo k úplnému odbourání hydrokortizonu už po 2 minutách ozařování. Tento jev je zobrazen v grafu na obr. 13.

Při desetinásobném snížení koncentrace Fe(III) proběhla reakce stejně rychle.



Obr. 13: Odbourávání hydrokortizonu v homogenní fázi bez přídavku Fe(III).

V následném experimentu nebylo k hydrokortizonu přidáno žádné železo, navíc veškeré použité sklo bylo před experimentem vymyto tak, aby bylo zbaveno co největšího množství stop Fe. Jak je patrné z obr. 14, reakce probíhala pomaleji, ale přesto za 50 minut ozařování došlo k odbourání téměř 90 procent hydrokortizonu.



Obr. 14: Odbourávání hydrokortizonu v homogenní fázi bez přídavku Fe(III).

Experimentální body byly proloženy exponenciální křivkou. Rovnice pro úbytek hydrokortizonu je $y = 100^{-0,04x}$, ze které byla určena rychlostní konstanta $k = 0,04 \text{ min}^{-1}$.

Následně byla proto stanovena koncentrace Fe v roztoku hydrokortizonu, v roztoku hydrokortizonu připraveného s použitím speciálně vymytého skla a zároveň ve vodě používané k ředění vzorků. Tyto koncentrace jsou uvedeny v tab. V.

Tab. V: Koncentrace Fe v roztoku hydrokortizonu a ve vodě používané k ředění vzorků.

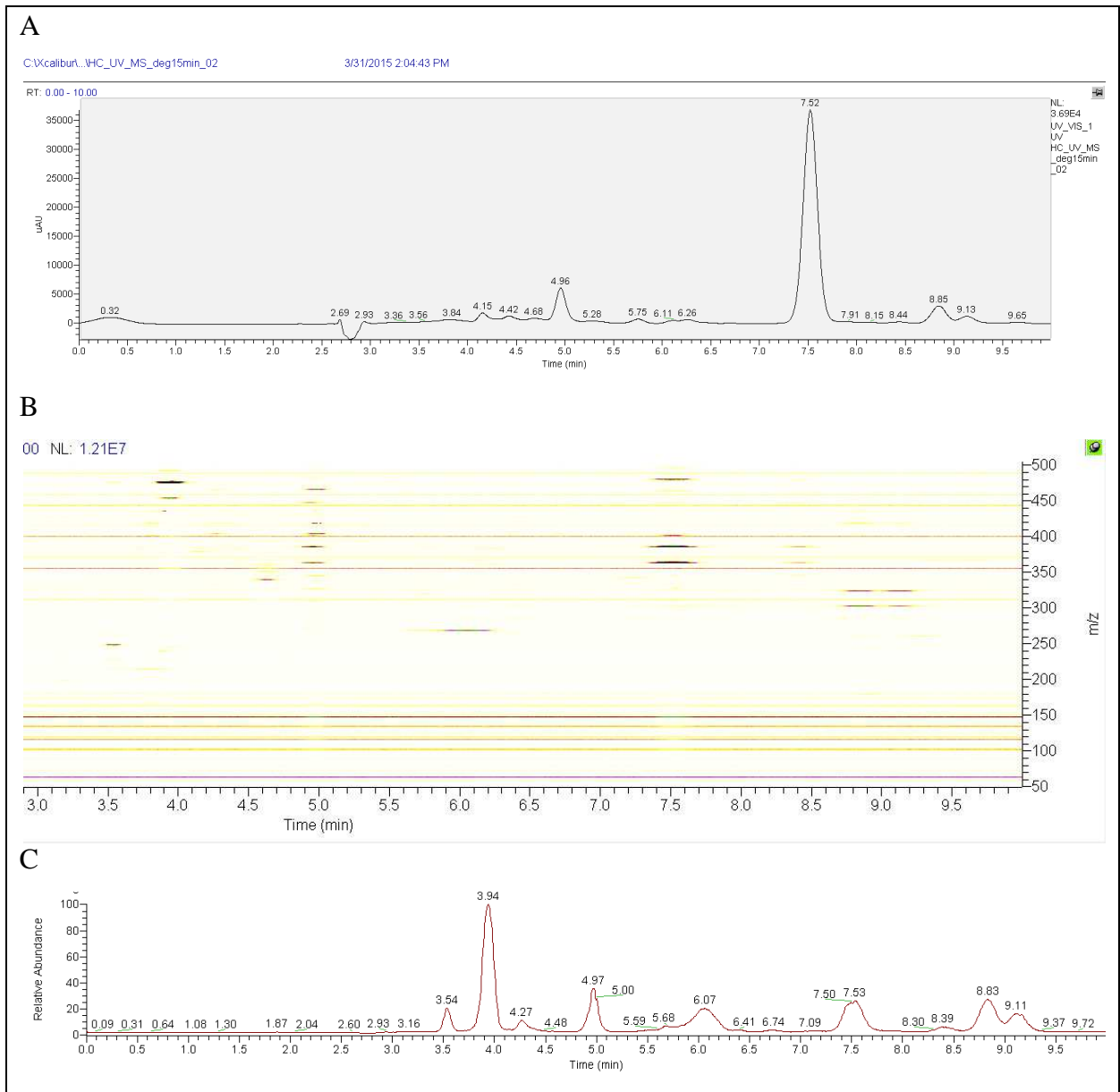
Vzorek	Obsah železa ($\mu\text{g/l}$)
Hydrokortizon – roztok v ultračisté vodě	6,6
Hydrokortizon – roztok v ultračisté vodě připravený ve speciálně vymytém skle	3,8
H ₂ O	0,6

