



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE LÉČIV S PŮDNÍ ORGANICKOU HMOTOU

INTERACTIONS OF PHARMACEUTICALS WITH SOIL ORGANIC MATTER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Martin Gabrhel

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1654/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Martin Gabrhel**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Interakce léčiv s půdní organickou hmotou

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s problematikou výskytu a chování léčiv v půdách.
2. Seznámit se s možnostmi studia interakcí.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech navrhnout a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a formulovat závěry.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martin Gabrhel
student

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá interakcí půdní organické hmoty s léčivem sulfapyridinem pomocí metody využívající difúzních cel. Pomocí této metody byla studována difúze léčiva sulfapyridinu ve vodných roztocích skrz agarósový gel s přidavkem huminových kyselin a bez nich. Experimentální data byla využita ke stanovení dvou typů difúzních koeficientů charakterizujících průchod léčiva skrz gel a následně průchod gelem do akceptorové cely. Experimentální výsledky v první části jasně prokazují imobilizační schopnost zadržovat sulfapyridin huminovou kyselinou a v druhé části experimentu už huminové kyseliny nemají významný vliv v dále probíhající difúzi.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the interaction of soil organic matter with the drug sulfapyridine using the diffusion cell method. By using this method was studied, the diffusion of the drug sulfapyridine in aqueous solutions and agarose gel with and without the addition of humic acids. In the experiment, we tried to determine two different diffusion coefficients, namely the passage of sulfapyridine through an agarose gel and the diffusion into the acceptor cell, when the hydrogel already contains humic acids. The experimental results in the first part clearly demonstrate the immobilization ability to retain sulfapyridine with humic acid, and in the second part there is seen that after absorbing the drug with humic acid, humic acids no longer prevent the penetration of another passing drug.

KLÍČOVÁ SLOVA

Půdní organická hmota, léčiva, sulfapyridin, difúze, difúzní cely, UV-VIS

KEYWORDS

Soil organic matter, drugs, sulfapyridine, diffusion, diffusion cells, UV-VIS

GABRHEL, Martin. *Interakce léčiv s půdní organickou hmotou*. Brno, 2022. Dostupné také z: . Bakalářská práce. <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139250>. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí/ho závěrečné práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí své bakalářské práce, paní prof. Ing. Martině Klučákové, Ph.D., za její pevné nervy, bohaté rady a za celkovou pomoc při vypracování této bakalářské práce. Při děkování nesmím také opomenout mé spolužáky, rodinu a přátele za jejich neuvěřitelnou podporu a vytváření pohodového prostředí pro psaní bakalářské práce.

Obsah

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 PŮDNÍ ORGANICKÝ HMOTA	7
2.1.1 Živá část půdy a primární organická hmota	7
2.1.2 Huminové látky	8
2.1.3 Složení huminových látek	8
2.2 MOŽNOSTI VAZEBNÝCH INTERAKCI	9
2.3 LÉČIVA	11
2.3.1 Osud léčiv v organismu	11
2.3.2 Analgetika	12
2.3.3 Antibiotika	12
2.4 INTERAKCE LÉČIV S PŮDOU	14
2.5 DIFÚZE	15
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	18
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ NÁČINÍ	18
4.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ	18
4.4 POSTUP MĚŘENÍ	19
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	22
5.1 POPIS ABSORPČNÍHO SPEKTRA SPY	22
5.2 PRŮBĚH EXPERIMENTU V ČASE	23
5.3 VÝPOČET DIFÚZNÍHO KOEFICIENTU	28
6. ZÁVĚR	30
7. LITERATURA	31

1. ÚVOD

V posledních desetiletích se vyskytuje čím dál tím větší problém s kontaminací vody a půdy různými látkami. Jednou z celé řady kontaminujících látek jsou léčiva, která se do přírody dostávají nesprávnou likvidací nevyužitých antibiotik a špatným zpracováním léčiva tělem člověka či zvířete. Tato nezpracovaná léčiva se dostávají do půdy exkrementy živočichů a do odpadních vod, kde nejsou řádně přečištěny v čistírnách odpadních vod, a tak se dostávají do vody, půdy i dokonce podzemních vod. Studium imobilizace léčiva huminovými kyselinami při jeho transportu v systému obsahujícím huminové kyseliny jako aktivní složku.

Huminové kyseliny, patřící společně s fulvokyselinami do půdní organické hmoty, jsou to látky, jejíž struktura není doposud zcela zmapována. Významná část výzkumných prací se zabývá interakcemi huminových kyselin s organickými látkami nebo pesticidy. Tato bakalářská práce se zabývá interakcí huminových kyselin s léčivou pomocí metody využívající difúzní cely. Cílem této bakalářské práce je posoudit možnost imobilizace léčiva při migraci systémem obsahujícím huminové kyseliny jako aktivní složku.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Půdní organická hmota

Půdní organická hmota (POH) je v půdě obsažena mezi 1-5 hm.% v závislosti na typu půdy. Byť je v půdě obsažena pouze ve stopovém množství, významně ovlivňuje řadu jejích vlastností. Jejím základním prvkem je uhlík. POH jsme dále schopni rozdělit na živou a neživou část. Neživá část se následně dělí na primární organickou hmotu a humusové látky (Obrázek 1). Obě složky jsou na sobě závislé a působí na celkovou biologii půdy a mineralizačních, včetně transformace organických látek na složité a stabilní sloučeniny v půdě [1].



Obrázek 1: Rozdělení půdní organické hmoty [1]

2.1.1 Živá část půdy a primární organická hmota

Za živou část půdy můžeme považovat mikroedafon. Jedná se převážně o bakterie, houby, aktinomycety, sinice aj., které se podílejí na většině rozkladných procesů v půdě. Nelze opomenout význam samotných rostlin a převážně jejich kořenů, které ovlivňují biologické i chemické procesy v období vegetace [1].

Primární organická hmota (POH) je tvořena hlavně odumřelými částmi rostlin a půdní mikroflórou, která je v půdě buď obsažena nebo je do ní vpravena ve formě hnojiv. POH podléhá mineralizaci (rozkladu), jejíž rychlost je závislá na půdních podmínkách (teplota, vlhkost, okysličení, pH). Dalším důležitým faktorem pro rychlost mineralizace je

samotný typ organické složky (kořenové exudáty, biomasa, kořeny). Důvodem je jejich odlišný poločas rozkladu. Pro kořenové exudáty tomu je několik dní, pro mikrobiální biomasu několik týdnů a pro hrubší kořeny a části rostlin až několik let. POH je tedy soubor živin v půdě [1]

2.1.2 Huminové látky

Huminové látky (HL) vznikají v průběhu až několika tisíc let v procesu zvaném humifikace. Při ní dochází k řadě rozkladných, a hlavně syntetických procesů, které vedou ke tvorbě nových vysokomolekulárních, tmavě zbarvených látek. HL jsou rozděleny do tří podskupin: fulvokyseliny (FA), huminové kyseliny (HA), huminy. Všechny jsou považovány za heterogenní látky, jejíž heterogenitu určuje rozdílnost chemického složení, kyselosti, hydrofobicity a rozpustnosti. HL nemají pravidelnou strukturu, mají vysokou iontovou silou, dobrou odolnost vůči mikrobiálnímu rozkladu (Tabulka 1) a jejich kyseliny mají nízkou hodnotu pH [1].

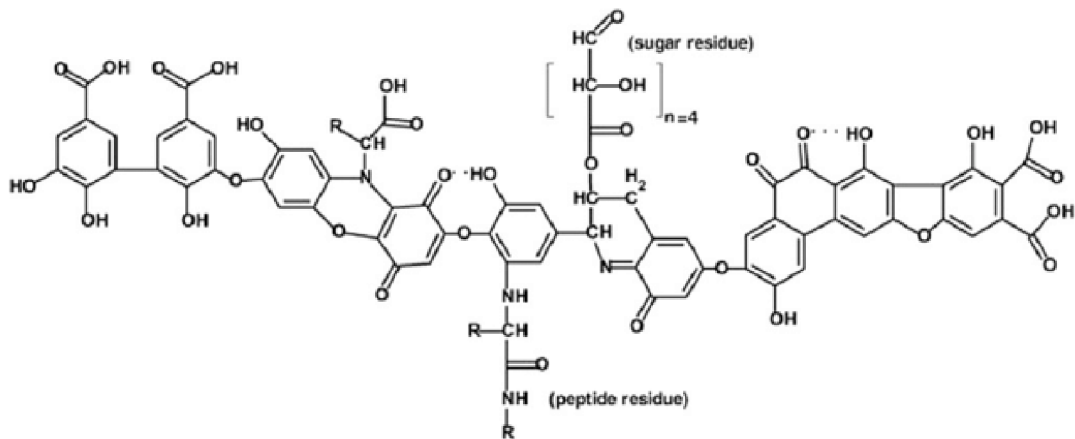
Tabulka 1: Poločas rozkladu organické hmoty [1].

