

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Fluoxetin – fotochemická degradace
fluoxetinu a toxicita fluoxetinu a směsi
jeho fotoproduktů vůči vodní rostlině
*Lemna minor.***

Bakalářská práce

Linda Mušková

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2021

Mušková, L., 2021: **Fluoxetin – fotochemická degradace fluoxetinu a toxicita fluoxetinu a směsi jeho fotoproduktů vůči vodní rostlině *Lemna minor***. [Fluoxetine – photochemical degradation of fluoxetine and toxicity of fluoxetine and mixture of its photoproducts with regard to the aquatic plant *Lemna minor*. Bc. Thesis, in Czech] – 28 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This Bachelor thesis deals with a psychotropic substance from the class of selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine. The theoretical part of the thesis summarizes its basic characteristic and mechanism of action, occurrence in natural waters, toxicity to aquatic organisms and the possibilities of degradation in the aquatic environment.

The experimental part is focused on photochemical degradation of fluoxetine in aqueous solution under light conditions relevant to natural waters and the potential toxic effect of fluoxetine itself and the mixture of products of fluoxetine photochemical degradation on the aquatic plant *Lemna minor*.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 8. dubna 2021

.....

Podpis

Cíl práce

Cílem práce bylo

- proměřit vliv přídavku iontů železa na odbourávání antidepresiva fluoxetinu s použitím zdroje záření imitujícího krátkovlnnou oblast slunečního záření dopadajícího na zemský povrch;
- vyhodnotit možnost fotochemické degradace fluoxetinu v přírodních vodách;
- otestovat toxicitu fluoxetinu a směsi jeho fotoproduktů vůči vodní rostlině *Lemna minor*.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mé školitelce paní doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za odborné konzultace, rady a připomínky při zpracování této práce. Rovněž také za čas a trpělivost, kterou se mnou měla.

Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Pavle Fojtíkové, PhD. z laboratoře environmentální a analytické chemie, za provedení HPLC analýz a za rady při zpracování výsledků.

Poděkování patří i Bc. Pavle Petráňové, za ochotu s čímkoliv poradit.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině, jak za podporu během psaní bakalářské práce, tak i během celého studia.

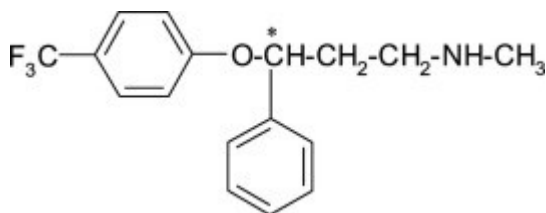
Obsah

1. ÚVOD	1
1.1. Charakteristika fluoxetinu.....	1
1.2. Fluoxetin v přírodních vodách.....	2
1.3. Toxicita fluoxetinu pro vodní organismy	3
1.4. Možnosti degradace fluoxetinu v prostředí přírodních vod.....	5
2. MATERIÁLY A METODY	7
3. VÝSLEDKY	10
4. DISKUZE.....	16
5. ZÁVĚR.....	18
6. SEZNAM LITERATURY	19

1. ÚVOD

1.1. Charakteristika fluoxetinu

Fluoxetin (Obr. 1), systematickým názvem *N*-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-1-amine ($C_{17}H_{18}F_3NO$) podle IUPAC (PubChem), je silná psychotropní látka ze třídy selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRIs – Selective Serotonine Reuptake Inhibitors). V medicíně se fluoxetin používá k léčbě depresí, a to ve formě hydrochloridu jako racemická směs dvou enantiomerů. Těmito enantiomery jsou S-enantiomer a R-enantiomer, přičemž S-enantiomer je zhruba 1,5krát účinnější při inhibici zpětného vychytávání serotoninu než R-enantiomer (Hiemke & Härtter, 2000). Selektivita a neurotransmiterová role fluoxetinu je značně ovlivněna právě jeho konformačními vlastnostmi.



Obr. 1: Strukturální vzorec fluoxetinu s vyznačeným chirálním centrem (Cârcu-Dobrin et al., 2016).

Antidepresivní účinek fluoxetinu je způsoben tím, že se v presynaptické membráně naváže na serotoninový transportér tzv. SERT nebo na receptor 5-HT₃, a tak dochází k inhibici zpětného vychytávání neurotransmiteru serotoninu, čímž se zvýší koncentrace, dostupnost a přenos neurotransmiteru v postsynaptických receptorových místech a zapříčiní delší setrvání serotoninu po jeho uvolnění v mozku (Pinna et al., 2009; Fabbri et al., 2014). Fluoxetin má rovněž slabou afinitu k transportérům dopaminu a noradrenalinu. Proto, při podání vysoké dávky fluoxetinu (tzv. supratherapeutická dávka 60 až 80 mg na den) může dojít k obsazení transportérů dopaminu a noradrenalinu a volný dopamin a noradrenalin mohou zvýšit antidepresivní účinek (Perez-Caballero et al., 2014). Fluoxetin je určený k léčbě poruch jako jsou depresivní poruchy, posttraumatické stresové poruchy, panické poruchy, obsedantně-kompulsivní poruchy, ale i k léčení poruch příjmu potravy (Stewart et al., 2014). Fluoxetin je též používán při poruchách autistického spektra, pokud jsou spojené s depresemi, úzkostmi či obsedantně-kompulsivními poruchami (Williamse et al., 2013).

1.2. Fluoxetin v přírodních vodách

Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu jsou v dnešní době nejvíce předepisované psychotropní léky, přičemž fluoxetin je tím nejčastěji používaným lékem z této třídy (Stewart et al., 2014). Fluoxetin i jeho aktivní metabolit norfluoxetin byly poměrně často detekovány ve vzorcích z odpadních i povrchových vod. V rozsáhlé studii amerických jezer, potoků a řek po celém území USA provedené v letech 1999 až 2000 byla na 139 vzorkovaných lokalitách zjištěna maximální koncentrace fluoxetinu 12 ng/l (Kolpin et al., 2002). Schultz et al. (2010) uvádějí koncentraci fluoxetinu 15 ng/l ve dvou tocích po proudu od čistíren odpadních vod v USA (Boulder Creek v Coloradu a Fomile Creek v Iowě). V práci Metcalfa et al. (2003), která shrnuje analýzy ohledně léčiv v oblasti Velkých jezer v Kanadě v odtocích z čistíren odpadních vod během léta a podzimu roku 2000, byla zaznamenána koncentrace fluoxetinu 99 ng/l. Deblonde et al. (2011) v přehledném článku uvádějí, že průměrná hodnota koncentrace fluoxetinu na výtoku z čističek odpadních vod je 112 ng/l. Podle Weinbergera & Klapera (2014) jsou průměrné koncentrace nacházené v povrchových vodách v rozmezí 12 – 1 400 ng/l. Vasskog et al. (2006) uvádí, že v čističkách odpadních vod dochází sice k redukci množství fluoxetinu, a to pravděpodobně ireverzibilní vazbou na aktivovaný kal, nicméně jeho neustálý přísun a relativní stabilita vede ke skutečnosti, že fluoxetin je opakovaně detekován v povrchových vodách (Martin et al., 2019).

Kromě fluoxetinu se studie zaměřují i na metabolit fluoxetinu, norfluoxetin. Měření provedené v Montrealu v Kanadě v odtoku odpadních vod odhalilo jeho přítomnost v koncentracích 12 – 13 ng/l, při dvou různých vzorkovacích studiích (Lajeunesse et al., 2008). V povrchových vodách horní části povodí Tennessee River byly nalezeny koncentrace v rozmezí 3,9 – 10 ng/l (Conley et al., 2008). I když jsou fluoxetin a norfluoxetin v životním prostředí detekovány většinou v poměrně nízkých koncentracích, je zde environmentální riziko trvalého působení na vodní organismy a též možnost jeho zakoncentrování v sedimentech (Furlong et al., 2004).

1.3. Toxicita fluoxetinu pro vodní organismy

Protože je fluoxetin perzistentní ve vodném prostředí, zaměřují se vědci na výzkum jeho toxicity a vlivu na biologické funkce vodních organismů. Studie se zabývají například vlivem na růst, přežití, chování, reprodukci, regeneraci či možnosti poškození DNA.