Z tabulky vyplývá, že speciální vmytí skla sníží koncentraci stop železa na cca jednu polovinu. Nicméně stopy železa ve stovkách $\mu\text{g/l}$ obsahuje i ředicí voda, železo je obsaženo i v komerčně dodaném hydrokortizonu.

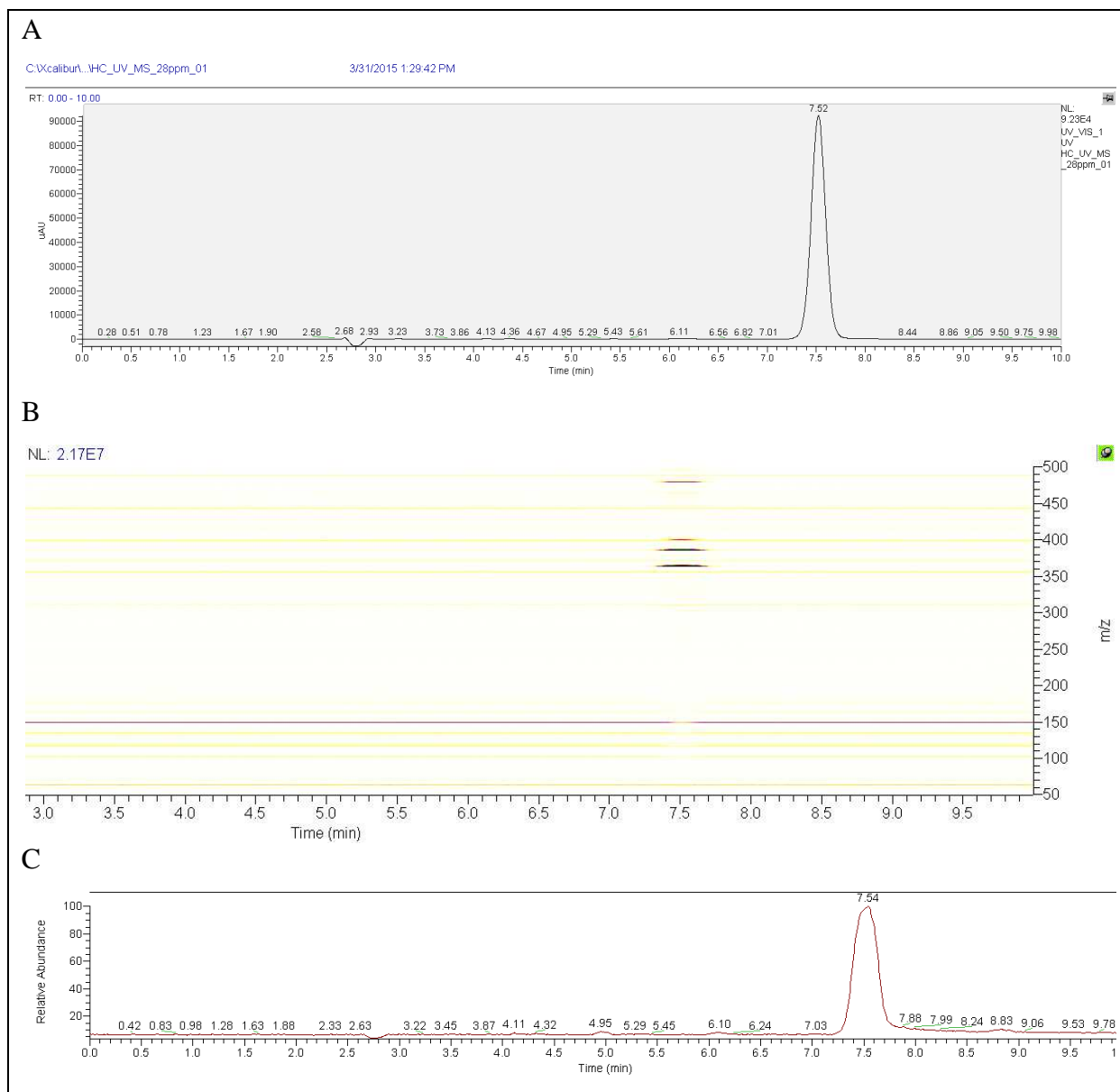
Vzhledem k tomu, že na kapalinovém chromatogramu nebyly ani u heterogenní ani u homogenní reakce výrazně patrné produkty, pouze u homogenní reakce byly vidět minoritní produkty u retenčních časů 4,96 a 4,15 min, byl proveden pokus o detekci produktů v uspořádání HPLC-MS. Pro analýzu HPLC-MS byl použit neozářený vzorek hydrokortizonu a 15 minut ozářený vzorek hydrokortizonu bez přídavku Fe(III).

Na obr. 15 je chromatogram reakční směsi po 15 minutách ozáření. V části A na obr. 15 je chromatogram jako absorbance na čase, zde je vidět menší pík u retenčního času 4,96 min a nepatrný pík u 4,15 min. V části B je MS spektrum pro poměr m/z v rozmezí 50 - 500 v závislosti na retenčním čase. Je zde vidět velké množství látek, některé z nich jsou adukty (vyšší poměr m/z než u hydrokortizonu), jiné jsou štěpy s menší hodnotou m/z . V části C je chromatogram s MS detekcí vybraných hmotností a to hmotností vyskytujících se v části B.

Na obr. 16 jsou pro srovnání znázorněny stejně pořízené chromatogramy roztoku hydrokortizonu před degradací.



Obr. 15: Chromatogram roztoku hydrokortizonu po 15 minutách ozáření.



Obr. 16: Chromatogramy roztoku hydrokortizonu před degradací.

Na obr. 16 v části A je vidět chromatogram jako závislost absorbance na retenčním čase. Zde je vidět pouze pík hydrokortizonu. V části B je MS spektrum pro poměr m/z pro rozmezí 50 – 500 v závislosti na retenčním čase (rozsah m/z byl vybrán stejně jako v předchozím případě, aby bylo možné provést srovnání). Zde je vidět (tloušťka čárky je úměrná intenzitě), že v retenčním čase hydrokortizonu je detekovatelný hydrokortizon (m/z 365), pak adukt se sodíkem a další dvě vyšší hmotnosti (resp. m/z); tloušťka čáry je opět úměrná intenzitě signálu, tedy množství molekul či štěpů o daném m/z . V části C je chromatogram vybraných hmotností (vybrány podle výsledku směsi po degradaci) – nalezen opět jen pík hydrokortizonu.