Složka humusu	Poločas rozkladu
Fulvokyseliny	30-80 let
Huminové kyseliny a humáty	600-3000 let
Huminy	> 3 000 let

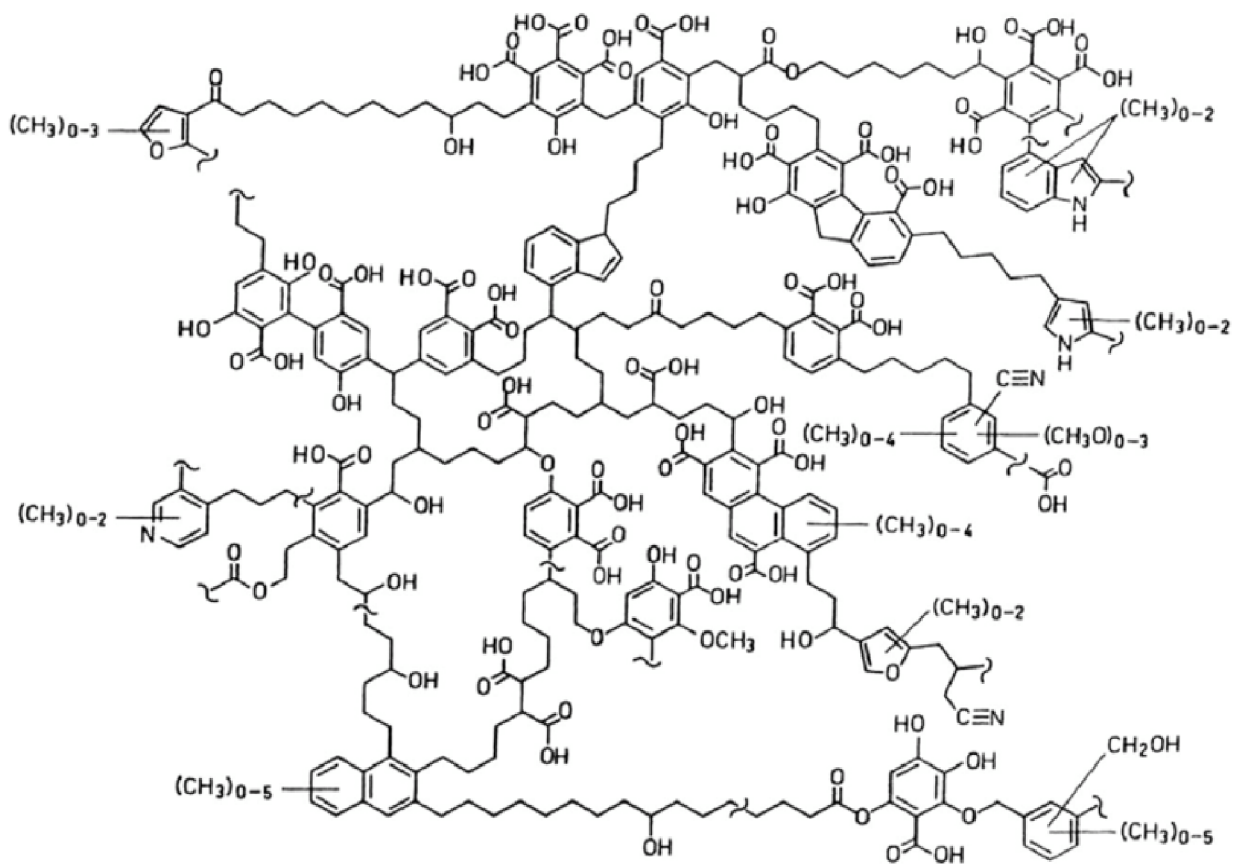
2.1.3 Složení huminových látek

Struktura a složení HL je složitá a závislá na prostředí, ve kterém vzniká. Elementární složení různých FA a HA ukazuje, že hlavními prvky v jejich struktuře jsou C, H, O, N a S. Tyto prvky jsou přítomny vždy, bez ohledu na původ humusových látek. Huminové látky zaujímají přibližně 80 % celkového obsaženého uhlíku v suchozemském prostředí a 60 % uhlíku rozpuštěného ve vodě [2].

FA a HA mají rozdílné složení, což má za důsledek jejich odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. FA obsahují více funkčních skupin kyselé povahy, zejména $-\text{COOH}$. Celková acidita FA (900 – 1400 mmol/100 g) je podstatně vyšší než u HA (400 – 870 mmol/100g). Dalším rozdílem je rozložení kyslíku. Zatímco u FA je obsažen převážně ve funkčních skupinách ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$) s vysokým obsahem kyslíku, HA mají těchto funkčních skupin o dost méně a zbylý kyslík je obsažen přímo v jaderné struktuře. Charakterizace komplexních směsí FA a HA je dnes považována za jednu z nejdůležitějších otázek ve výzkumu HL. Díky novodobým analytickým metodám a počítačovým technologiím bylo sestaveno několik teoretických modelů (podle Stevensona, Schultena a Schnitzera) molekulárních struktur FA a HA. (Obrázek 2,3) [2].



Obrázek 2: Stevensův model Huminové kyseliny [3].



Obrázek 3: Schultenův a Schnitzerův model Huminové kyseliny [3]

2.2 Možnosti vazebných interakci

Pro zjištění využitelnosti huminových látek v otázce ochrany životního prostředí, je velmi důležité zjistit, jak látky interagují s různými kontaminujícími látkami v půdě. Jelikož není doposud zcela známa struktura huminových látek, o jejich interakcích s kontaminanty můžeme mluvit pouze z teoreticky známých vlastností a na základě provedených experimentů. Díky těmto znalostem můžeme předpokládat několik typů vazebných interakcí huminových látek s cizorodými látkami v zemině [4].

Iontová vazba

Tento typ vazby funguje na principu působení elektrostatických sil mezi fixními náboji funkčních skupin a ionty vyskytujícími se v kontaminantu. Při uvažování iontové vazby potom můžeme na huminové látky pohlížet jako na ionexy (vysokomolekulární látky), které na svém povrchu nesou náboj. Vznik elektrostatické vazby lze u huminových látek předpokládat například s alkalickými kovy či amoniakem [4].

Koordinační vazba

Jedná se o nejdůležitější interakci z hlediska interakce mezi huminovou kyselinou a toxickým kovem. Potenciál vzniku koordinační vazby je zde dán značným zastoupením funkčních skupiny, jako jsou karboxylové a fenolické kyseliny ve struktuře huminových látek. S ohledem na složitost struktury je velmi obtížné odhadnout komplexotvorné reakce určité huminové kyseliny. Vytvářet samotné koordinační vazby je důležité hlavně při odstraňování toxických kovů nacházejících se v zemi. Fenolové a karboxylové kyseliny se nejvíce podílejí na vzniku těchto interakcí, kde zastoupení těchto dvou funkčních skupin je ovlivněno hodnotou pH a tím i mírou disociace těchto dvou skupin. Ve slabě kyselých interakcích se nejvíce podílejí na vzniku koordinačních vazeb karboxylové kyseliny. Stabilita vzniklých komplexů s rostoucím pH stoupá, a to hlavně u iontů tvořící karboxylát-fenolické komplexy [4].

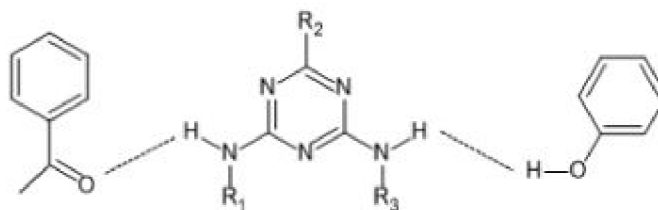
Kovalentní vazba

Existují dva způsoby interakce, které vedou ke vzniku kovalentních vazeb. Reakce využívající biokatalýzy a reakce bez využití aktivity enzymů. Skutečnost, že ve struktuře huminových kyselin může vznikat kovalentní vazba je známa od 70. let 20. století a jako příklad může být uvedena interakce mezi huminovými látkami izolovanými ze zeminy a anthracenu. V metabolicky aktivním systému bylo zjištěno vysoké zabudování anthracenu do struktury huminových kyselin. Tato možnost vzniku kovalentní vazby mezi huminovou látkou a kontaminantem vedla k předpokladu imobilizace kontaminantu kovalentní vazbou v interakci HA-kontaminant [4].

Vodíkové můstky

I přes skutečnost, že huminové kyseliny nejsou zcela zmapovány, lze na základě prokázané přítomnosti funkčních skupiny (amidová, laktamová, nitrilová) předpokládat možnost vzniku vodíkových vazeb. I přesto, že vodíkové můstky jsou považovány za slabé vazebné interakce, dokážou se výrazně podílet na interakci a imobilizaci huminové kyseliny a kontaminantu.

Jako příkladem vodíkových můstků byla prokázána interakce pro iminoskupinu v molekulách herbicidů (Obrázek 4) [4].



Obrázek 4: Vodíkové můstky mezi fragmenty HA a pesticidem [5].

Hydrofobní interakce

Tento typ interakce vzniká při přiblížení dvou nepolárních skupin nesených molekulami, které se vyskytují ve vodném roztoku. Interakce mohou vycházet například z působení van der Waalových sil nebo třeba při přesunu π elektronů. Jedná se o nejvíce předpokládanou interakci huminových látek s alifatickými a hydrofobními kontaminanty. Jako příkladem lze uvést ztráta části toxicity parathionu v přítomnosti huminových látek [4].

2.3 Léčiva

Obor zabývající se výzkumem a výrobou léčiv se nazývá farmacie, která se rozděluje na dva podobory galenickou farmaci a farmakochemii. Galenická farmacie se zaměřuje na získávání léčiv z přírodních materiálů, zatímco farmakochemie je obor zabývající se studiem chemických léčiv a farmaceutických pomocných látek. Za léčivo je obecně považována látka nebo přípravek, který je určen k podávání lidem a zvířatům. Léčivými látkami se potom rozumí látka s farmakologickým, či imunologickým účinkem nebo látky ovlivňující metabolismus. Jako pomocné látky se berou takové, které přímo nemají specifický účinek pro organismus, ale napomáhají při výrobě, přípravě, uchování a při aplikaci samotných léčiv [5].

2.3.1 Osud léčiv v organismu

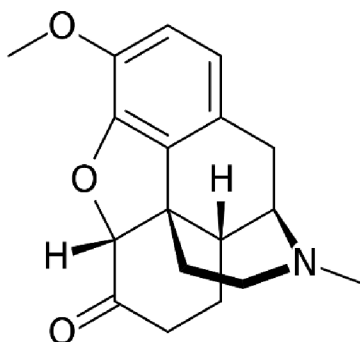
Interakce mezi léčivem a organismem patří mezi složitější děje a výsledek je podmíněn především správnou dávkou, rozpuštěním, absorpcí, distribucí, aktivací, interakcí s receptorem a v neposlední řadě samotným účinkem. Léčivo v organismu je v těle podrobena mnoha nespecifickým enzymovým reakcím, při kterých dochází k přeměně látek na látky lépe rozpustné ve vodě a schopné se vyloučit z organismu. Látky podléhají v organismu biotransformaci, což je většinou dvoustupňový proces, kdy v první fázi dochází k oxidaci, redukci nebo hydrolýze látky za vzniku metabolitů, které jsou lépe rozpustné v tělních tekutinách. V druhé fázi probíhají syntetické reakce s endogenními produkty a vzniklý konjugát, rozpustný ve vodě vychází z organismu převážně močí, stolicí a potem, čímž se dostává část do vody a následně do půdních systémů [5].

2.3.2 Analgetika

Jako analgetika jsou považovány látky, zmírňující pocit bolesti, které zároveň významně neovlivňují smyslové vnímání a vědomí. Obecně nemají léčivý účinek, avšak napomáhají při léčbě snížením zátěži a stresu organismu způsobené bolestí, zánětem nebo zvýšenou teplotou. Analgetika se dále dělí na narkotická (anodyna) a antipyretika [5].

