

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kristýna Kovářová

FYTOEXTRAKCE METFORMINU

Phytoextraction of Metformin

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2015

Poděkování

V úvodu své práce bych velmi ráda poděkovala Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odborné vedení, poskytnuté konzultace a připomínky k bakalářské práci. Dále bych ráda poděkovala Ing. Šárce Pšondrové, která se také podílela na přípravách a vedení této práce. Poděkování patří také mé rodině, která mě při studiu podporovala.

Abstrakt

Skupina látek zahrnující humánní a veterinární prostředky, kosmetické přípravky a parfémy, drogy, detergenty a hnojiva je souhrnným názvem označována jako *Farmaka a Produkty Osobní Péče* (Pharmaceuticals and Personal Care Products – PPCPs). Do skupiny PPCPs patří i metformin, hojně předepisované léčivo k léčbě diabetu mellitu 2. typu. Metformin není v lidském těle metabolizován a je vyloučen ledvinami v původní formě. Tímto způsobem kontaminuje komunální odpadní vody. Čistírny odpadních vod nejsou obvykle schopny kompletně odstranit znečištění farmaky a část přechází do povrchových vod. V bakalářské práci byla studována schopnost odstranění nízkých koncentrací metforminu pomocí fytoextrakce kukuřicí setou (*Zea mays*). Media rostlin byla kontaminována dvěma koncentracemi metforminu a během kultivace rostlin byly odebírány vzorky media v intervalech 24 hodin. V těchto vzorcích byl zkoumán pokles koncentrace metforminu pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Pokles činil asi 15 – 20 % denně. Dále byla analyzována extrahovatelná rezidua pomocí TLC a bylo zjištěno, že metformin byl extrahován pouze kořenovou částí rostliny. Schopnost použitých rostlin extrahovat metformin byla stanovena na 0,01 g metforminu na 1 g rostliny za 24 hodin.

Klíčová slova: fytoremediace, fytoextrakce, HPLC, odpadní vody, metformin

Abstract

A group of substances including human and veterinary products, cosmetic products, perfumes, drugs, detergents and fertilizers is called the Pharmaceutical and Personal Care Products. PPCPs include also metformin, which is a widely prescribed drug for the treatment of the diabetes mellitus type 2. Metformin isn't metabolized in human body and is eliminated by kidneys in its original form. This way the metformin contaminates municipal wastewater. Wastewater treatment plants aren't usually able to clear pollution by pharmaceuticals completely, so part of them gets into the surface water. The ability to eliminate low concentrations of metformin via phytoextraction by *Zea mays* was studied in this thesis. The media of plants were contaminated by two levels of metformin concentration and during the plant cultivation the samples of media were taken in 24 hours interval. The decrease of metformin concentration in the samples was studied by HPLC with UV detection at 233 nm. The decrease was about 15 – 20 % per one day. Afterwards the extractable residues were analysed by TLC and it was found out, that metformin was extracted only by a root part of the plants. The ability of plants to extract metformin was determined at 0,01 g of metformin per 1 gram of plant per 24 hours.

Keywords: phytoremediation, phytoextraction, HPLC, wastewater, metformin

Obsah

Poděkování	3
Abstrakt	4
Abstract.....	5
Seznam zkratk.....	8
1 Úvod.....	9
2 Cíl práce	14
3 Teoretická část	15
3.1 Fytoremediace.....	15
3.1.1 Fytodegradace	15
3.1.2 Fytostabilizace.....	16
3.1.3 Fytovolatilizace	16
3.1.4 Fytoextrakce	16
3.1.5 Fytofiltrace	16
3.1.6 Rhizodegradace	17
3.2 Výhody fytoremediačních metod.....	18
3.3 Nevýhody fytoremediačních metod.....	19
3.4 Perorální antidiabetika	19
3.4.1 Metformin.....	20
3.4.1.1 Metformin v léčbě DM 2. typu.....	20
3.4.1.2 Metformin a životní prostředí.....	22
4 Experimentální část.....	23
4.1 Přístrojové vybavení	23
4.2 Chemikálie	23
4.3 Specifikace rostlinného materiálu.....	25
4.4 Postup práce	25
4.4.1 Kultivace sterilních rostlin	25
4.4.2 Odběr vzorků k analýze.....	26
4.4.3 HLPC analýza	27
4.4.4 Izolace rostlinných částí a jejich následná extrakce.....	28
chloroformem.....	28
4.4.5 Analýza HG media	28
5 Výsledky a diskuse	29
5.1 Kalibrační přímka metforminu	29