4 DISKUZE

Sledování množství hydrokortizonu (případně jeho derivátů) pomocí změny absorbance je velmi jednoduché a rychlé, proto bylo použito v některých pracích, například při sledování fotolytického rozkladu hydrokortizonu či derivátu hydrokortizonu, hydrokortizon 21-acetátu krátkovlnným UV zářením (Caffieri a kol., 2008) nebo pro sledování rozkladu hydrokortizonu účinkem plazmatu (Horáková a kol., 2014). Jak uvádějí Caffieri a kol. (2008), derivát hydrokortizonu podléhá fotochemickému rozkladu.

Z našich experimentů vyplývá, že sledování degradace hydrokortizonu pomocí UV-VIS spektra poskytuje zkreslené výsledky – rychlostní konstanta pro degradaci vychází dvakrát nižší než při sledování degradace pomocí HPLC - rychlostní konstanty těchto degradací činí $k_{(UV-VIS)} = 0,01 \text{ min}^{-1}$ a $k_{(HPLC)} = 0,02 \text{ min}^{-1}$. Na první pohled se zdá pravděpodobné vysvětlení, že při odbourávání vznikají produkty, které také absorbují v UV oblasti, a tedy zkreslují výsledek měření úbytku absorbance.

Rychlostní konstanty byly získány s použitím kinetiky prvního řádu, resp. pseudoprvního řádu. To je v souladu s literaturou (Klementová, Wagnerová, 1994; Yang a kol., 2012), kdy se předpokládá, že u homogenní katalýzy ve vodném roztoku nasyceném kyslíkem je kyslík v nadbytku k reagujícímu substrátu. U heterogenní katalýzy jsou pak v nadbytku hydroxylové radikály vznikající podle rovnic 8 – 10.

Uvažujeme-li přítomnost hydrokortizonu v přírodních vodách, kam se může dostávat z farmakologických produktů, je zjevné, že samotný hydrokortizon nemůže být fotochemicky odbouráván, protože neabsorbuje sluneční záření dopadající na zemský povrch (Baker a kol., 1980). V přírodních vodách se ale vyskytují kovy, které mohou s organickými látkami tvořit komplexy. Takovým kovem je zejména železo, které se v povrchových vodách vyskytuje v koncentracích - jednotek až desítek mg/l (Dojlido, Best, 1993) a to převážně ve formě Fe(III). Jak plyne z absorpčního spektra, železo tvoří s hydrokortizonem komplex, jehož absorpce zasahuje až do oblasti 350 nm. Světlo těchto vlnových délek již dopadá na zemský povrch (a tedy i na povrch vodních ploch), i když jen ve velmi malém množství - 1 až 3 % celkové sluneční intenzity (Dresbach, Brown, 2008). Komplex hydrokortizonu se železem může tedy absorbovat tuto malou část záření a podléhat fotochemické reakci. Mnohem pravděpodobnější ale je, že trojmocné železo v komplexu s hydrokortizonem je fotochemicky redukováno na dvojmocné, které pak katalyzuje oxidaci hydrokortizonu rozpuštěným kyslíkem. Jak plyne z výsledků této práce, je reakce v přítomnosti Fe(III) velmi rychlá a probíhá i tehdy, jsou-li přítomny jen stopy železa.

Heterogenní fotokatalýza na polovodičích je studována v souvislosti s přírodními vodami především jako metoda odstraňování polutantů dostávajících se činností člověka do podvodních vod (Hashimoto a kol., 2005). Pro odbourávání hydrokortizonu jde o metodu účinnou, ale rychlost odbourávání je dle výsledků této práce výrazně menší než v homogenní fotokatalytické reakci.