Narkotická analgetika se používají ke zvládnutí silné bolesti a při větších dávkách mohou kromě potlačení bolesti způsobit i ztrátu vědomí. Interagují s opioidními receptory v centrální nervové soustavě a zvyšují tak práh vnímání bolesti. Mezi nepříznivé účinky patří možné vybudování závislosti. Jako příklad se dá uvést vicodin (hydrokodon s paracetamolem) (Obrázek 5). Vicodin je používán nejvíce v USA, to taky vysvětluje 99 % využitelnost celkové světové zásoby hydrokodonu spojenými státy. Vicodin je pro jeho lehkou dostupnost nejzneužívanějším lékem v USA [5][18].

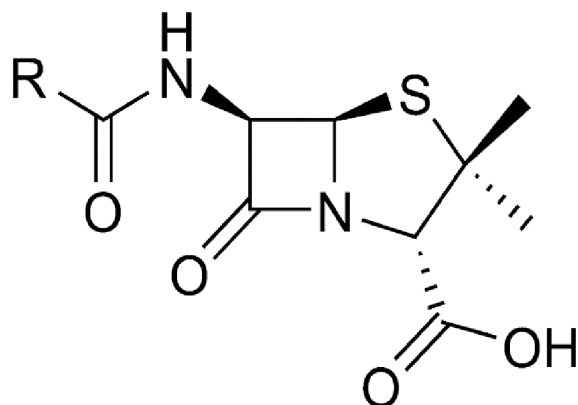
Antipyretika společně s nesteroidními protizánětlivými látkami patří do skupiny nenarkotických analgetik. Využívají se k potlačení mírnější bolesti, horečky a různých zánětů. Podstatou účinku je inhibice enzymu cyklooxygenasy (COX) [5].



Obrázek 5: Struktura Hydrocodonu [6].

2.3.3 Antibiotika

Antibiotika řadíme mezi látky využívané k profylaxi a terapii infekčních onemocnění vyvolaných bakteriemi. Valná většina je v dnešní době vyráběna synteticky, ale řada antibiotik je produktem plísní. První zmínky o antibiotickém efektu jsou datovány 2 500 let před naším letopočtem v Číně, kde se využívaly obvazy z plesnivého sójového mléka. Za objevitele antibiotik je považován skotský lékař Alexandr Fleming, který během svého výzkumu kultivoval bakterie na agarových plotnách, z nichž jedna byla napadena plísní *Penicillium notatum*, která dokázala potlačit růst bakterií a popsal látku vylučovanou plísní jako inhibující bakterie. V roce 1929 popsal svůj objev a sloučeninu nazval penicilin (Obrázek 6). Antibiotika lze rozdělit dle jejich účinku na specifická, která mají specifický účinek vůči jednomu typu bakterií, a širokospektrá, která napadají veškeré bakterie [7].



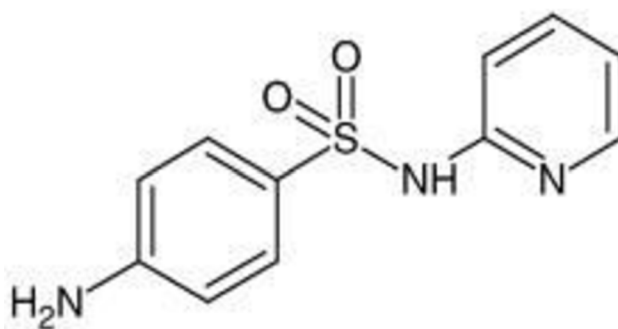
Obrázek 6: Struktura Penicilinu [8].

2.3.3.1 Sulfonamidy

Sulfonamidy vedle chinolanů patří mezi antibakteriální chemoterapeutika. Zavedení sulfonamidů do terapeutické praxe se datuje do druhé poloviny 30. let 20. století. Od 40. let 20. století se celosvětově vyrábí více než 150 sulfonamidů a jejich derivátů. Sulfonamidy se řadí mezi antibiotika širokospektrá a začala se jako lék využívat při klinické léčbě lidí. Postupně byla aplikována do chovu zvířat a dnes se používá převážně jako veterinární léčivo. Podstata účinku spočívá v jeho strukturní podobnosti s kyselinou p-aminobenzoovou (PABA), která je organismem využívána k tvorbě kyseliny listové potřebné pro syntézu DNA. Sulfonamid soutěží s PABA a tvoří nefunkční analogy kyseliny listové, čímž je organismus omezen syntetizovat kyselinu listovou a je závislý na exogenních zdrojích [7][9].

2.3.3.2 Sulfapyridin

Sulfapyridin (SPY) je jedno z nejrozšířenějších sulfonamidových antibiotik, které se v dnešní době používá jako veterinární léčivo pro profylaktické nebo terapeutické účely. Sulfapyridin (Obrázek 7) je možno detekovat v původních živočišných potravinách, jako je mléko, maso a med. Potraviny obsahující zbytky právě této látky mohou způsobit poškození lidského systému. SPY je látka, jejíž rozpustnost je závislá na jejím pH, a proto existuje riziko krystalizace v močovém měchýři nebo močové trubici. I to je jeden z důvodů proč se sulfapyridin v dnešní době už nepoužívá při klinické léčbě lidí [10][11].



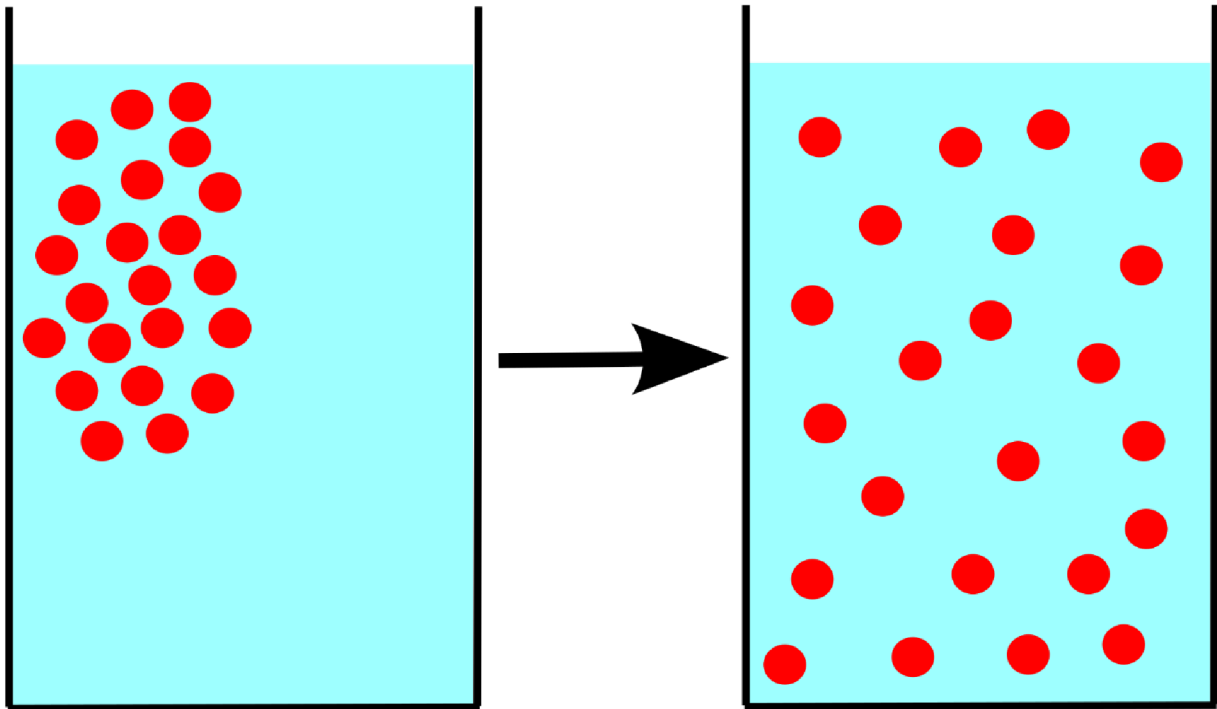
Obrázek 7: Sulfapyridin [11].

2.4 Interakce léčiv s půdou

Léčiva a nelegální drogy jsou nově se objevujícími kontaminanty, protože jejich osud a účinky v životním prostředí není úplně pochopen. Většina těchto kontaminantů se dostává do přírody prostým vylučováním přes moč a stolicí, které se následně dostávají do odpadních vod, kde jsou neúplně odstraněny v jejich čistírnách odpadních vod, a tak se léčiva a drogy dostávají jak do vyčištěných odpadních vod, tak do kalu a tím dále do půdy, řek a potravy. Mezi takové léky patří již zmiňované sulfonamidy, který se do přírody dostává kvůli omezené využitelnosti organismu. Následně tak léky mohou představovat jisté nebezpečí při konzumaci potravin, jak živočišného, tak rostlinného původu. Pochopení chování léčiv v upravených půdách je zásadní pro vývoj přesného hodnocení rizik pro životní prostředí [9][12]. Problematika interakce léčiv s půdou je podrobněji popsána v rešerši.

2.5 Difúze

Difúze je považována za způsob přenosu hmoty, kde se částice (atomy, ionty, molekuly) pohybují k místům s nižším zastoupením (koncentrací). Její podstatou je tepelný pohyb částic hmoty, proto je difúze závislá na teplotě a dochází k ní v každém skupenství. Při difúzi se zpravidla zmenšují koncentrační rozdíly látek obsažených v roztoku. Jedná-li se o zvětšující se rozdíly v koncentracích mluvíme potom o obrácené difúzi. Nejrychlejší difúzní prostředí je plynné, tudíž směs plyn-plyn. Je tomu tak, protože jeho částice mají největší kinetickou energii a jsou dostatečně vzdálené. V kapalném prostředí potom difúze probíhá pomaleji a řadíme mezi ni difúzi kapalina-pevná látka (Obrázek 8) nebo kapalina-kapalina. Uvnitř pevných materiálů je, ale je podmíněna druhem materiálu a přítomnosti pórů. U difúze v krystalických materiálech mluvíme o difúzi individuální, kdy se pohybuje jedna částice nezávisle na ostatních [13].