5.2	Studium fytoextrakce metforminu	30
5.3	Analýza pevných extraktů pomocí TLC	35
5.4	Analýza použitého media.....	35
6	Závěr	39
	Citovaná literatura	40

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ČOV	Čistírna odpadních vod
DM 2. typu	Diabetes mellitus 2. typu
ELISA	Enzymaticky značená imunoanalýza
HG medium	Hoagland medium
HDL	Lipoproteinové částice s vysokou hustotou
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC – MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní tandemovou detekcí
KČOV	Kořenová čistírna odpadních vod
LDL	Lipoproteinové částice s nízkou hustotou
MS medium	Murashige and Skoog medium
PAD	Perorální antidiabetika
PPCPs	Farmaka a produkty osobní péče
SDS	Dodecylsulfát sodný
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
UČOV	Ústřední čistírna odpadních vod
UV	Ultrafialový

1 Úvod

Velký rozvoj farmaceutického průmyslu a farmakoterapie v minulém století, především v 80. a 90. letech, výrazně zvýšil výrobu a spotřebu léčiv využívaných v humánním a veterinárním lékařství a rovněž chemických výrobků využívaných jako parfémů, kosmetické a hygienické přípravky, legální či nelegální drogy a detergenty. Celá skupina těchto látek, která zahrnuje přes 100 000 xenobiotik [1], je souhrnným názvem označována názvem „farmaka a produkty osobní péče“ (Pharmaceuticals and Personal Care Products, ve zkratce PPCPs). Tento pojem vznikl v roce 1999 a na veřejnost ji uvedli dva američtí vědci Christian G. Daughton a Thomas A. Ternes [2]. Tyto látky samozřejmě přispěly ke zlepšení kvality života, a proto jsou v hojné míře využívány, ať už se jedná o farmaka ve zdravotnictví, či použití spotřební chemie v každé domácnosti. Všechny tyto prostředky se vyrábí ve velkém množství a jejich využívání bohužel přináší i negativní vlivy, a to především na životní prostředí, primárně na vodní toky. Přesto, že se do životního prostředí dostávají tyto látky několik desítek let, jejich výskyt a odstranění ze životního prostředí se studuje relativně krátce.