Účinkům na životní cyklus vodních bezobratlých se například věnovali Péry et al. (2008). Roztokům fluoxetinu o různých koncentracích byly vystaveny tři druhy organismů, perloočka *Daphnia magna*, vodní plž *Potamopyrgus antipodarum* a různonohý korýš *Hyaella azteca*. Při koncentraci 10 µg/l byl pozorován účinek na reprodukci u *D. magna* a *P. antipodarum*. U korýše *H. azteca* se účinek na reprodukci neprojevil, ale při 33 µg/l byl zjištěn vliv na velikost těla.

Co se týče studií, které se zabývají nepříznivými účinky na reprodukci vodních organismů, nejsou publikované výsledky ve shodě. Flaherty & Dodson (2005) zjistili zvýšení reprodukce u *D. magna* při expozici 36 µg/l fluoxetinu po dobu 30 dní. Rovněž Brooks et al. (2003b) pozorovali zvýšení plodnosti u *Ceriodaphnia dubia*, a to u koncentrace 56 µg/l při sedmidenní expozici. Naproti tomu Henry et al. (2004) u stejného druhu pozorovali snížení reprodukční schopnosti při 89 µg/l.

Dopad expozice fluoxetinu na pohybové chování ryby halančíkovce diamantového (*Cyprinodon variegatus*) studovali Winder et al. (2012). Dospěli k závěru, že i krátká doba expozice v řádu desítek hodin způsobuje snížení lokomotorické aktivity u studovaného druhu.

Latifi et al. (2015) studovali vliv fluoxetinu na ryby z čeledi vrubozubcovitých (*Amatitlania nigrofasciata*), a to zvláště na samce a zvláště na samice. U samců pozorovali významný pokles hladiny testosteronu po expozici fluoxetinu v koncentraci vyšší než 5,4 µg/l. U samic, při stejné koncentraci, byly ovlivněny hlavně parametry jako počet vajíček a doba potřebná k vylíhnutí embryí.

Ofoegbu et al. (2019a) zjistili, že u ploštěnky *Schidtea mediterranea* byla výrazně snížena nepohlavní reprodukce a regenerace při expozici fluoxetinu v koncentraci 0,1 µg/l. Za příčinu tohoto efektu je autory považováno fluoxetinem způsobené zvýšení hladiny melatoninu (Kirecci et al., 2014), protože nepohlavní reprodukce štěpením je pod neuromuskulární kontrolou a je potlačována zvýšenou hladinou melatoninu (Morita & Best, 1993). U stejného organismu pozorovali Ofoegbu et al. (2019b) vliv fluoxetinu na poškození DNA, přičemž

poškození DNA bylo závislé na koncentraci fluoxetinu – nejnižší pozorované koncentrace účinku (LOEC's – Lowest Observed Effective Concentrations) byly v rozmezí 0,1 – 1,0 µg/l.

U fluoxetinu i norfluoxetinu byla sledována též bioakumulace ve tkáních živých organismů.

První prací, která prokázala hromadění obou látek v játrech, mozku a svalové tkáni několika druhů ryb v řece ovlivněné výtokem z čističky odpadních vod, byla práce Brookse et al. (2005). Bioakumulace u norfluoxetinu byla přibližně 10krát větší než u fluoxetinu s koncentracemi 10,27 ng/g pro játra, 8,86 ng/g pro mozek a 1,07 ng/g pro svalovou tkáň.

V práci Chu & Metcalfeho (2007), v níž byly použity homogenáty celých těl ryb z Hamilton Harbour v západní části Lake Ontario je uváděn poměr norfluoxetinu a fluoxetinu přibližně 1,1 s hodnotou 1 ng/g vlhké váhy.

Přehled prací zabývajících se bioakumulací inhibitorů selektivního vychytávání serotoninu podává studie Silvy et al. (2015).

Kromě účinků na organismy z živočišné říše jsou studovány i účinky na fotosyntetizující organismy. Ve studii Brooks et al. (2003a) byla nejnižší pozorovaná koncentrace účinku (LOEC – Lowest Observed Effect Concentration) pro řasu *Pseudokirchneriella subcapitata* 13,6 µg/l. Pozorována byla deformace a menší velikost buněk řasy *P. subcapitata* oproti kontrolám bez fluoxetinu.

Amy-Sagers et al. (2017) provedli laboratorní ekotoxikologické experimenty pro rozsáhlou škálu koncentrací fluoxetinu, aby zjistili jeho vliv na fyziologii vodní rostliny *Lemna minor*. Dospěli k závěru, že při vystavení koncentraci 323 nmol/l (99 µg/l) došlo k významnému zpomalení růstu kořínku. Nižší koncentrace neměly prokazatelný efekt, nicméně výsledky ukazují velký rozptyl naměřených hodnot pro testované koncentrace fluoxetinu.

1.4. Možnosti degradace fluoxetinu v prostředí přírodních vod

Ani fluoxetin ani norfluoxetin nepodléhají hydrolyze a oba jsou rovněž odolné vůči biodegradaci (Furlong et al., 2004). Z tohoto důvodu lze očekávat, že fotochemické procesy mohou hrát významnou roli v transformaci těchto látek v povrchových vodách. Fotochemickou degradaci fluoxetinu studovali Tisler et al. (2019). K ozařování použili sluneční simulátor poskytující záření v rozmezí vlnových délek 295 – 3 000 nm. Zjistili, že degradace v ultračisté vodě probíhá dle kinetiky 1. řádu a je silně závislá na pH – poločasy reakce se pohybovaly v rozmezí 333 hodin pro pH 6 a 15 hodin pro pH 10. Závislost na pH při fotooxidaci fluoxetinu ve vodném prostředí pozorovali také Méndez-Arriaga et al. (2011), kteří testovali různá oxidační činidla a jejich kombinace, někdy spojená s fotochemickou oxidací (např. samotný ozon, ozon + peroxid vodíku, fotochemickou oxidací na TiO₂ jako fotokatalyzátoru, kdy k oxidaci dochází především působením vznikajících hydroxylových radikálů a kombinace těchto metod). Rychlosti oxidačních procesů byly výrazně vyšší než při použití solárního simulátoru v práci Tislera et al. (2019) a docházelo i k významné mineralizaci, tj. oxidaci organického substrátu až na CO₂.

Proces ozonizace použili ve své práci i Aghaeinejad-Meeybodi et al. (2015) a Aghaeinejad-Meeybodi et al. (2020). V práci z roku 2015 prováděli optimalizaci kombinace ozon a peroxid vodíku na odstranění fluoxetinu z vodného prostředí. V práci z roku 2020 se věnovali srovnání fotokatalytické degradace antidepresiva fluoxetinu v kombinaci s ozonem za přítomnosti nanokatalyzátorů boehmitu a γ -oxidu hlinitého. Výsledky ukazují, že účinnost ozonizačního procesu pro odstraňování fluoxetinu je významně zvýšena přítomností heterogenních katalyzátorů. Nanokatalyzátor boehmit projevuje vyšší účinnost při neutrálním pH, zatímco γ -oxid hlinitý je aktivnější k degradaci fluoxetinu při alkalickém prostředí.

Degradaci antidepresiva fluoxetinu po anaerobní předúpravě nemocničních odpadních vod foto-Fentonovým procesem se věnovali de Lima Perini et al. (2016). Fentonův proces používá ke katalytické oxidaci substrátů směs železnatých iontů a peroxidu vodíku. Foto-Fentonův proces zahrnuje trojmocné železo, peroxid vodíku a UV záření v rozmezí od blízké UV do viditelné oblasti až k 600 nm (Chong et al., 2010; O'Dowd & Pillai, 2020). Při tomto procesu se dvojmocné železo, které je katalyticky účinnou formou, tvoří *in situ* v reakční směsi fotochemickou redukcí trojmocného železa za přenosu elektronu z organického donoru na kov. Výsledky studie de Lima Periniho et al. (2016) prokázaly, že foto-Fentonův proces je účinný i při použití velmi nízkých koncentrací činidel, tedy Fe (III) a H₂O₂. I v této studii

byla prokázána závislost na pH, ale opačně než u Tislera et al. (2019) – při nižších hodnotách pH byla míra degradace vyšší.