Obrázek 8: Difúze v kapalném prostředí [14].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mnoho antibiotik, včetně sulfonamidů, je často detekováno v půdě a podzemních vodách. Fekálie z dobytka a lidí je největším zdrojem znečištění antibiotik dostávajícího se do ekosystému. Skrze stále větším potřebám používání antibiotik jak u lidí a zvířat se zavedla veličina Pharmaceutically Active Compounds (PhAC). Tato třída zahrnuje látky široce využívané v medicíně a patří mezi ně právě léky, antibiotika a hormony. Odhaduje se, že přibližně 60–80% PhAC, což představuje asi 100 000 tun ročně, není absorbováno organismem a je uvolňováno do životního prostředí. Vstup PhAC do ekosystému je zapříčiněn v důsledku nesprávné likvidace nespotebovaných léčiv a vypouštěním odpadních vod. Právě čistírny odpadních vod jsou v městských oblastech považovány za hlavního přispívatele ke znečištění životního prostředí [15][16].

Ve článku [15] si kladli za cíl prozkoumat sorpční reakci dvou sulfonamidů, sulfometoxazolu (SMZ) a sulfapyridinu (SPY). Výzkum byl prováděn ve dvou sorbentech bohatých na organické látky. Komerční rašelinové půdě s obsahem uhlíku 38, 41 hm.% a v kompostovém hnoji s obsahem uhlíku 24, 33 hm.%. Ve výzkumu prokázali, že adsorpce SMZ a SPY na dvou organicky bohatých sorbentech za různých testovacích podmínek byla silně ovlivněna jejich chemickou strukturou, hodnotou pH roztoku a složením organického uhlíku v půdách. Prokázalo se, že zvýšený obsah uhlíku v půdě výrazně zvyšuje adsorpci sulfonamidů v půdách. Vyluhovací test rozpuštěného organického uhlíku dospěl k závěru, že malé organické molekuly mají vyšší afinitu k adsorbci sulfonamidů, když je adsorpčním mechanismem hydrofobní přepážka. V případě SPY byla za adsorpci při vysokých hodnotách pH zodpovědná hlavně pyridinová skupina. Při vysokých rozsazích se sorpce SPY odchylovala od lineárního rozdělování. Tato studie prokázala, že chemická struktura a vlastnosti antibiotik a chemická povaha organických látek výrazně ovlivní osud a transport sulfonamidů v životním prostředí. Celkově tato studie naznačuje, že chemická struktura a vlastnosti sulfonamidových antibiotik a typ organické hmoty v půdách výrazně ovlivní osud a transport těchto kontaminantů do životního prostředí [15].

Ve článku [16] Tibor Filep a jeho tým zkoumali sorpci 9 léčiv v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Jejich sorpce byla popsána pomocí Freundlichových a Langmuirových modelů a vztah mezi chemickými strukturami sloučenin a parametry adsorpce byl hodnocen pomocí redundantní analýzy (RDA). Sorpce byla zkoumána u devíti PhAC karbamazepin (CBZ), diklofenak sodný (DIC), 17 α -ethynylestradiol (EE2), estron (E1), estradiol (E2), lamotrigin (LAM), lidokain hydrochlorid (LID), oxazepam (OXA) a tramadol hydrochlorid (TRA), které byly vybrány na základě rozdělovacího koeficientu n-oktanol-voda, rozpustnosti ve vodě a disociační konstanty. Pro experiment byly vybrány tři typy půd [16].

Tato studie poskytla údaje o důležitosti vlivu chemické struktury na sorpční procesy. Zdůraznila prioritu environmentálních faktorů pro imobilizaci léčiv v půdách a sedimentech. Kromě toho určila, že sorpce léčiv je především závislá na faktorech prostředí jako je pH, obsah organické hmoty v půdě a kvalita půdy (což se shoduje s výsledky ve článku [15]). Prokázali, že jakákoliv, klidně i malá změna pH, může způsobit změnu hydrofobicity, což

prokázali v některých z léčiv (LAM, LID, OXA, TRA). U půd s vysokým obsahem organické hmoty nejlépe adsorbovaly hydrofobní molekuly léčiv (E1, E2, EE2). Tím prokázali, že každý faktor prostředí, který řídí chemické vlastnosti sloučenin, působí možnou změnou molekulární struktury látek. Studie také prokázala, že u léčiv, jejichž struktura je nezávislá na faktoru pH, jsou adsorpční mechanismy identické pro půdy i goethit. U takových látek (CBZ, OXA) je sorpce určena pouze počtem adsorpčních míst. Studie by mohla být užitečná pro pochopení osudu léčiv v půdě a pro aplikaci v modelech transportu a hodnocení rizik [16].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Sulfapyridine-Sigma-Aldrich
- Agarosa-type I, low EEO-Sigma-Aldrich
- Huminové kyseliny 1S102H [17]
- HCl-Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný-Sigma-Aldrich
- Destilovaná voda
- Lukosan M14

4.2 Použité přístroje a laboratorní náčiní

- pH metr
- Hitachi U-2900 UV-Vis Double Beam
- Varian Cary 50 Conc UV-VIS Photometer
- Analytické váhy SCALTECH
- Difúzní cely Perme gear 50/60 ml
- Skleněné a plastové kyvety
- Magnetická míchačka

4.3 Příprava zásobních roztoků

Příprava zásobního roztoku sulfapyridinu

Bylo naváženo 0,0125 g sulfapyridinu, který byl rozpuštěn v 500 ml odměrné baňce s destilovanou vodou za vzniku 0,1 mM roztoku SPY. Proces byl po dobu celého měření několikrát opakován s maximální odchylkou navážení 0,0001 gramu.

Příprava zásobního roztoku huminové látky

Bylo naváženo 0,1 g huminových látek, které byly rozpuštěny v hydroxidu sodném a doplněn destilovanou vodou na celkový objem asi 40 ml. Takto rozpuštěné huminových látek byly nadále pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové zředěny na pH 7. Roztok byl přelit do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

4.4 Postup měření

Příprava agarosového gelu

Byl připraven 1hm.% agarosový gel navážením 0,1 g agarósy, která byla rozpuštěna v 10 ml destilované vody. Roztok byl zahřát na teplotu 80 °C. Při zahřívání roztoku byl připraven plastový prstenec, na který bylo zespodu pomocí držáků na zkumavky připevněno krycí sklíčko. Po zahřátí byl roztok přelítý na onen plastový prstenec, přikrytý dalším krycím sklíčkem a upevněn pomocí držáku na zkumavky (Obrázek 9). Takhle připravený prstenec byl následně ponechán po dobu 45 minut za laboratorní teploty na stole. Po uplynutém čase byla agarósa zcela zatuhlá a byla provedena kontrola, zdali nedošlo k vytvoření bublinek na okrajích gelu. S takto připraveným gelem se dále postupovalo při přípravě difúzních cel (Obrázek 10).



Obrázek 9: Příprava agarosového gelu.



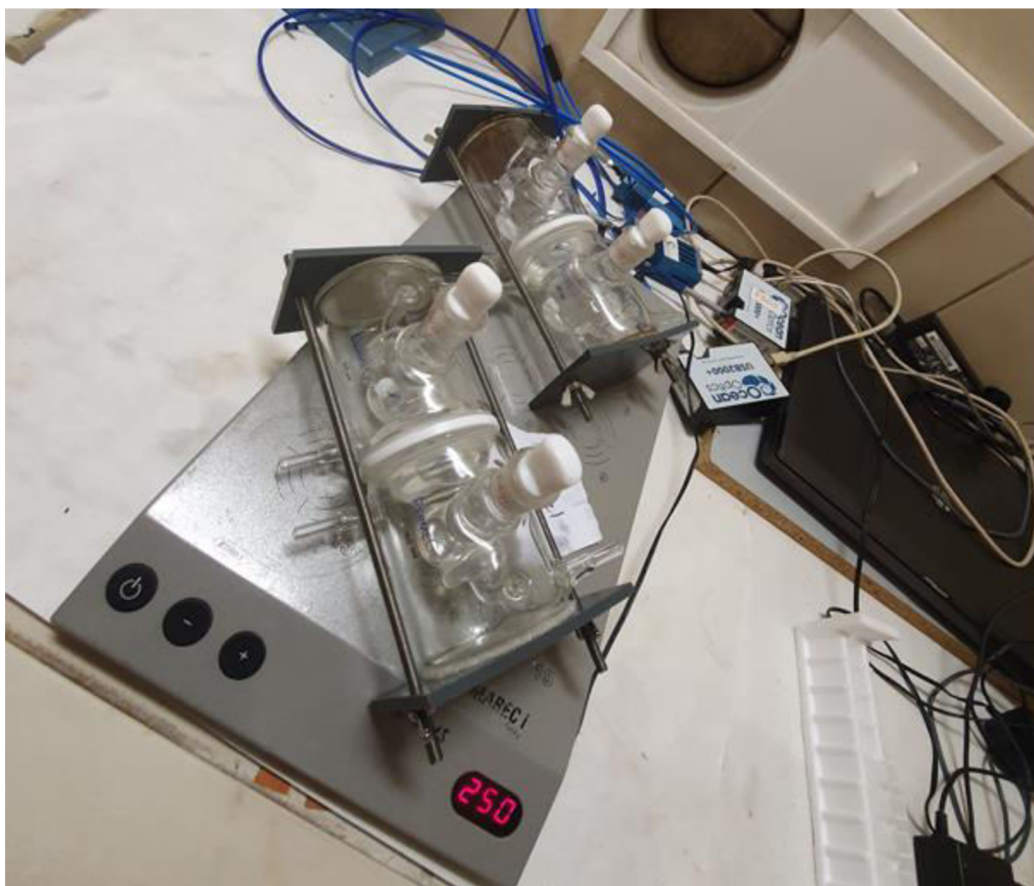
Obrázek 10: Připravený agarosový gel v prstenci.

Příprava agarosového gelu s huminami

Obdobně jako při přípravě agarosového gelu bylo naváženo 0,1 g agarósy, která byla rozpuštěna podobně jako v přípravě čistého gelu. S rozdílem že roztok, v kterém byla rozpuštěna obsahoval 9 ml destilované vody a 1 ml zásobního roztoku humin. Další postup byl stejný jako při přípravě samotného agarosového gelu.