Z analýzy HPLC-MS je zřejmé, že fotochemickou degradací vzniká celá řada látek. Skutečnost, že nebyly vidět na chromatogramech HPLC analýz, kdy jako detektor byl použit UV detektor, může znamenat, že vznikající produkty mají velmi malou absorpční vlnovou délku v oblasti detekce. To je ovšem v rozporu s výsledkem sledování odbourávání hydrokortizonu pomocí absorpčních spekter, kdy celková rychlost reakce v porovnání s HPLC detekcí vycházela nižší a kdy se pro vysvětlení zdálo rozumné předpokládat, že je to důsledek produktů, které svou absorpcí v dané oblasti zkreslují velikost úbytku měřeného na UV spektru. Identifikace vznikajících produktů by mohla objasnit nejasnosti, ale jde o časově i finančně složitou záležitost, která nebyla záměrem této práce.

Z aktinometrického měření intenzity záření lze spočítat kvantový výtěžek Φ_{λ} hydrokortizonu. Kvantový výtěžek byl spočítán pro homogenní reakci (bez přídavku Fe) podle rovnice 13, jeho hodnota činí $6,839 \cdot 10^{-3}$.

$$\Phi_{\lambda} = \frac{\text{počet změn (počet zreagovaných, vytvořených molekul)}}{\text{počet absorbovaných fotonů v dané vlnové délce}} \quad (13)$$

Hodnota kvantového výtěžku je analogická hodnotě zjištěné pro jiné polutanty za podobných podmínek, např. pro chlorotoluron (Zemanová, 2008).

Nízký kvantový výtěžek není přímým potvrzením fotokatalytického mechanismu (fotochemické generace katalyzátoru, který pak následně katalyzuje oxidaci substrátu), ale to může být způsobeno tím, že v daných systémech dochází k rychlé reoxidaci fotochemicky zredukovaného kovu. Tato skutečnost nebyla experimentálně prokázána, protože ve stopových koncentracích železa není možné analyticky sledovat poměr redukované a oxidované formy kovu.

5 ZÁVĚR

Rychlostní konstanta odbourávání hydrokortizonu ve fotokatalytické reakci na TiO_2 je $k = 0,01 \text{ min}^{-1}$, rychlostní konstanta odbourávání v homogenním prostředí se stopami železa je $k = 0,02 \text{ min}^{-1}$. Kvantový výtěžek reakce v homogenním prostředí se stopami železa je $6,839 \cdot 10^{-3}$.

Fotokatalytická degradace v heterogenní fázi na polovodiči může být užitečnou metodou pro odstranění hydrokortizonu z případně kontaminovaných vod.

Fotochemické odbourávání se železem jako fotokatalyzátorem může představovat způsob, jak je hydrokortizon dostávající se do přírodních vod z farmakologických výrobků přeměňován v povrchových vodách.

6 LITERATURA

Baker K., Smith R. C., Green A. E., *Middle ultraviolet radiation reaching the ocean surface*, Photochem. Photobiol., 1980, **32**, str. 367-374.

Besse J. P., Garric J., *Human pharmaceuticals in surface waters Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation*, Toxicology Letters, 2008, **176**, str. 104–123. [online]. Staženo dne 2014_11_05 z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427407009915>.

Bianchi C. L., Pirola C., Ragaini V., Selli E., *Mechanism and efficiency of atrazine degradation under combined oxidation processes*, Appl. Catal. B-Environ, 2006, **64**, (1-2), str. 131-138.

Boreen A. L., Arnold W. A., McNeill K., *Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review*, Aquat. Sci., 2003, **65**, str. 320–341. [online]. Staženo dne 2015_03_25 z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00027-003-0672-7#page-1>.

Botta S. G., Navío J. A., Hidalgo M. C., Restrepo G. M., Litter M. J., *Photocatalytic properties of ZrO₂ and Fe/ZrO₂ semiconductors prepared by a sol-gel technique*, J. photochem. Photobiol. A: Chem., 1999, **129**, (1-2), str. 89-99.