Wawryniuk et al. (2017) studovali možnost fotodegradace fluoxetinu v přítomnosti dalších organických látek. Použity byly jednak fotolabilní sloučeniny vyskytující se ve vyšších koncentracích v komunálních odpadních vodách, (nesteroidní protizánětlivé léčivo diklofenak a antibakteriální a antifungicidní látka triclosan), jednak huminové látky. Studie byla zaměřena na možnost fotosenzitizované degradace fluoxetinu těmito látkami, tento efekt ale s použitím diklofenaku, triclosanu a huminových látek prokázán nebyl. Naopak Kwon & Armbrust (2006) zjistili, že fluoxetin nedegraduje pod fluorescenčními UV lampami (záření v rozmezí vlnových délek 300 až 380 nm) během 30 dní ozařování, ovšem přidavek huminových látek zvýšil rychlost odbourání fluoxetinu (poločas byl stanoven na 21 dní). Hlavním produktem byl norfluoxetin.

Mezi pracemi zabývajících se možnostmi degradace fluoxetinu v odpadních vodách lze nalézt i práce, které kombinují elektromagnetické záření (světlo) s jinými metodami, jako např. práce Moreira et al. (2019), v níž autoři zkoumali rychlost odbourávání při použití krátkovlnného záření v kombinaci s mikrovlnným zdrojem. Některé práce se soustřeďují na zcela jiné principy degradace, jako např. práce Shaoa et al. (2017), v níž bylo použito ozařování elektronovým paprskem.

Zajímavou studií o vlivu iontů kovů na fotochemickou stabilitu fluoxetinu provedli Mašlanka et al. (2013). Studie není zaměřena na možné odbourávání fluoxetinu v přírodních vodách, ale v pevné fázi, a to vlivem UVA záření. Roztok fluoxetinu v methanolu byl smíchán s roztokem soli obsahující měďnaté, železnaté, železité nebo hlinité ionty, rozpouštědlo bylo odpařeno, pevná fáze byla následně ozařována. Autoři zjistili, že nejen koncentrace, ale i druh iontu má vliv na proces degradace – fotodegradace fluoxetinu proběhla nejrychleji v přítomnosti iontů měďnatých, klesala při použití iontů železitých a železnatých a nejnižší byla v přítomnosti iontů hlinitých. Bez přítomnosti kovových iontů nebyl pozorován úbytek fluoxetinu ani při ozařování po dobu 168 hodin.

2. MATERIÁLY A METODY

Fluoxetin hydrochlorid byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Zásobní roztok pro další použití byl připraven rozpuštěním fluoxetinu v ultračisté vodě (Milli-Q®) v koncentraci 56 mg/l. FeCl₃ od firmy Lachema byl rozpuštěn v HCl o koncentraci 0,2 mol/l na výslednou koncentraci 26 g Fe/l.

Spektrofotometrická měření byla provedena na spektrofotometru Shimadzu, typu UV-1601 se softwarem UV-Probe.

Ozařování vzorků probíhalo ve fotochemickém reaktoru Rayonet R100 osazeném lampami RPR 3000 Å emitující záření o vlnové délce 250 – 350 nm, záření o vlnových délkách kratších než 300 nm bylo odfiltrováno použitím optického skla (ozařované vzorky byly umístěny ve skleněných kyvetách s víčkem). Zářivý tok byl měřen přístrojem Lutron UV A, a jeho hodnota pro tento reaktor v rozmezí měřeném použitým přístrojem byla 4,5 W. Maximální doba ozařování jednotlivých vzorků byla 90 minut.

Chromatografická stanovení byla provedena na přístroji Thermo Scientific Dionex Ultimate systém 3000 (USA) s kolonou Synergi Polar RP od výrobce Phenomenex (250 x 3 mm; 4 µm). Jako mobilní fáze byla použita směs 28 mM dihydrogenfosforečnanu sodného ve vodě (66,7 %) a acetonitrilu (33,3 %). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a nastříkovaný objem vzorku 20 µl. Eluce byla prováděna isokraticky. Detekce byla prováděna spektrofotometrickým UV – VIS detektorem s diodovým polem PDA 3000RS s využitím vlnové délky 226 nm. Chromatografická data byla zpracována použitím programu Chromeleon.

V ozářené reakční směsi bylo dvojmocné železo stanoveno použitím 1,10 – fenantrolinu jako komplexačního činidla, absorbance vzniklého komplexu byla měřena při 510 nm.

Test toxicity fluoxetinu a produktů jeho fotochemické degradace byl proveden na vodní rostlině *Lemna minor* podle metodiky OECD 221 (OECD, 2002). Rostlina *Lemna minor* byla získána z Mollerovského rybníka v Netolicích v jižních Čechách.

Před testem byla rostlina kultivována ve Swedish Standard *Lemna* Growth Medium (SIS) po dobu 3 týdnů. Médium bylo připraveno ze 7 zásobních roztoků, jejichž složení je uvedeno v Tab. I.

Tab. I: Složení zásobních roztoků pro přípravu Swedish Standard *Lemna* Growth Medium (SIS).

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

Pro přípravu 1 litru média SIS bylo k cca 750 ml ultračisté vody (Milli-Q®) v kádince o objemu 1 litr přidáno:

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

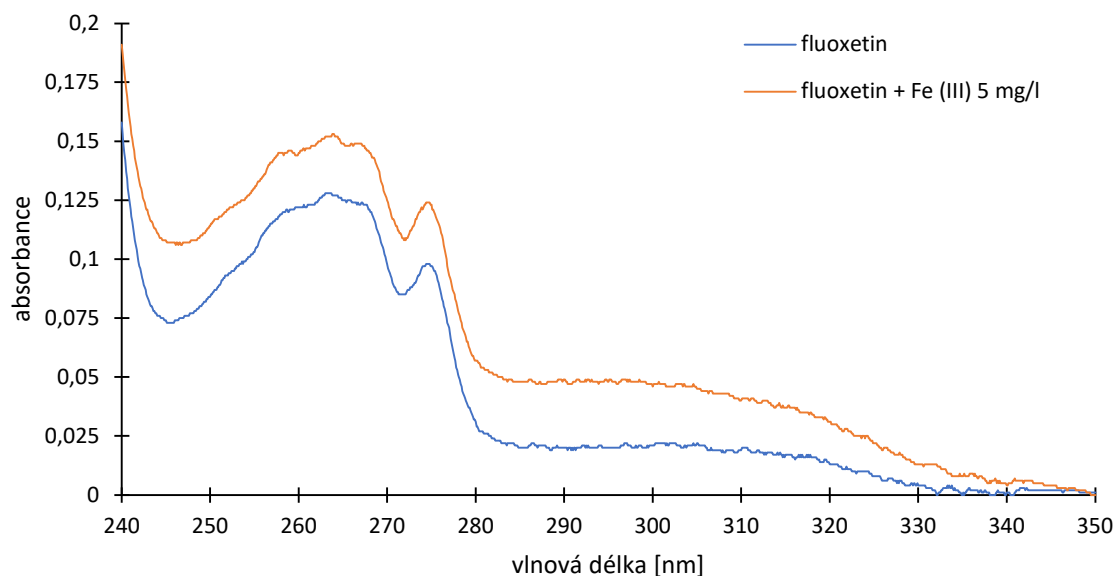
Poté bylo pH upraveno na hodnotu $6,5 \pm 0,2$ (k úpravě hodnoty pH je doporučeno použití 0,1 nebo 1 M HCl nebo NaOH, zde byl použit výhradně roztok NaOH, a to v koncentraci 1 mol/l). Po úpravě pH byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 1 litr a doplněn ultračistou vodou (Milli-Q®) po rysku. Zásobní roztoky, použité k přípravě média i samotný kultivační

roztok byly uchovávány při 4°C bez přístupu světla. Každý týden byl zásobní kultivar rostliny *Lemna minor* přeočkován do čerstvého kultivačního média.