Příprava difúzních cel

Pro měření byly využity páry difúzních cel Permeagear o objemu 50 ml. Na styčné plochy obou cel bylo rozmazáno pojivo lukosan a mezi cely byl vložen připravený agarosový prstenec a takhle připravený pár difúzních cel byl vložen a sešroubován pomocí držáků pro difúzní cely. Do každé z cel bylo zároveň nalito (aby prstenec tlakem kapaliny nepropadl) z 50 ml odměrných baněk roztoky. Do donorové cely 0,1mM roztok SPY a do akceptorové cely destilovaná voda. Cely v držáku byly přemístěny na magnetickou míchačku, která byla nastavena na 250 ot/min a do každé z cel bylo vloženo magnetické pro udržení konstantní koncentrace v celé cele. Nakonec byly cely zazátkovány a byla měřena absorbance v čase v obou částech, která byla přepočtena na koncentraci pomocí kalibrace (Obrázek 11).



Obrázek 11: Difúzní cely s roztoky léčiva a vody připraveny k měření.

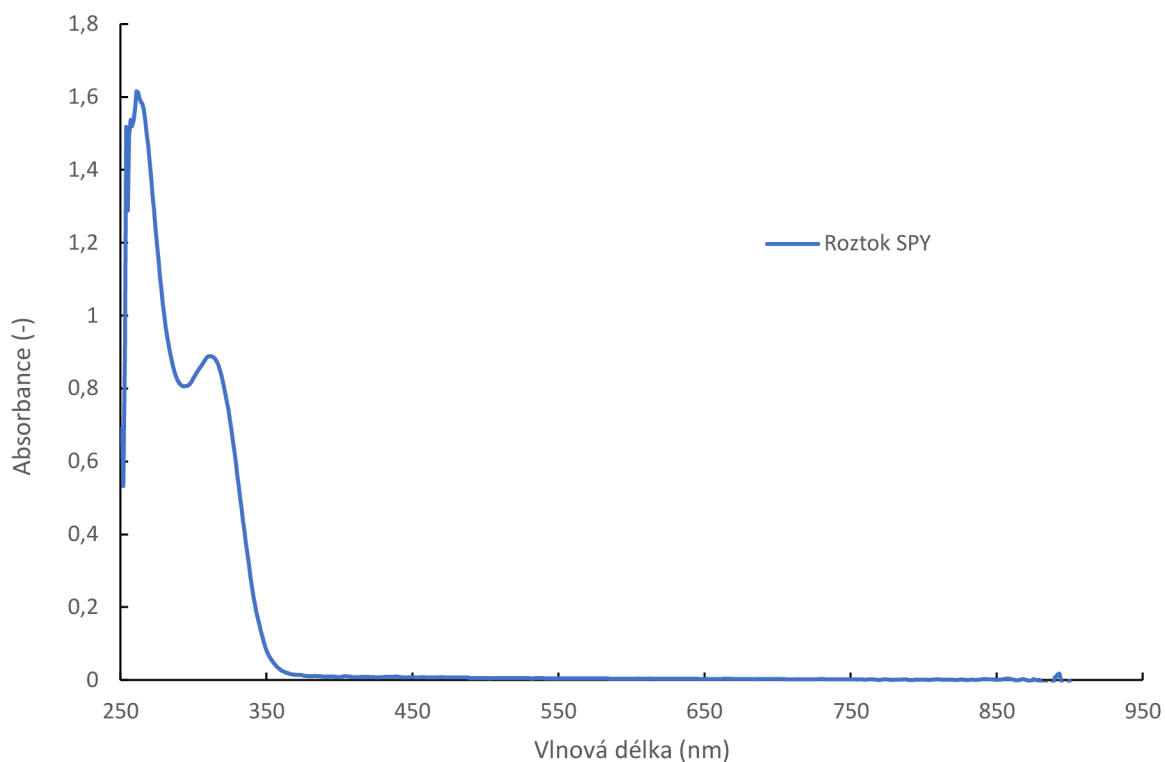
Nastavení a měření UV/VIS spektrofotometrů

Oba přístroje, jak Hitachi, tak Varian byly nastaveny stejně na rozsah vlnových délek 900–200 nm. Hitachi je dvoupraskový spektrofotometr, proto se měřilo vždy oproti destilované vodě. V průběhu měření došlo k prasknutí wolframové lampy u přístroje Hitachi, proto se doměřovalo na přístroji Varian. Přístroj je jednopaprskový, proto se vždy před zahájením našeho měření musela udělat baseline oproti destilované vodě. U samotného měření byl vždy zaznamenán přesný čas odebrání vzorků.

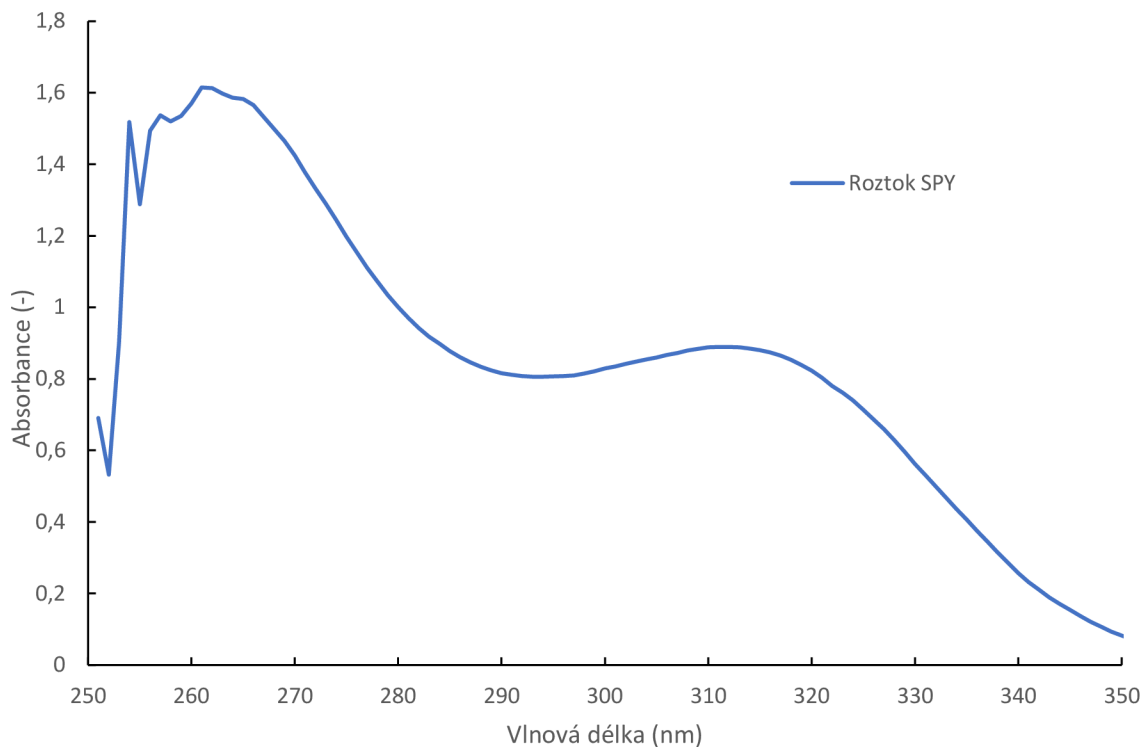
5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Popis absorpčního spektra SPY

Sulfapyridin má dvě absorpční maxima v λ_{312} a λ_{261} . Pro naše účely jsme vybrali pík s absorpčním maximem při 312 nm. Absorbance byla měřena v celém spektru 900–200 nm. V první části absorbance donorové cely postupně klesala, zatímco absorbance akceptorové cely zůstala neměnná (popsáno níže). Na grafu (Obrázek 12) je znázorněno počáteční spektrum donorové cely, tudíž roztoku se SPY. Pro detailnější znázornění je přibližné absorpční spektrum zobrazeno v (Obrázek 13).



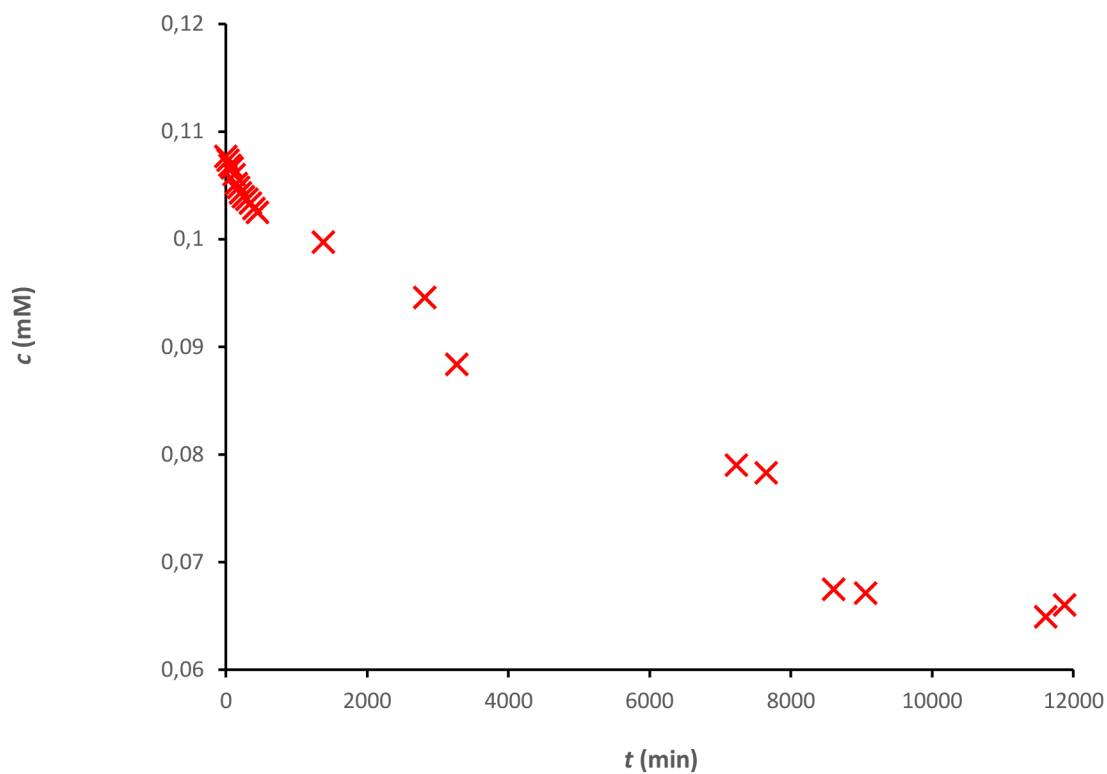
Obrázek 12: Celé absorpční spektrum donorové cely v čas t_0 .