Budíková M., *Sheenanův syndrom*, Med. Pro Praxi, Endokrinologická ambulance Ústí nad Labem, 2004, **2**, str. 109-110. [online]. Staženo dne 2014_10_18 z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2004/02/15.pdf>.

Byrappa K., Subrami A. K., Ananda S., Lokanatha Rai K. M., Dinesh R., Yoshimura M., *Photocatalytic degradation of rhodamine B dye using hydrothermally synthesized ZnO*, Bull. Mater. Sci., 2006, **29**, (5), str. 433-438.

Caffieri S., Dall'Acqua S., Castagliuolo I., Brun P., Miolo G., *UVB photolysis of hydrocortisone 21-acetate*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, **47**, str. 771-777.

Dojlido J. R., Best G. A., *Chemistry of Water and Water Pollution*, Ellis Horwood Limited, 1993, Chichester, England.

Drbal K., Křížek M., *Kapalinová chromatografie*, V: „Analytická chemie“, Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích, 1999, str. 168-171.

Dresbach S. H., Brown W., *Ultraviolet Radiation*, Fact Sheet, The Ohio State University, 2008, str. 1-4. [online]. Staženo dne 2015_04_15 z: <http://ohioline.osu.edu/cd-fact/pdf/0199.pdf>.

Dunliang Jian, Pu-Xian Gao, Wenjie Cai, Bamidele S. Allimi, Pamir Alpi S., Yong Ding, Zhong Lin Wang, Brooks C., *Synthesis, characterization, and photocatalytic properties of ZnO / (La, Sr) CoO₃ composite nanorod arrays*, J. Mater. Chem., 2009, **19**, str. 970-975.

Đurovcová V., Kršek M., *Cushingův syndrom – charakteristika, diagnostika a léčba*, Med. Pro Praxi, 3. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze, 2009, **6**, (6), str. 295–299. [online]. Staženo dne 2014_10_18 z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/06/02.pdf>.

Ellis T., James T. D., Stewart C., Scott A. P., *A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout*, Journal of Fish Biology, 2004, **65**, (5), str. 1233–1252. [online]. Staženo dne 2015_03_25 z: http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.0022-1112.2004.00499.x?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_site_license=LICENSE_DENIED_NO_CUSTOMER.

Fenoll J., Hellín P., Martínez C. M., Flores P., Navarro S., *Semiconductor-sensitized photodegradation of s-triazine and chloroacetanilide herbicides in leaching water using TiO₂ and ZnO as catalyst under natural sunlight*, J. Photoch. Photobio. A., 2012, **238**, str. 81-87.

Guo Y., Quan X., Lu N. Zhao H., Chen S., *High photocatalytic capability of selfassembled nanoporous WO₃ with preferential orientation of (002) planes*, Environ. Sci. Technol., 2007, **41**, (12), str. 4422-4427.

Hashimoto K., Irie H., Fujishima A., *TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects*, Jap. J. Appl. Physics, 2005, **44**, (12), str. 8269-8285.

Hájková P., Špatenka P., Kolouch A., Kočí P., Müllerová J., Píchal J., *Photocatalytic decomposition of steroid hormone as environmental contaminant*, 28th ICPIG, Praha, 2007, **16**, str. 1375-1377.

Héquet V., Gonzalez C., Le Cloirec P., *Photochemical processes for atrazine degradation: Methodological approach*, Water Res., 2001, **35**, (18), str. 4253-4260.

Horáková M., Klementová Š., Kříž P., Syam Krishna Balakrishna, Špatenka P., Golovko O., Hájková P., Exnar P., *The synergistic effect of Advanced Oxidation Processes to eliminate resistant chemical compounds*, Surface & Coatings Technology, 2014, **241**, str. 154-158.