Pro testování účinků fluoxetinu a jeho fotodegradačních produktů na růst rostliny *Lemna minor* bylo do krystalizačních misek pinzetou přeneseno 9 – 12 lístků rostliny (plocha lístků cca 1 cm²) do 120 ml média. Inkubace probíhala v několika paralelních stanoveních při každém testu, a to v prvních dvou testech toxicity fluoxetinu ve třech, v opakování prvního testu ve čtyřech a u testu toxicity fotoproduktů v pěti paralelních stanoveních. Kultivace byla prováděna při pokojové teplotě (22 – 23°C), v případě podzimních dnů s nízkou intenzitou světla byly vzorky v denních hodinách přisvětlovány LED osvětlením (LED CRI-300-W, barva bílá 6 000 – 6 500 K), přičemž intenzita osvětlení se nacházela v rozmezí 2 800 – 3 500 lx (měřeno luxmetrem Elvos LM 1010). K testu toxicity fotoproduktů nebylo LED osvětlení k přisvětlování použito. Testy toxicity měly dobu trvání 7 dní. Pro vyhodnocení účinků fluoxetinu a jeho fotodegradačních produktů na inhibici růstu a množení rostliny *Lemna minor* byl použit software Easy Leaf Area v mobilní aplikaci. K statistickému vyhodnocení a získání parametru p-hodnota testu byl použit dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu.

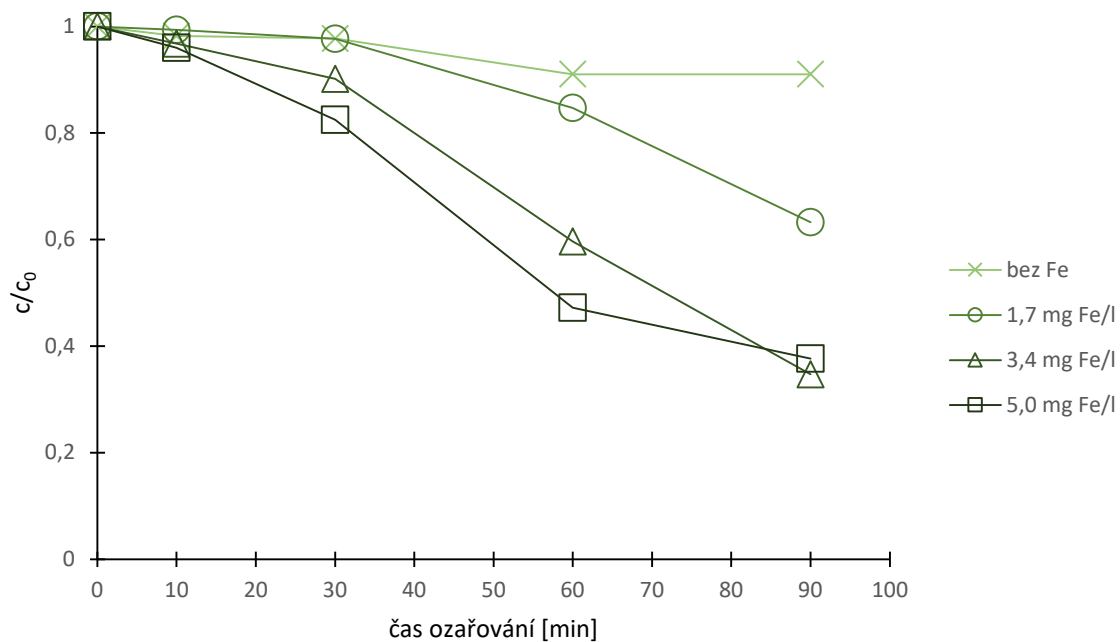
3. VÝSLEDKY

Fluoxetin jen nepatrně absorbuje záření o vlnových délkách delších než 300 nm, ale pouze do vlnové délky cca 330 nm (Obr. 2). Přídavkem železitých iontů se zvýší absorpce v uvedené oblasti, přibližně na dvojnásobek (Obr. 2).



Obr. 2: Absorpční spektrum roztoku fluoxetinu (56 mg/l) a roztoku fluoxetinu s přídavkem Fe (III).

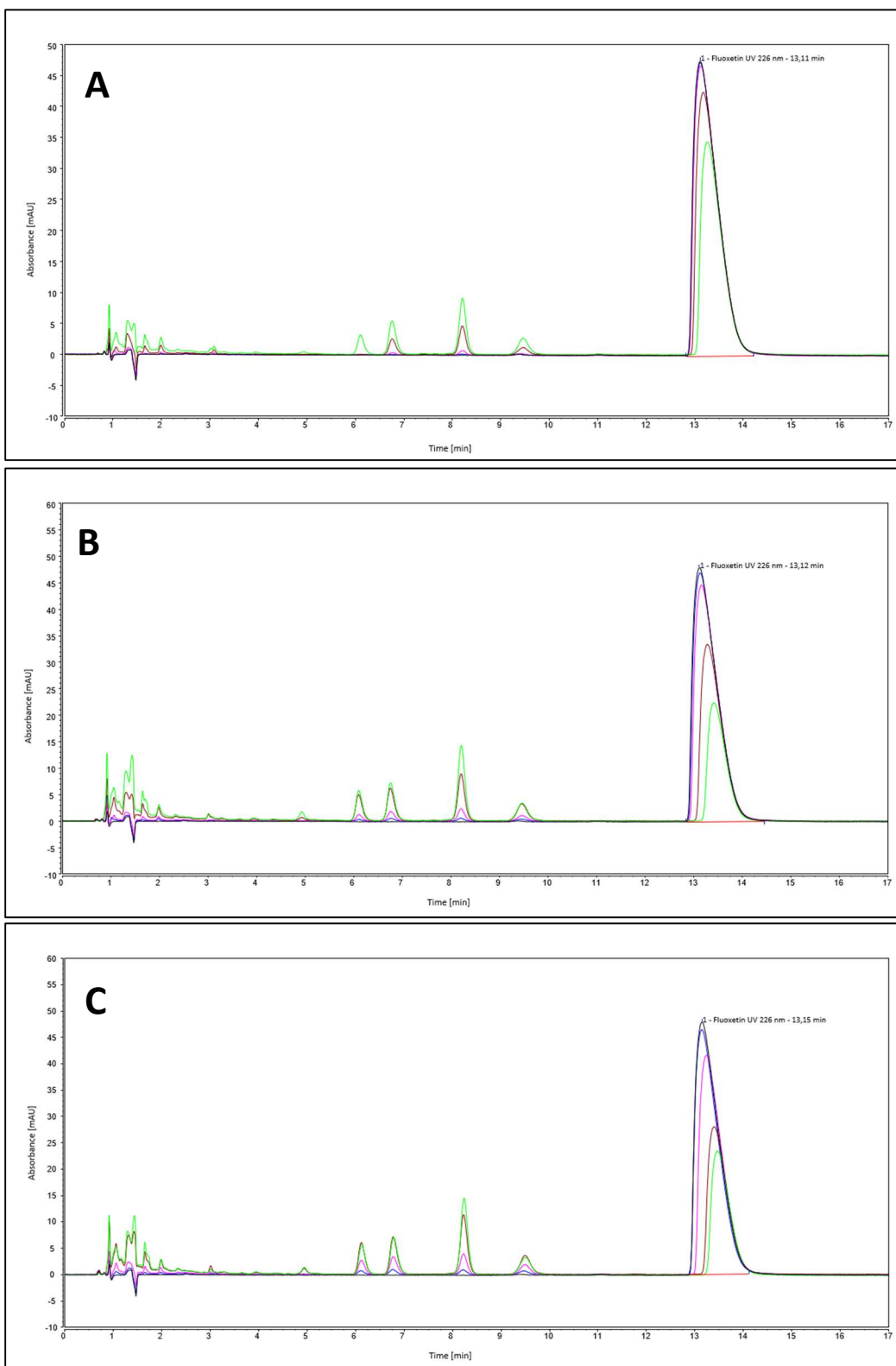
Průběh fotochemické degradace fluoxetinu ukazuje Obr. 3. Na obrázku je znázorněn jednak časový průběh odbourávání samotného fluoxetinu, jednak s přídavkem železitých iontů, a to ve třech různých koncentracích.



Obr. 3: Závislost degradace fluoxetinu na koncentraci přidaných železitých iontů.