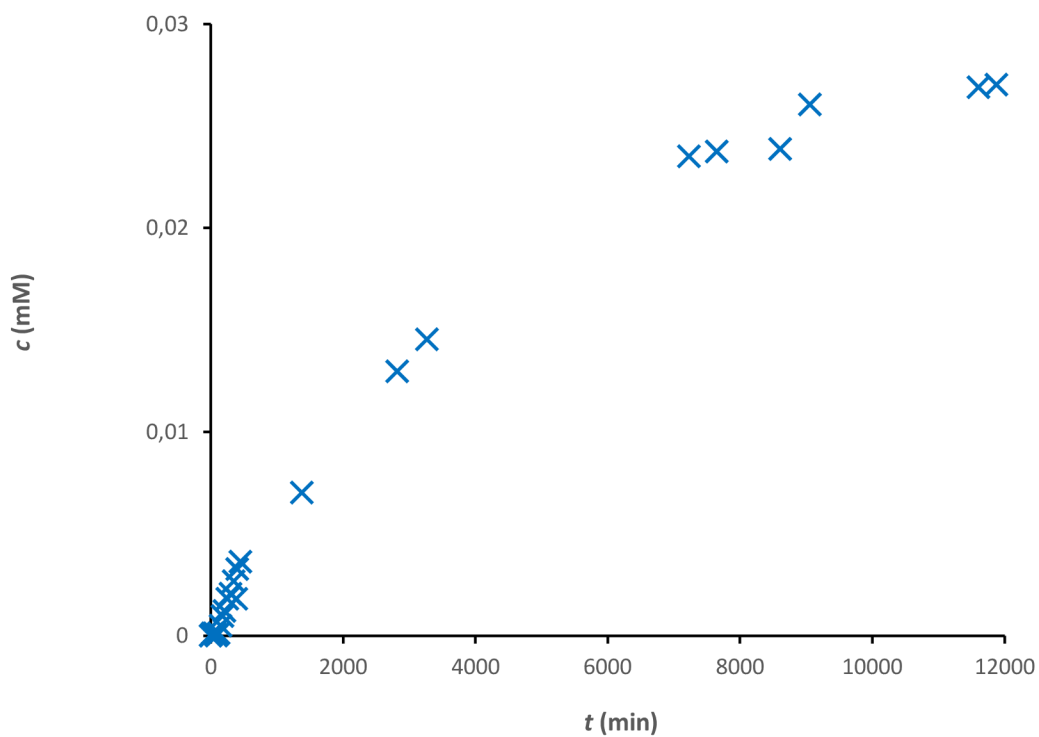
Obrázek 13: Detailnější absorbční spektrum donorové cely v čase t_0 .

5.2 Průběh experimentu v čase

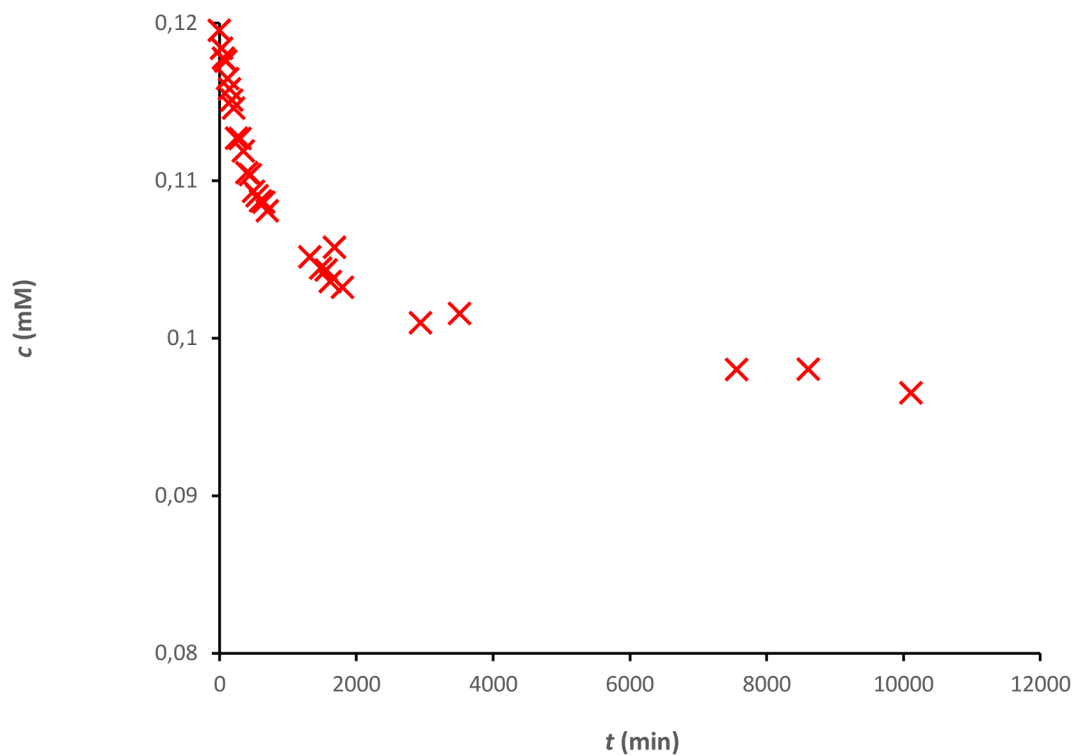
Celé měření každé cely probíhalo v průměru okolo devíti dní, kdy zhruba po pěti dnech se koncentrace v roztocích měnily již velmi málo. Důležitý čas tzv. lag time pro naše výpočty byl čas průchodu SPY hydrogelem. Tento čas byl zcela odlišný pro hydrogel tvořený pouze agarosou a hydrogel s přidávkem huminových látek. Pro samotný hydrogel tomu bylo okolo dvou hodin, zatím co u gelu obsahující huminovou složku tomu bylo až pět a půl hodiny. Při dalších, ne tak častých měřeních už se pozoroval průnik přímo do donorové cely obsahující destilovanou vodu. Následující grafy (Obrázek 14,15,16,17) nám znázorňují příklad průniku SPY v difúzní cele. U grafů s červenou čarou (Obrázek 14,16) byl pozorován celý pokles koncentrace v cele obsahující roztok SPY v závislosti na čase. U grafů s modrou čarou (obrázek 15,17) byl pozorován průnik léčiva přes hydrogel a následný nárůst koncentrace v roztoku původně obsahujícího pouze destilovanou vodu v závislosti na čase.



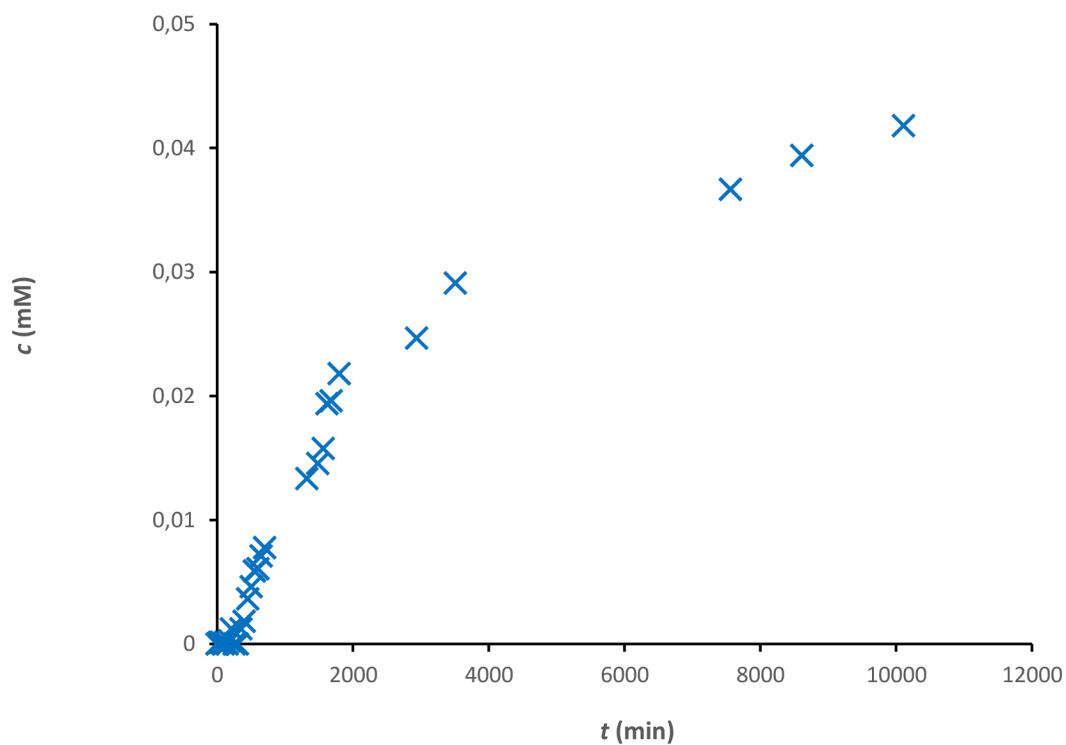
Obrázek 14: Pokles koncentrace SPY v cele s čistým hydrogelem v závislosti na čase.



Obrázek 15: Nárůst koncentrace SPY v cele s čistým hydrogelem v závislosti na čase.