Hořejší K., *Fotoredukce štavelanu železito-draselného (ferrioxalátový aktinometr)*, protokol z praktika Fotochemie přírodních vodních systémů, Přírodovědecká fakulta JU v Českých Budějovicích, 2015, str. 1-4.

Hynie S., *Antiastmatika a přehled léčiv chorob dýchacího systému*, V: „Farmakologie v kostce“, 2. vydání, TRITON, 2001, str. 286-325.

Chval J., *Kazuistika nemocné s Addisonovou chorobou hospitalizované na psychiatrii*, Psychiatria Pre Prax, 2005, **1**, str. 37-38, [on-line]. Staženo dne 2014_10_18 z: <http://www.solen.sk/pdf/17145069875bffc9829445b847f8aa60.pdf>.

Jelínek I., *Kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie (LC-MS)*, V: „Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek“, VŠCHT Praha, 2006, str. 19-23. [on-line]. Staženo dne 2015_03_07 z: <http://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf>.

Karlíková M., Kučera R., Hampl R., Topolčan O., *Biomarkery v gynekologické endokrinologii*, Investice do zdroje vzdělávání, Plzeň, 2013, str. 55-58.

Keltnerová L., *Odbourávání rezistentních pesticidů ze skupiny s-triazinů pomocí fotochemické oxidace na TiO₂*, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta JU v Českých Budějovicích, 2014, str. 1-36.

Klementová Š., Wagnerová D. M., *Photocatalytic Effect of Fe(III) on Oxidation of Two-Carbon Organic Substances Related to Natural Waters*, Collection of Czech, Chem. Commun., 1994, **59**, (6), str. 1066 – 1076.

Klementová Š., *A critical View of the Photoinitiated Degradation of Herbicides*, V: „Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds“, Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen (Ed.), ISBN: 978-953-307-803-8, InTech, 2012, str. 298-314. [on-line]. Staženo dne 2014_12_09 z: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/a-critical-view-of-the-photoinitiated-degradation-of-herbicides>.

Klementová Š., Zlámal M., *Photochemical degradation of triazine herbicides – comparison of homogeneous and heterogeneous photocatalysis*, Photochem. Photobiol. Sci., 2013, **12**, (4), str. 660–663.

Konstantinou I. K., Albanis T. A., *Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways*, Appl. Catal. B-Environ., 2003, **42**, str. 319-335.

Konstantinou I. K., Sakellarides T. M., Sakkas V. A., Albanis T. A., *Photocatalytic degradation of selected s-triazine herbicides and organophosphorus insecticides over aqueous TiO₂ suspensions*, Environ. Sci. Technol, 2001a, **35**, str. 398-405.

Kostich M. S., Lazorchak J. M., *Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use*, Science of The Total Environment, 2008, **389**, (2–3), str. 329–339. [on-line]. Staženo dne 2015_03_25 z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896970700993X>.

Linsebigler A. L., Lu G., Yates, J. T. Jr., *Photocatalysis in TiO₂ Surfaces: Principles, mechanism, and selected results*, Chem. Rev., 1995, **95**, str. 735-758.

Lisá L., *Vrozená adrenální hyperplazie*, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2001, str. 1-9. [on-line]. Staženo dne 2014_10_18 z: <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/r128.rtf>.

Melichar B. a kol., *Hormony - hormony steroidní*, V: „Chemická léčiva“, 3. vydání, AVICENUM zdravotnické nakladatelství, Praha, 1987, str. 598-599.

Mestek O., *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*, Vysoká škola Chemicko-technologická v Praze, 2010, str. 1-33. [on-line]. Staženo dne 2015_03_07 z: http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf.

Moore W. J., *Fyzikální chemie*, Praha: SNTL, 1979, str. 508.

Murov S. L., Carmichael I., Hug G. L., *Chemical Actinometry A. Potassium Ferrioxalate Actinometry*, Handbook of Photochemistry, 2nd edition (revised and expanded), Marcel Dekker, Inc, 1993, New York, str. 298-305.