Z obrázku je vidět, že u roztoku fluoxetinu bez přídavku železitých iontů nedocházelo téměř k žádnému fotochemickému odbourávání, při ozařování po dobu 90 minut činil celkový úbytek fluoxetinu 9 %. V přítomnosti železitých iontů v koncentraci 1,7 mg/l byla degradace v prvních 30 minutách shodná s průběhem v reakční směsi bez přidaného Fe (III), v následujících 60 minutách je možné pozorovat urychlení degradace, po 90 minutách činil úbytek fluoxetinu 40 %. I při dalších dvou vyšších koncentracích přidaného Fe (III), 3,4 a 5,0 mg/l, jsou reakce v počátečních stádiích pomalejší oproti časovému intervalu 30 – 90 minut ozařování, nicméně množství zreagovaného fluoxetinu se při těchto vyšších koncentracích neliší – celkový úbytek fluoxetinu je cca 60 %.

Chromatogramy reakčních směsí s přídavkem železitých iontů o koncentracích 1,7 mg/l, 3,4 mg/l a 5,0 mg/l v jednotlivých ozařovacích časech 0 – 90 minut zjištěné UV detektorem jsou zobrazeny na Obr. 4.



Obr. 4: HPLC chromatogramy fluoxetinu s přidavkem Fe (III) v časovém rozmezí ozařování 0 – 90 minut: A – chromatogram fluoxetinu s 1,7 mg Fe/l; B – chromatogram fluoxetinu s 3,4 mg Fe/l; C – chromatogram fluoxetinu s 5,0 mg Fe/l. 0 min – černá křivka, 10 min – modrá křivka, 30 min – růžová křivka, 60 min – hnědá křivka, 90 min – zelená křivka.

Z Obr. 4 lze vidět, že retenční čas fluoxetinu je cca 13 minut, vznikající produkty mají kratší retenční časy.

Při ozařování všech reakčních směsí vznikají čtyři produkty s retenčními časy cca 6,1; 6,7; 8,2 a 9,5 minut, v reakční směsi s koncentrací Fe (III) 3,4 a 5,0 mg/l vzniká ještě jeden produkt s retenčním časem cca 5 minut.

V reakční směsi fluoxetinu s 5,0 mg Fe/l byl proveden test fotoredukce železitých iontů. Již po 1 minutě došlo k redukci cca 20 % přidaných iontů, s delším ozařovacím časem se toto množství výrazně neměnilo.

Pro test toxicity fluoxetinu na okřehek (*Lemna minor*) byly použity v prvním testu koncentrace 0, 25, 50, 100 a 200 µg/l fluoxetinu, pro každou koncentraci byl test proveden ve třech paralelních stanoveních. Vyhodnocováno bylo procento přírůstků plochy listů za 7 dní trvání testu. Výsledky pro tento test jsou shrnuty v Tab. II.

Tab. II: Koncentrace neozářeného fluoxetinu a průměrný procentuální přírůstek plochy listů okřehku oproti nasazení.

koncentrace fluoxetinu [µg/l]	% přírůstku oproti nasazení (průměrná hodnota ze tří paralelních stanovení)
0	167,65
25	108,57
50	109,09
100	127,03
200	123,08

Údaje z Tab. II naznačují, že již přítomnost fluoxetinu o koncentraci 25 µg/l mohla mít toxický efekt, i když s rostoucí koncentrací fluoxetinu se toxický efekt neprohluboval – stanovená hodnota parametru p-value pro dvojici kontrola – koncentrace 25 µg/l byla 0,002, pro dvojici 25 µg/l a 50 µg/l byla hodnota 0,46, pro dvojici 25 µg/l a 100 µg/l byla hodnota 0,28 a pro dvojici 25 µg/l a 200 µg/l pak 0,34.

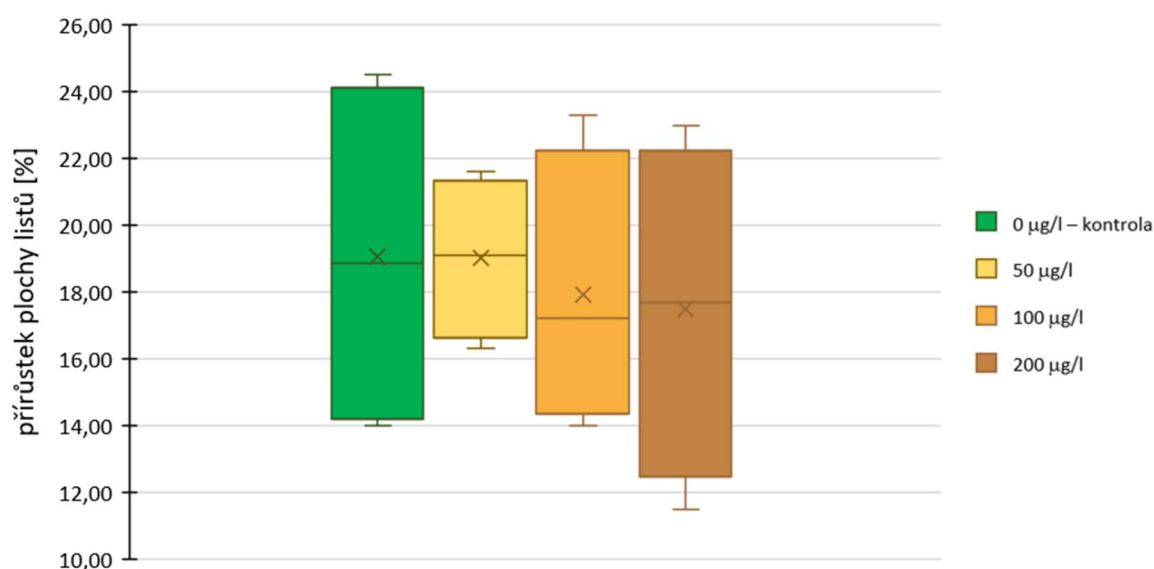
Byl proto proveden test toxicity s koncentracemi v rozmezí 0 – 25 µg/l. Výsledky ve formě porovnávaných dvojic koncentrací a jejich p-hodnot testu jsou zaznamenány v Tab. III.

Tab. III: Porovnání p-hodnot testu pro statistické vyhodnocení dvojice kontroly a různé hodnoty koncentrace fluoxetinu v rozmezí do 25 µg/l.

porovnávaná dvojice	p-hodnota testu
kontrola + 5 µg/l	0,33
kontrola + 10 µg/l	0,17
kontrola + 15 µg/l	0,13
kontrola + 25 µg/l	0,07

Z Tab. III je vidět, že pro žádnou koncentraci p-hodnota testu není menší než 0,05, tedy, že v porovnání s prvním testem se roztok fluoxetinu o koncentraci 25 µg/l nejeví jako toxický.

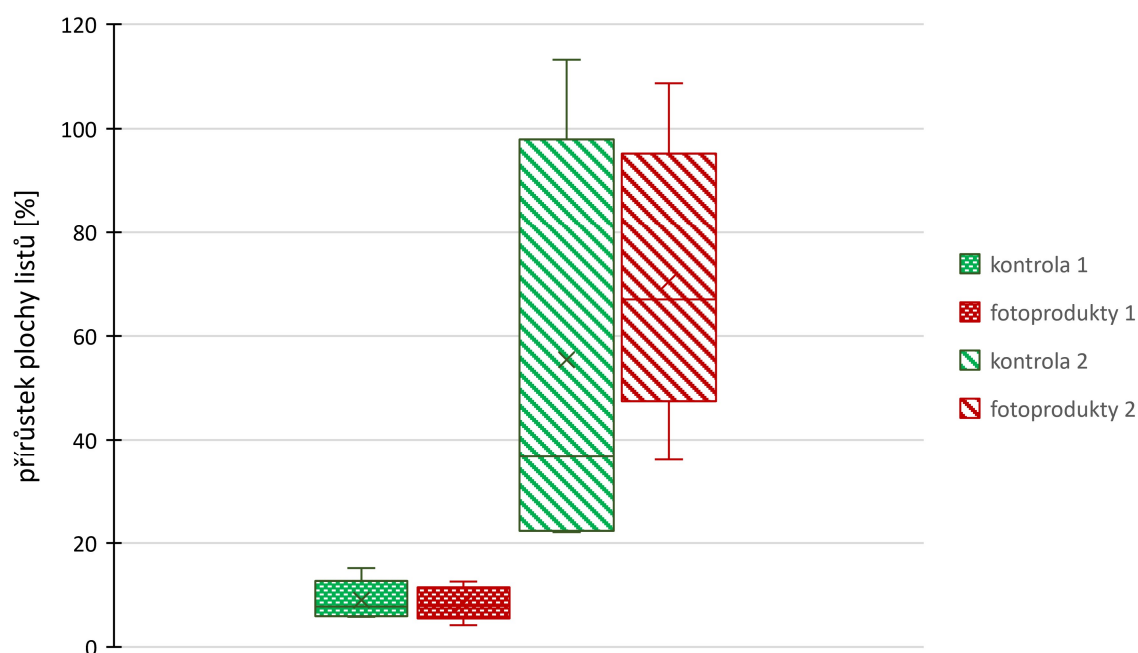
Byl proto znovu proveden test toxicity s koncentracemi fluoxetinu v rozmezí 0 – 200 µg/l, výsledky jsou zaznamenány v Obr. 5.