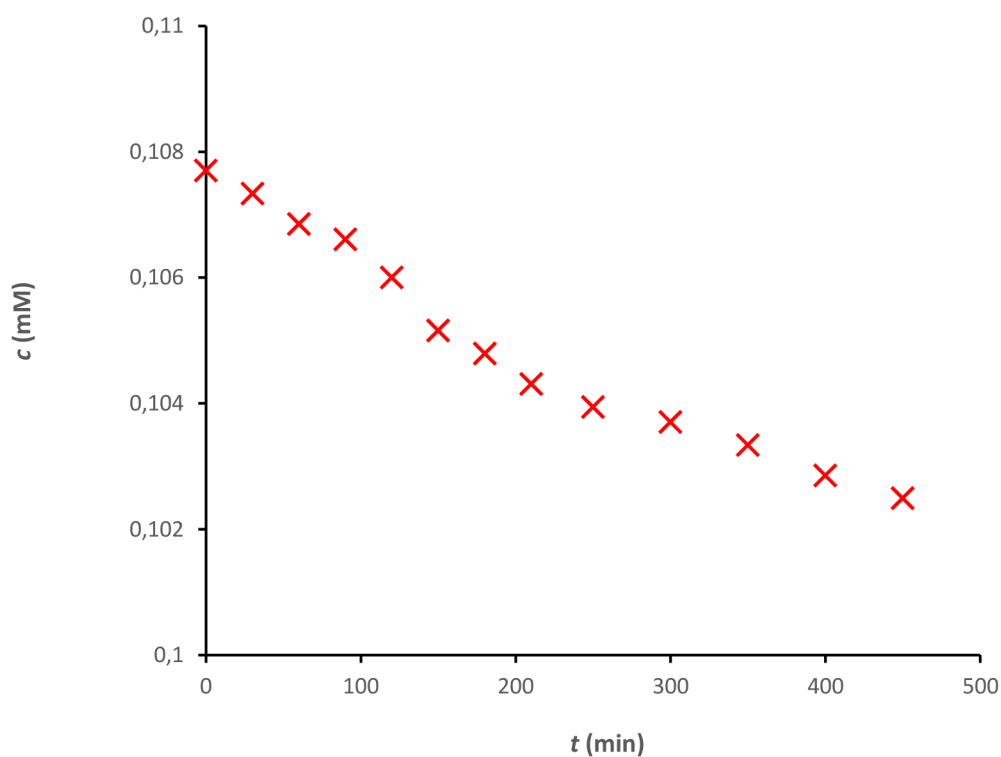


Obrázek 16: Pokles koncentrace SPY v cele s hydrogelem s huminovou látkou.

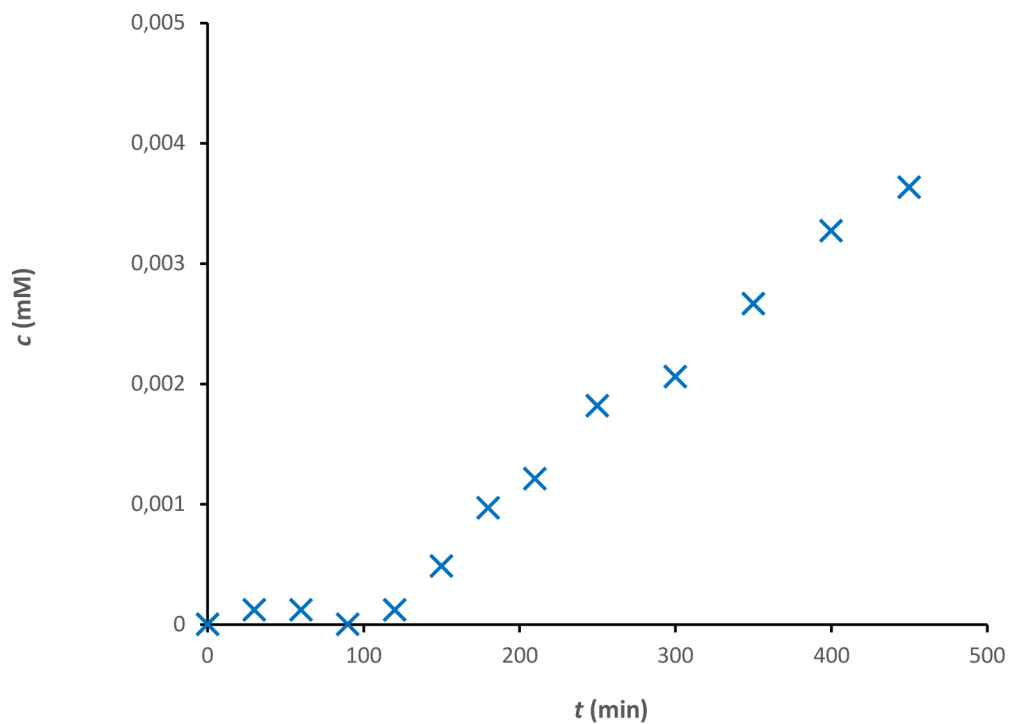


Obrázek 17: Nárůst koncentrace SPY v cele s hydrogelem s huminovou látkou.

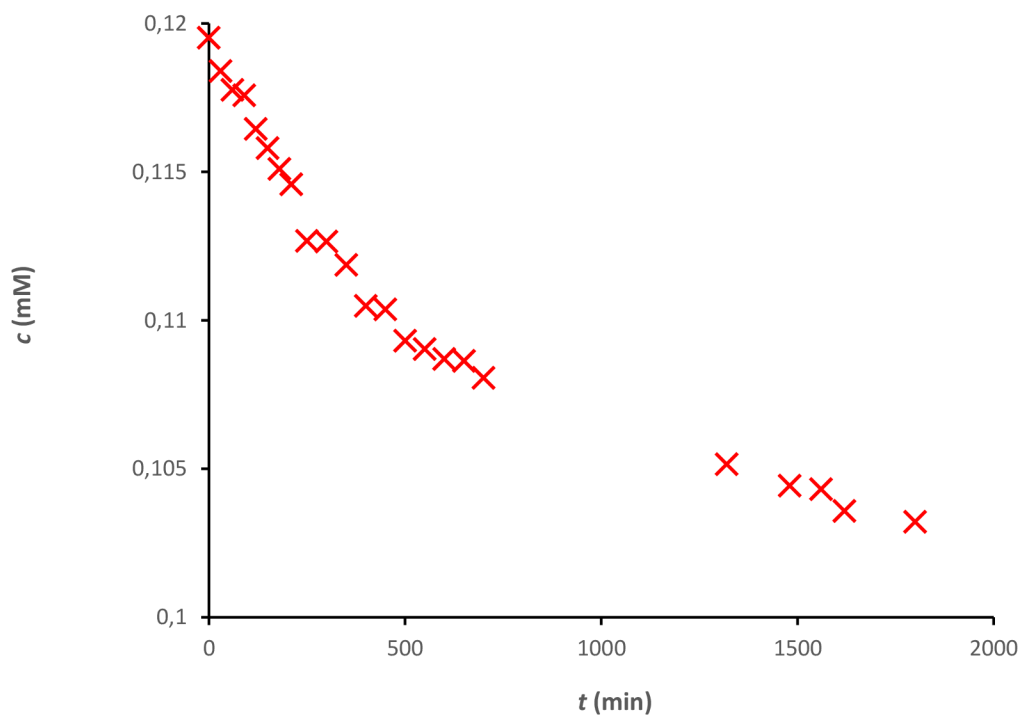
Samotný rozdíl průchodu léčiva je možné pozorovat až při bližším přiblížení, protože průchod SPY přes hydrogel trvá v řádech stovek minut nikoli tisíců, proto jsou následující grafy (Obrázek 18,19,20,21) znázorněny pouze na čase do 500 minut u měření s čistým hydrogelem a do 2 000 minut u měření obsahující hydrogel s huminami. Na těchto grafech si můžeme povšimnout už značného rozdílu hlavně co se týče u grafů (Obrázek 19,21) (znázorňující průchod SPY do druhé cely), kde vidíme, že průnik SPY u grafu s čistým hydrogelem (Obrázek 19) nastává již po 100 minutách, zatím co u grafu s hydrogelem obsahujícím huminy (Obrázek 21) nastává až po 300 minutách. U grafů (Obrázek 18, 20) zaznamenávající pokles koncentrace vidíme u obou podobný pokles koncentrace v závislosti na čase.



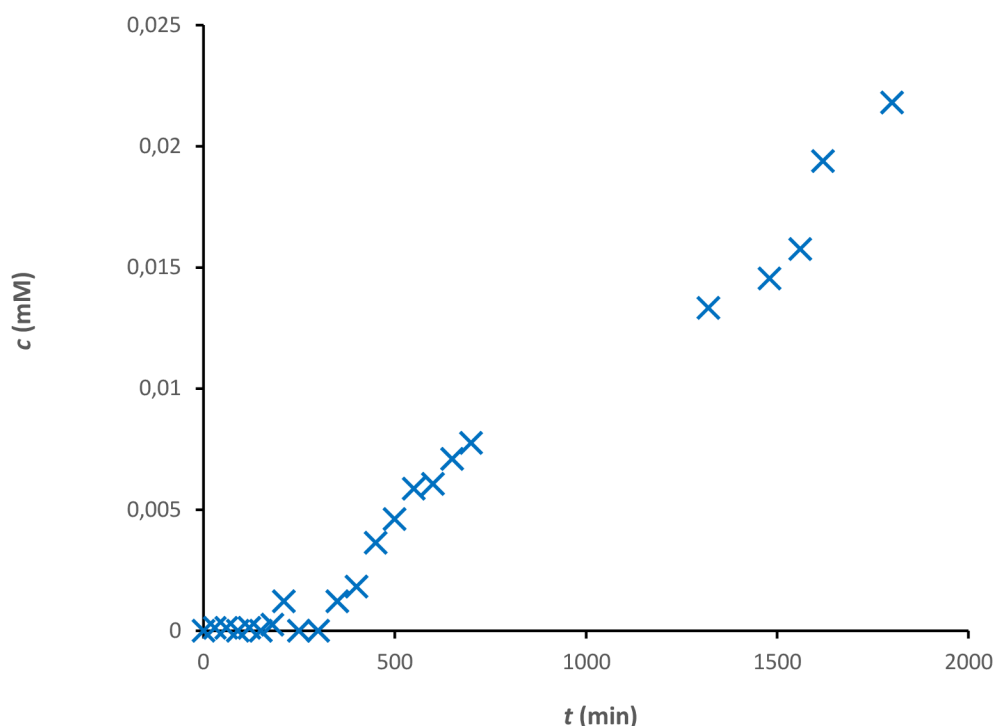
Obrázek 18: Přiblížení poklesu koncentrace SPY v cele s čistým hydrogelem.



Obrázek 19: Pozorování průniku SPY čistým hydrogelem.



Obrázek 20: Přiblížení poklesu koncentrace SPY v cele s hydrogelem obsahujícím huminovou látku.



Obrázek 21: Pozorování průniku SPY hydrogelem obsahujícím huminovou látku.

5.3 Výpočet difúzního koeficientu

V naší práci byly vypočteny dva, respektive tři difúzní koeficient. První difúzní koeficient D_L nám popisuje difúzi v první části procesu. Jedná se o neustálený děj, kdy léčivo prostupuje čistým hydrogelem, kde by nemělo docházet k interakcím s agarósou, která by měla být inertní. Pokud je ale v hydrogelu přítomna aktivní složka, prostupující léčivo interaguje se stále novými neobsazenými vazebnými místy a dochází k jeho částečné imobilizaci. Druhý, respektive druhý a třetí difúzní koeficient D_{E1} a D_{E2} nám popisují průběh difúze v druhé části procesu, kdy léčivo difunduje gelem, který již obsahuje léčivo a dostává se do donorové cely.