Pelizzetti E., Maurino V., Minero C., Carlin V., Praumaro E., Zebinatti O., Tosato M. L., *Photocatalytic Degradation of Atrazine and others s-triazine herbicides*, Environ. Sci. Technol., 1990, **24**, str. 1559-1565.

Penuela G. A., Barceló D., *Comparative photodegradation study of atrazine and desethylatrazine in water samples containing titanium dioxide/hydrogen peroxide and ferric chloride/hydrogen peroxide*, J. AOAC Int., 2000, **83**, (1), str. 53-60.

Plenadren, International nonproprietary name: hydrocortisone, V: „European Medicines Agency, Science Medicines Health“, 2011, str. 1-69. [on-line]. Staženo dne 2014_10_15 z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002185/WC500117639.pdf.

Procházka J., *Cesta od drahých syntéz TiO₂ nanočástic k ekonomické výrobě těchto nano materiálů*, Keramický zpravodaj, 2012, **28**, (3), str. 17-21. [online]. Staženo dne 2015_03_11 z: <http://www.jh-inst.cas.cz/nanocentrum/data/dokument/soubor/silicate-013.pdf>.

Pröfrock D., Prange A., *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Environmental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends*, Applied Spectroscopy, 2012, **66**, (8), str. 843-868. [on-line]. Staženo dne 2015_04_15 z: http://www.opticsinfobase.org/view_article.cfm?gotourl=http%3A%2F%2Fwww%2Eopticsinfobase%2Eorg%2FDirectPDFAccess%2F9DB222B8-D0FA-6204-7C725A1A1806FF09_240196%2Fas-66-8-843%2Epdf%3Fda%3D1%26id%3D240196%26seq%3D0%26mobile%3Dno&org=.

Richardson M. L., Bowron J. M., *The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environmen: A review*, J. Pharm. Pharmacol, 1985, **37**, str. 1-12. [online]. Staženo dne 2015_03_25 z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04922.x/epdf>.

Ruane N. M., Komen H, *Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (Cyprinus carpio)*, Aquaculture, 2003, **218**, (1-4), Abstract. [online]. Staženo dne 2015_03_25 z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848602004222>.

Runnalls T. J., Casalucia M. L., Kugathasa S., Sumpter J. P., *Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research*, Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 2010, **16**, (6), Abstract. [online]. Staženo dne 2015_03_25 z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807039.2010.526503#.VRPA1fyG_J4.

Trojan S. a kol., *Systém hypotalamo - hypofyzární*, V: „Lékařská fyziologie“, 4. vydání, Grada Publishing, Praha, 2003, ISBN 80-247-0512-5, str. 497-499.

Wikipedia1. Strukturní vzorec hydrokortizonu. [online]. Staženo dne 2014_10_15 z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cortisol#mediaviewer/File:Cortisol2.svg>.

Wikipedia2. Schéma HPLC-MS. [online]. Staženo dne 2015_04_02 z: http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry#/media/File:Mass_Spectrometer_Schematic.svg.

Wikipedia3. Schéma kvadрупólového hmotnostního analyzátoru u HPLC-MS. [online]. Staženo dne 2015_04_02 z: http://en.wikipedia.org/wiki/Quadrupole_mass_analyzer.

Yang Q., Liao Y., Mao L., *Kinetics of Photocatalytic Degradation of Gaseous Organic Compounds on Modified TiO₂/AC Composite Photocatalyst*, Chinese Journal of Chemical Engineering, 2012, **20**, (3), str. 572—576.

Yongging Zha, Shaoyang Zhang, Hui Pang, *Preparation, characterization and photocatalytic activity of CeO₂ nanocrystalline using ammonium bicarbonate as precipitant*, Material Letters, 2007, **61**, (8-9), str. 1863-1866.

Zemanová M., *Photochemical Degradation of a Phenyl-urea Pesticide Chlorotoluron*, Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta JU v Českých Budějovicích, 2008, str. 1-27.