Obr. 5: Procentuální přírůstek plochy listů okřehku oproti nasazení.

Z Obr. 5 je vidět, že hodnoty v jednotlivých paralelních stanoveních značně kolísají, průměr přírůstku je u dvou nejvyšších koncentrací fluoxetinu poněkud nižší než u kontroly a nejnižší koncentrace fluoxetinu, nicméně parametry p-hodnoty testu jsou v porovnání s kontrolou 0,38 pro 50 µg/l, 0,29 pro 100 µg/l a 0,25 pro 200 µg/l, tedy ve všech případech významně větší než 0,05.

Pro test toxicity směsi produktů fotochemické degradace fluoxetinu byla použita reakční směs fluoxetinu s přísávkem 5 mg Fe³⁺/l, který byl ozařován po dobu 90 minut. Pro test byl zvolen takový objem přísávků reakční směsi s fotoprodukty do kultivačního media, aby zbytkové množství fluoxetinu odpovídalo nejvyšší testované hodnotě fluoxetinu, tj. 200 µg/l. Pokus byl proveden dvakrát vždy v pěti paralelních opakováních. Doaa trvání testů byla sedm dní jako v případě testu toxicity samotného fluoxetinu. Výsledky obou testů jsou zaznamenány v Obr. 6.



Obr. 6: Procentuální přírůstek plochy listů okřehku oproti nasazení u dvou opakování testů v přítomnosti fotoproduktů degradace fluoxetinu.

Z obrázku je vidět, že v prvním provedení pokusu byly přírůstky velmi malé jak v kontrole, tak ve stanoveních s fotoprodukty. V druhém provedení pokusu přírůstky silně kolísaly, dokonce víc u kontroly než u stanovení s fotoprodukty. Parametr p-hodnota testu měl u prvního provedení hodnotu 0,42 a u druhého stanovení 0,30.

4. DISKUZE

Z absorpčního spektra fluoxetinu vyplývá, že kvůli nízké absorpci v rozmezí vlnových délek 300 – 320 nm, nelze očekávat rychlou přímou fotochemickou degradaci. To dokázalo i ozařování roztoku samotného fluoxetinu, kdy po 90 minutách došlo ke snížení koncentrace o pouhých 9 %. Přídavek železitých iontů měl za následek zrychlení reakce, nicméně ve všech případech byla reakce v prvních deseti minutách pomalá, poté došlo k mírnému urychlení. Nelze se tedy domnívat, že by reakce probíhala fotokatalytickým mechanismem, kdy ozařování způsobí za přítomnosti organického substrátu, který je donorem elektronu, redukci iontů kovů, přičemž redukovaná forma je pak aktivní katalytickou formou (Klementová & Wagnerová, 1994), ačkoliv rozsah fotoredukce (v ustáleném stavu 20 % přidaného železa zredukováno, ustálený stav dosažen po jednominutovém ozařování) by pro fotokatalytický průběh mohl být postačující. Prosté zvýšení absorpce komplexu fluoxetin – Fe (III) se rovněž nejeví jako příčina zvýšení rychlosti reakce vzhledem k tomu, že v počátečních stádiích reakce byl průběh pomalejší. Postupné urychlení reakce by nasvědčovalo spíše mechanismu zvanému self-sensitizace (Calzaferri & Spahni, 1986). Podobný efekt byl pozorován při odbourávání verapamilu (Klementová et al., 2017) či atorvastatinu (Petráňová, 2020), avšak v obou zmíněných případech byl znatelný jen při nižších koncentracích přidaných železitých iontů. Nicméně vzhledem k tomu, že v přírodních vodách je železo běžně přítomné v koncentracích desetiný až jednotky mg/l (Dojlido & Best, 1993), může urychlení fotochemické transformace fluoxetinu v přítomnosti železitých iontů představovat významný příspěvek k fotodegradaci fluoxetinu v přírodním prostředí.

Lam et al. (2005) pozorovali, že i v pouhé deionizované vodě s použitím simulace slunečního záření dochází k fotoiniciované degradaci fluoxetinu, kterou lze vyjádřit kinetikou 1. řádu; jimi naměřený poločas činil $55,2 \pm 3,6 \text{ h}^{-1}$. V případě, že by data uvedená v této práci pro degradaci fluoxetinu bez přídavku iontů kovů byla proložena exponenciální křivkou, získaný poločas by měl hodnotu 11,5 hodiny. V této studii byl použit zdroj intenzivního záření v krátkovlnné oblasti slunečního spektra. V práci Klementové et al. (2009) lze najít odhad pro porovnání světla vyzařovaného lampami RPR 3500Å, kde devadesátiminutové ozařování odpovídá cca 6 hodinám přírodního slunečního záření v období letního slunovratu na 50° severní šířky. Protože v této práci byly použity lampy RPR 3000Å, které mají větší emisi u 300 nm, je cca pětinasobné urychlení degradace oproti hodnotě získané autory Lam et al. (2005) se slunečním simulátorem možné.

Závislost na pH v této práci testována nebyla, pH roztoku fluoxetinu nebylo ani upravováno, jeho hodnota činila 6,5. Avšak podle výsledků Tislera et al. (2019) by měla být degradace při tomto pH významně (řádově) pomalejší. Vysvětlení opět může spočívat ve skutečnosti, že v práci Tislera et al. (2019) byl použit sluneční simulátor, který simuloval kromě UV a VIS oblasti slunečního záření i IČ spektrum, takže patrně množství UV fotonů v krátkovlnné oblasti kolem 300 nm bylo velmi nízké.

Mašlanka et al. (2013), kteří studovali stabilitu fluoxetinu v pevné fázi, pozorovali, že nedochází k žádnému úbytku fluoxetinu, pokud nebyly před vytvořením pevné fáze k roztoku fluoxetinu přidány jednotlivě v podobě roztoku soli různých kovových iontů, včetně iontů železitých. V přítomnosti iontů došlo během ozařování k rozkladu fluoxetinu, a to zřejmě v důsledku vytvoření komplexu fluoxetinu s ionty kovu.

Výsledky získané v předkládané práci spolu s výsledky studií Lama et al. (2005), Tislera et al. (2019) a Mašlanky et al. (2013) naznačují, že v přírodním prostředí fotoiniciovaná degradace může představovat významnou možnost transformace fluoxetinu.

Při ozařování samotného fluoxetinu byly pozorovány čtyři vznikající produkty, všechny s retenčními časy kratšími než fluoxetin. Přídavek železitých iontů měl za následek vznik ještě dalšího minoritního produktu s retenčním časem cca 5 minut, tedy rovněž kratším, než měl fluoxetin.

Tento výsledek je ve shodě s prací Dokoupilové (2020), která za podobných experimentálních podmínek též zaznamenala vznik čtyř fotoproduktů.