Pro výpočet prvního difúzního koeficientu D_L byla použita rovnice ve tvaru,

$$t_L = \frac{L^2}{6D_L} \quad (1)$$

kde t_L je čas za který léčivo projde přes hydrogel a L je tloušťka gelu. Tahle rovnice vychází z předpokladů, že pokud rozpuštěná látka nemůže proniknout do pevné fáze a difunduje pouze do pórů hydrogelu vyplněných roztokem, pak časová prodleva nezávisí na ploše průřezu pórů, ale pouze na tvaru a skutečné délce difúzní dráhy [19] [20] [21].

Důležité pro nás je zjistit tedy čas t_L a tloušťku gelu. Tloušťka gelu byla 0,5 cm. Čas t_L tzv. lag time jsme schopni odečíst z našich naměřených dat (Obrázek 19,21). Lag time pro cely s čistým hydrogelem byl určen jako $t_L = (8011 \pm 234)$ s. Pro cely s hydrogelem obsahující huminové kyseliny byl lag time stanoven jako $t_L = (23384 \pm 760)$ s. Za využití rovnice (1)

byly vypočítány difúzní koeficienty a jejich hodnota byla stanovena pro čistý hydrogel jako $D_L = (5,2 \cdot 10^{-10} \pm 1,52 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$ a pro hydrogel obsahující huminovou kyselinu jako $D_L = (1,78 \cdot 10^{-10} \pm 1,52 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že u vzorku s vyšším difúzním koeficientem dochází k rychlejšímu postupu SPY přes hydrogel, zatímco u menšího difúzního koeficientu postupovalo léčivo pomaleji. To potvrzuje myšlenku, že huminové kyseliny jsou schopny interagovat a částečně mobilizovat léčivo SPY.

Pro stanovení druhého difúzního koeficientu, charakterizující druhou část procesu, kdy je hydrogel zcela nasycen léčivem, byly použity dva způsoby výpočtu. První podle vztahu,

$$-\beta D_{E1} t = \ln \left[\frac{(c_D - c_A)_t}{(c_D - c_A)_0} \right] \quad (2)$$

kde D_{E1} je difúzní koeficient charakterizující druhou část experimentu, $(c_D - c_A)_0$ a $(c_D - c_A)_t$ představují rozdíl mezi molárními koncentracemi difundující látky v donoru a akceptoru v čase 0 a t. Koeficient β je konstanta cely [19] [21][22]. Po dosazení námi známých veličin do rovnice (2) byl stanoven difúzní koeficient pro cely s čistým hydrogelem jako $D_{E1} = (4,62 \cdot 10^{-10} \pm 2,71 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$ a pro cely s hydrogelem obsahující huminovou kyselinu jako $D_{E1} = (4,84 \cdot 10^{-10} \pm 4,14 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$. Výsledky jsou v rámci chyby stejné, a to ukazuje na to, že difuzivita v gelech nasycených léčivem nezávisí na přítomnosti aktivní složky, protože interakce mezi huminovými kyselinami a léčivem již dosáhly rovnováhy.

Pro výpočet třetího difúzního koeficientu, znázorňujícího rovněž druhou část procesu byl využit vztah popsán rovnicí,

$$J = D_{E2} \frac{\Delta c}{L} \quad (3)$$

která je vlastně přeformulovaný 1. Fickův zákon: $J = -D dc/dx$, kde dc je nahrazeno Δc a dx je nahrazeno tloušťkou gelu L [19] [23]. Je to vlastně jiný způsob vypočítání druhé části experimentu. Po dosazení veličin do rovnice (3) vyšel difúzní koeficient pro cely s čistým hydrogelem jako $D_{E2} = (4,93 \cdot 10^{-10} \pm 3,82 \cdot 10^{-11}) \text{ m}^2/\text{s}$ a pro difúzní cely s hydrogelem obsahujícím huminovou kyselinu jako $D_{E2} = (4,91 \cdot 10^{-10} \pm 6,27 \cdot 10^{-12}) \text{ m}^2/\text{s}$. Při srovnání výsledků si můžeme všimnout, že hodnoty jsou téměř stejné a že v rámci chyby jsou srovnatelné i s výpočty podle rovnice (2), pro svoji jednoduchost a možnost charakterizace difúze v ustáleném i neustáleném stavu.

6. ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo za úkol ověřit interakci huminových kyselin s léčivem sulfapyridinem pomocí metody difúzních cel. Tato metoda byla vybrána, protože ještě doposud nebyla použita pro studium interakce léčiv s huminovými kyselinami. Jednalo se o časově náročný experiment, který lze aplikovat na celou řadu nejen léčiv, ale jakýkoliv látek kontaminující půdu.

Hlavním úkolem bylo zjistit, zda huminové kyseliny dokáží pomocí vazebných interakcí imobilizovat léčivo při transportu skrz hydrogel. Experiment se opakoval celkem 8x, když 4x byl použit agarosový gel bez přídavku huminových kyselin a 4x byl použit agarosový gel obsahující huminovou složku. Hlavním problémem experimentu byla časová vyčerpání v průběhu samotného měření. Byť samotný experiment probíhal pouze asi 9 dní, frekvence měření absorbancí nutila k častým návštěvám laboratoře. I přes toto časté měření docházelo k vytváření mrtvých úseků, přes víkend a přes noc. Pro optimalizaci výsledků by bylo nutno pořídit automatický měřicí systém, který by zaznamenával změny absorbance ve vlnových délkách 200-400 nm přibližně každých 30 minut. To by vedlo k přesnějším hodnotám a výsledkům difúzních koeficientů.

V první fázi výpočtu difúzního koeficient byl zkoumán čas průchodu, ten nám ukazuje, jak dlouho léčivo procházelo skrz agarosový gel. Po výpočtu difúzních koeficientů bylo zjištěno, že difúzní koeficient je u čistého hydrogelu skoro 3x větší, což potvrzuje interakci sulfapyridinu s huminovou kyselinou.

V druhé fázi experimentu byl zkoumán prostup léčiva do donorové cely. Tento difúzní koeficient byl počítán dvěma způsoby podle rovnic (2) a (3). Pro část měření pouze s agarosovým gelem i pro měření s gelem obsahujícím huminovou kyselinu byly difúzní koeficienty v rámci chyby měření stejné. To nám potvrdilo, že v druhé části experimentu jsou zřejmě interakce léčiva s huminovými kyselinami již v rovnováze, což již nemá významný vliv na probíhající difúzi.

7. LITERATURA

- [1] Černý, J., Balík, J., Kulhánek, M., & Sedlář, O. *Organická hmota v půdě, její obsah, složky a význam*. Retrieved May 21, 2022
- [2] M. Peña-Méndez, E., Havel, J., & Patočka, J. (2005). Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine, 12.
- [3] Faiyz, Y. (2012). CPMAS 13C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste, 15. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.018>
- [4] Veselá, L., Kubal, M., Kozler, J., & Innemanová, P. (2005). Structure and Properties of Natural Humic Substances of the Oxyhumolite Type, 7.
- [5] Hampl, F., & Paleček, J. (2005). FARMAKOCHEMIE. VŠCHT Praha.
- [6] Hydrocodone. Wikipedie. Retrieved May 23, 2022, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrocodone>
- [7] Hanslianová, M. Antibiotika včera, dnes a zítra. Retrieved May 23, 2022, from <https://www.fnbrno.cz/antibiotika-vcera-dnes-a-zitra/t5753>
- [8] Penicilin. Wikipedie. Retrieved May 23, 2022, from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Penicilin>
- [9] Xu, T., Du, J., Zhang, J., & Werner, D. Microbially-mediated synthesis of activated carbon derived from cottonseed husks for enhanced sulfanilamide removal, 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127811>
- [10] Moreno, V., Adnane, A., Salghi, R., Zougagh, M., & Ríos, A. Nanostructured hybrid surface enhancement Raman scattering substrate for the rapid determination of sulfapyridine in milk samples, 6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.047>
- [11] Delgado, D., Rodriguez, G., & Martinez, F. Thermodynamic study of the solubility of sulfapyridine in some ethanol + water mixtures. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.11.001>
- [12] Bertin, S., Yates, K., & Petrie, B. Enantiospecific behaviour of chiral drugs in soil, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114364>
- [13] Slavíková, J., & Švíglerová, J. (2012). Fyziologie dýchání. Nakladatelství Karolinum.
- [14] Difuze. Wikiskripta. Retrieved May 22, 2022, from <https://www.wikiskripta.eu/w/Difuze>
- [15] Chen, K. -L., Liu, L. -C., & Chen, W. -R. Adsorption of sulfamethoxazole and sulfapyridine antibiotics in high organic content soils, 9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.011>
- [16] Filep, T., Szabó, L., Kondor, A. C., & Szalai, Z. ´án. Evaluation of the effect of the intrinsic chemical properties of pharmaceutically active compounds (PhACs) on sorption behaviour in soils and goethite. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112120>
- [17] Natural organic matter research. Retrieved May 25, 2022, from <https://humic-substances.org/>

- [18] Caldwell, W., Freedman, B., Settles, L., Thomas, M., & Wirkus, S. The Vicodin abuse problem: A mathematical approach, 12.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.110003>
- [19] Sedlacek, P.; Smilek, J.; Klucakova, M. How interactions with polyelectrolytes affect mobility of low molecular ions—Results from diffusion cells. *React. Funct. Polym.* 2013, 73, 1500.
- [20] Smilek, J.; Sedlacek, P.; Kalina, P.; Klucakova, M. On the role of humic acids' carboxyl groups in the binding of charged organic compounds. *Chemosphere* **2015**, 138, 503.
- [21] Klucakova, M.; Smilek, J.; Sedlacek, P. How humic acids affect the rheological and transport properties of hydrogels. *Molecules* 2019, 24, 1545.
- [22] Frisch, H.L. The time lag in diffusion. *J. Phys. Chem.* **1957**, 61, 93.
- [23] Shackelford, CH.D., Moore, S.D. Fickian diffusion of radionuclides for engineered containment barriers: Diffusion coefficients porosities and complication issues, *Eng. Geol.* **2013**, 152, 133.