Test toxicity ve vodním prostředí se provádí obvykle na vodních organismech z živočišné říše jako jsou korýši či ryby. Například práce Dokoupilové (2020) jednoznačně prokázala negativní vliv fluoxetinu na počet juvenilů, počet snůšek i velikost těla u hrotnatky (*Daphnia magna*). U fluoxetinu byl však studován i vliv na fotosyntetizující organismy, např. řasu *Pseudokirchneriella subcapitata*, pro niž Brooks et al. (2003a) stanovili hodnotu nejnižší pozorované koncentrace účinku (LOEC – Lowest Observed Effect Concentration) 13,6 µg/l. Studován byl i vliv na okřehek (*Lemna minor*) v práci Amy-Sagerse et al. (2017), kteří pozorovali výrazný toxický vliv (zpomalení růstu kořínků) v koncentracích vyšších než 99 µg/l. To se ale v této studii nepodařilo potvrdit, statisticky významný efekt, který by potvrdila p-hodnota testu menší než 0,05, nebyl pozorován ani v koncentracích dvojnásobných oproti studii Amy-Sagerse et al. (2017).

Studiu toxických efektů fotochemicky vzniklých produktů fluoxetinu a jiných léčiv začíná být, až teprve v poslední době, věnována pozornost. Existují práce, které ukazují toxický efekt fotochemicky vzniklých produktů léčiv jako je verapamil (Klementová et al., 2020), fluoxetin (Dokoupilová, 2020) či atorvastatin (Petráňová, 2020) na vodní organismy; ve zmíněných prvních dvou studiích byl prokázán toxický vliv fotoproduktů na hrotnatku (*Daphnia magna*) a ve třetím případě na okřehek (*Lemna minor*). V této studii toxický efekt fotoproduktů fluoxetinu na vodní rostlinu *Lemna minor* prokázán nebyl.

5. ZÁVĚR

I přes nízkou absorpci v oblasti vlnových délek nad 300 nm podléhá fluoxetin fotochemické transformaci, může být tedy v přírodních vodách fotochemicky degradován.

Přídavek iontů železa urychlí reakci, ale není možné usoudit, že by ionty kovu měly fotokatalytický účinek, spíše se uplatní vyšší absorpce komplexu fluoxetin – Fe (III) oproti samotnému fluoxetinu a je předpokládán možný self-sensitizační efekt s rychlejší tvorbou sensitizátoru v přítomnosti Fe (III).

Fotoinicovaná degradace tak může představovat významnou možnost transformace fluoxetinu v přírodních povrchových vodách, kde přítomnost Fe (III) iontů v koncentracích až mg/l je obvyklá.

U fluoxetinu ani u produktů jeho fotochemické degradace nebyly potvrzeny toxické účinky na vodní rostlinu *Lemna minor*.

6. SEZNAM LITERATURY

Aghaeinejad-Meybodi, A., Ebadi, A., Shafiei, S., Khataee, A., & Rostampour M. (2015): Degradation of antidepressant drug fluoxetine in aqueous media by ozone/H₂O₂ system: process optimization using central composite design. *Environ. Technol.*, **36**, 1477-1488.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2014.994041> (staženo 20. 10. 2020).

Aghaeinejad-Meybodi, A., Ebadi, A., Khataee, A., & Dehghani Kiedehi, A. (2020): Comparative investigation on catalytic ozonation of Fluoxetine antidepressant drug in the presence of boehmite and γ -alumina nanocatalysts: operational parameters, kinetics and degradation mechanism studies. *Chem.*, **75**, 421-430.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11696-020-01312-0> (staženo 20. 10. 2020).

Amy-Sagers, C., Reinhardt, K., & Larson, D. M. (2017): Ecotoxicological assessments show sucralose and fluoxetine affect the aquatic plant, *Lemna minor*. *Aquat. Toxicol.*, **185**, 76-85.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X17300164> (staženo 15. 11. 2020).

Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., Solomon, K. R., Slattery, M., & La Point, T. W. (2003a): Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.*, **142**, 169-183.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427403000663> (staženo 15. 11. 2020).

Brooks, B. W., Turner, P. K., Stanley, J. K., Weston, J. J., Glidewell, E. A., Foran, C. M., Slattery, M., La Point, T. W., & Huggett, D. B. (2003b): Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere*, **52**, 135-142.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503001036> (staženo 12. 11. 2020).

Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., & Lewis, R. J. (2005): Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**, 464-469.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15720009/> (staženo 14. 11. 2020).

Calzaferri, G., & Spahni, W. (1986): Self-sensitization of photo-chlorine evolution in aqueous dispersions of silver zeolites. *Journal of Photochemistry*, **32**, 151-155.

[https://doi.org/10.1016/0047-2670\(86\)87004-6](https://doi.org/10.1016/0047-2670(86)87004-6) (staženo 12. 3. 2021).

Cârcu-Dobrin, M., Budău, M., Hancu, G., Gagyí, L., Rusu, A., & Kelemen, H. (2017): Enantioselective analysis of fluoxetine in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *Saudi Pharm J*, **25**, 397-403.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016416300998> (staženo 13. 10. 2020).

Conley, J. M., Symes, S. J., Schorr, M. S., & Richards, S. M. (2008): Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere*, **73**, 1178-1187.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508009843> (staženo 4. 10. 2020).

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., & Hartemann, P. (2011): Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int J Hyg Environ Health*, **214**, 442-448.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438463911001325> (staženo 6. 3. 2021).

Dojlido, J., & Best, G.A. (1993): Inorganic substances in surface waters. In *Chemistry of water and water pollution*, Ellis Horwood Limited, Chichester.

de Lima Perini, J. A., Costa e Silva, B., Tonetti, A. L., & Pupo Nogueira, R. F. (2017): Photo-Fenton degradation of the pharmaceuticals ciprofloxacin and fluoxetine after anaerobic pre-treatment of hospital effluents. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **24**, 6233-6240.

[DOI 10.1007/s11356-016-7416-4](https://doi.org/10.1007/s11356-016-7416-4) (staženo 20. 10. 2020).

- Dokoupilová, E., 2020: Fotoiniciovaná degradace vybraných léčiv (dexametazonu, prednisolonu, fluoxetinu) a testování toxicity léčiv a produktů jejich fotodegradace na vodní organismy (*Daphnia magna*) [Photoinitiated degradation of selected drugs (dexamethasone, prednisolone, fluoxetine) and toxicity tests of the drugs and their photodegradation products on aquatic organisms (*Daphnia magna*). Master Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Fabbri, C., Porcelli, S., & Serretti, A. (2014): From pharmacogenetics to pharmacogenomics: the way toward the personalization of antidepressant treatment. *Can J Psychiatry*, **59**, 62-75.
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/070674371405900202> (staženo 30. 9. 2020).
- Flaherty, C. M., & Dodson, S. I. (2005): Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, **61**, 200-207.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350500295X> (staženo 12. 11. 2020).
- Furlong, E. T., Kinney, C. A., Ferrer, I., Werner, S. L., Cahill, J. D., & Ratterman, G. (2004): Pharmaceuticals and Personal Care Products in Solids: Analysis and Field Results for Sediment, Soil, and Biosolid Samples. (4517).
https://download.clib.psu.ac.th/datawebclib/e_resource/e_database/agronomy/2004/Browse/pdf/ACS/4517.pdf (staženo 4. 10. 2020).
- Henry, T. B., Kwon, J. W., Armbrust, K. L., & Black, M. C. (2004): Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 2229-2233.
<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/03-278> (staženo 12. 11. 2020).
- Hiemke, C., & Härtter, S. (2000): Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, **85**, 11-28.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725899000480> (staženo 30. 9. 2020).

- Chong, M. N., Jin, B., Chow, Ch. W. K., & Saint, Ch. (2010): Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Res.*, **44**, 2997-3027.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0043135410001739?token=84164A0A867E931E73815890B5725DD629B50AABA8483C58DA31E2D044C7B1CB7ED41365003F55BD62197F06FB1978C8> (staženo 10. 11. 2020).
- Chu, S., & Metcalfe, C. D. (2007): Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1163**, 112-118.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967307010308> (staženo 14. 11. 2020).
- Kirecci, S. L., Simsek, A., Gurbuz, Z. G., Mimaroglu, S., Yuksel, A., Vural, P., & Degirmencioglu, S. (2014): Relationship between plasma melatonin levels and the efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors treatment on premature ejaculation. *Int J Urol*, **21**, 917-920. Abstract:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iju.12461> (staženo 28. 3. 2021)
- Klementová, Š., & Wagnerová, D. M. (1994): Photocatalytic Effect of Fe (III) on Oxidation of Two-Carbon Organic Substances Related to Natural Waters. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, **59**, 1066-1076.
- Klementová, Š., Kříž, D., Kopáček, J., Novák, F., & Porcal, P. (2009): UV photo- initiated changes of humic fluorophores, influence of metal ions. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 582-586.
- Klementova, S., Kahoun, D., Doubkova, L., Frejlichova, K., Dusakova, M., & Zlamal, M. (2017): Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogeneous photocatalysis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **16**, 67-71. Abstract:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/PP/C6PP00164E#!divAbstract> (staženo 12. 3. 2021).

- Klementová, Š., Poncarová, M., Kahoun, D., Šorf, M., Dokoupilová, E., & Fojtíková, P. (2020): Toxicity assessment of verapamil and its photodegradation products. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **27**, 35650-35660.
- <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-020-09830-w> (staženo 13. 3. 2021).
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1202-1211.
- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es011055j> (staženo 3. 10. 2020).
- Kwon, J.-W., & Armbrust, K. L. (2006): Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.*, **25**, 2561-2568.
- <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1897/05-613R.1> (staženo 24. 10. 2020).
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2008): Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **80**, 5325-5333.
- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac800162q> (staženo 4. 10. 2020).
- Lam, M. W., Young, C. J., & Mabury S. A. (2005): Aqueous photochemical reaction kinetics and transformation of fluoxetine. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 513-52.
- <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es0494757> (staženo 3. 10. 2020).
- Latifi, T., Forsatkar, M. N., & Nematollahi, M. A. (2015): Reproduction and behavioral responses of convict cichlid, *Amatitlania nigrofasciata* to fluoxetine. *J Fish Aquat Sci*, **10**, 111-120.
- <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=jfas.2015.111.120> (staženo 13. 11. 2020).

Martin, J. M., Bertram, M. G., Saaristo, M., Fursdon, J. B., Hannington, S. L., Brooks, B. W., Burket, S. R., Mole, R. A., Deal, N. D. S., & Wong, B. B. W. (2019): Antidepressants in Surface Waters: Fluoxetine Influences Mosquitofish Anxiety-Related Behavior at Environmentally Relevant Levels. *Environ. Sci. Technol.*, **53**, 6035-6043.

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.9b00944> (staženo 5. 12. 2020).

Maślanka, A., Hubicka, U., Krzek, J., Walczak, M., & Izvorski, G. (2013): Determination of fluoxetine in the presence of photodegradation products appearing during UVA irradiation in a solid phase by chromatographic-densitometric method, kinetics and identification of photoproducts. *Acta Chromatogr.*, **25**, 465-481.

https://www.researchgate.net/publication/270481658_Determination_of_Fluoxetine_in_the_Presence_of_Photodegradation_Products_Appearing_During_UVA_Irradiation_in_a_Solid_Phase_by_Chromatographic-Densitometric_Method_Kinetics_and_Identification_of_Photop (staženo 21. 10. 2020).

Méndez-Arriaga, F., Otsu, T., Oyama, T., Gimenez, J., Esplugas, S., Hidaka, H., & Serpone N. (2011): Photooxidation of the antidepressant drug Fluoxetine (Prozac®) in aqueous media by hybrid catalytic/ozonation processes. *Water Res.*, **45**, 2782-2794.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21458837/> (staženo 20. 10. 2020).

Metcalfé, C. D., Miao, X. S., Koenig, B. G., & Struger, J. (2003): Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 2881-2889.

<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/02-627> (staženo 3. 10. 2020).

Moreira, A. J., Borges, A. C., de Sousa, B. B., de Mendonça, V. R., Freschi, C. D., & Freschi, G. P. G. (2019): Photodegradation of Fluoxetine Applying Different Photolytic Reactors: Evaluation of the Process Efficiency and Mechanism. *J. Braz. Chem. Soc.*, **30**, 1010-1024.

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532019000501010 (staženo 4. 11. 2020).

- Morita, M., & Best, J. B. (1993): The occurrence and physiological functions of melatonin in the most primitive eumetazoans, the planarians. *Experimentia*, **49**, 623-626. Abstract: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F01923942> (staženo 28. 3. 2021)
- O'Dowd, K., & Pillai, S. C. (2020): Photo-Fenton disinfection at near neutral pH: Process, parameter optimization and recent advances. *J. Environ. Chem. Eng.*, **8**, 104063. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343720304115> (staženo 10. 11. 2020).
- Ofoegbu, P. U., Campos, D., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2019a): Combined effects of NaCl and fluoxetine on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminthes: Dugesiiidae). *Environ. Sci. Pollut.*, **26**, 11326-11335. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-019-04532-4> (staženo 13. 11. 2020).
- Ofoegbu, P. U., Lourenço, J., Mendo, S., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2019b): Effects of low concentrations of psychiatric drugs (carbamazepine and fluoxetine) on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea*. *Chemosphere*, **217**, 542-549. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518320691> (staženo 13. 11. 2020).
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2014): Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov*, **9**, 567-578. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17460441.2014.907790> (staženo 1. 10. 2020).
- Petráňová, P., 2020: Statiny – jejich použití, mechanismus účinku, vedlejší efekty. Atorvastatin a možnosti jeho fotochemické degradace v přírodních vodách. [Statins – applications, mechanism of action, side effects. Atorvastatin and possibilities of its photochemical degradation in natural waters. Bc. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Péry, A. R. R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., & Garric, J. (2008): Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, **73**, 300-304.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508008126> (staženo 12. 11. 2020).

Pinna, G., Costa, E., & Guidotti, A. (2009): SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Curr Opin Pharmacol*, **9**, 24-30.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489208002038> (staženo 30. 9. 2020).

PubChem. (2019): Fluoxetin.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62857> (staženo 30. 9. 2020)

Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., & Vajda, A. M. (2010): Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 1918-1925.

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9022706> (staženo 3. 10. 2020).

Shao, H., Wu, M., Deng, F., Xu, G., Liu, N., Li, X., & Tang, L. (2017): Electron beam irradiation induced degradation of antidepressant drug fluoxetine in water matrices. *Chemosphere*, **190**, 184-190.

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517315606?casa_token=2gR-Y3HudVsAAAAA:CxyiDkIybG4W7-pxUp0-WXOkQqnmuqzxOxV1-U7Zztyxj4cjHN8bSgAZIUHk5TWz0esFfPmd8hO8 (staženo 4. 11. 2020).

Silva, L. J., Pereira, A. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2015): Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environ. Pollut.*, **197**, 127-143.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749114004990> (staženo 15. 11. 2020).

- Stewart, A. M., Grossman, L., Nguyen, M., Maximino, C., Rosemberg, D. B., Echevarria, D. J., & Kalueff, A. V. (2014): Aquatic toxicology of fluoxetine: understanding the knowns and the unknowns. *Aquat. Toxicol.*, **156**, 269-273.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X14002793> (staženo 1. 10. 2020).
- Tisler, S., Zindler, F., Freeling, F., Nödler, K., Toelgyesi, L., Braunbeck, T., & Zwiener, Ch. (2019): Transformation Products of Fluoxetine Formed by Photodegradation in Water and Biodegradation in Zebrafish Embryos (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.*, **53**, 7400-7409.
- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.9b00789> (staženo 10. 11. 2020).
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P. J., Kallenborn, R., & Jensen, E. (2006): Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *J. Chromatogr. A*, **29**, 187-195.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X09002268> (staženo 4. 10. 2020).
- Wawryniuk, M., Drobniewska, A., Sikorska, K., & Nałęcz-Jawecki, G. (2017): Influence of photolabile pharmaceutical on the photodegradation and toxicity of fluoxetine and fluvoxamine. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 6890-6898.
- <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-0973-3> (staženo 21. 10. 2020).
- Weinberger, J., & Klaper, R. (2014): Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat. Toxicol.*, **151**, 77-83.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3989372/> (staženo 6. 3. 2021).
- Williams, K., Brignell, A., Randall, M., Silove, N., & Hazell, P. (2013): Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst. Rev.*, **6**, 1044-1078.
- <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004677.pub3/full> (staženo 1. 10. 2020).

Winder, V. L., Pennington, P. L., Hurd, M. W., & Wirth, E. F. (2012): Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *J. Environ. Sci. Health B*, **47**, 51-58.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2012.607767> (staženo 13. 11. 2020).