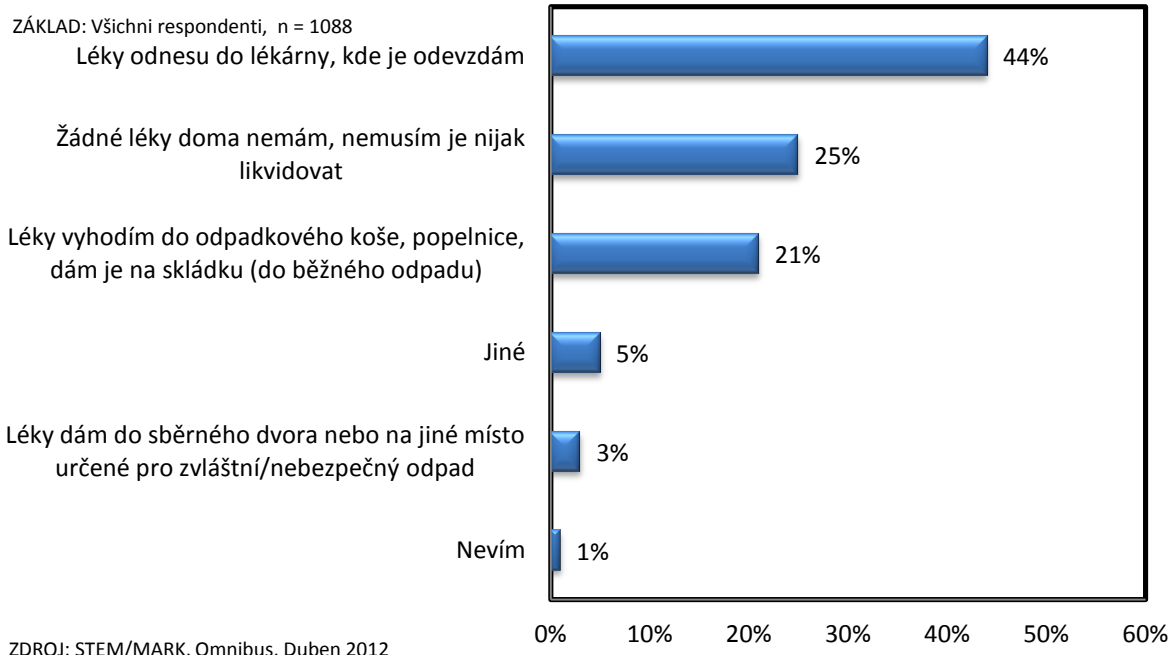
Významným zdrojem znečištění životního prostředí ze skupiny PPCPs jsou farmaka. Dvě nejvíce zkoumané skupiny farmak negativně působící na životní prostředí jsou antibiotika a steroidní hormony [3]. Antibiotika se začala ve velkém množství používat v posledních desítkách let minulého století a jejich spotřeba na trhu v řádech tun stále roste. Nutno však konstatovat, že tempo růstu spotřeby antibiotik kleslo ze 4,0 % v roce 2007 na 1,4 % v roce 2008 [4]. Primární farmaka a také produkty jejich metabolismu se nachází v odpadních vodách, v povrchové vodě, v podzemní vodě a rovněž i v půdě. Vstup antibiotik a jejich vyloučených metabolitů do životního prostředí může mít vliv na rezistence patogenních organismů způsobujících onemocnění, dochází k mutacím organismů a k vzniku jejich nových vlastností [5]. Druhou již zmíněnou skupinou farmak ohrožujících životní prostředí, jsou hormony, zejména orální antikoncepční přípravky, které mohou v povrchových vodách působit na rozmnožování vodních živočichů. Kanadští a američtí vědci provedli sedmiletý experiment v izolovaném jezeře v severozápadní části Ontaria [6]. Vodní střeve (*Pimephales promelas*) byly vystaveny syntetickému estrogeneru 17 α -ethynylestradiolu, který je součástí orální antikoncepce. I nízké koncentrace této látky jako 5 – 6 ng · L⁻¹ výrazně ovlivnily pohlavní život těchto živočichů. U samců se po nějaké době začala vytvářet

bílkovina vitellogenin, která je za normálních okolností přítomna pouze v samičích jikrách. Samci se měnili na samičky, popř. u nich byly v jejich pohlavních žlázách nalezeny pohlavní buňky samčí i samičí – žili jako tzv. *intersex*. Hormon také poznamenal samičí populaci střevlí, byla u nich zjištěna nižší plodnost. Již po dvou letech experimentu byl zaznamenán velký pokles střevlí v jezeře. Mladé ryby se kvůli změnám pohlaví dospělých ryb nevyvíjely a ty dospělé zanikaly, což vedlo k úplnému zániku populace střevlí v tomto izolovaném jezeře.

Primárním zdrojem farmak v životním prostředí nejsou jejich výrobci, ale spotřebitelé – tedy člověk. Farmaka a jejich metabolity se dostávají do přírody jednoduchou cestou. Farmaka jsou v organismu metabolizována na rozpustnější formu, popř. není jejich struktura vůbec pozměněna a tyto původní a vzniklé metabolizované látky jsou vyloučené močí a výkaly [7] a dostávají se do komunálních odpadních vod. Čistírny odpadních vod neodstraní většinu látek úplně a kontaminanty tak přechází do výstupní vody, která se vypouští do řek. Tímto způsobem xenobiotika kontaminují nejdříve vodní systém a vodní organismy, poté dochází ke kontaminaci celého ekosystému a to přímo vodou, nebo prostřednictvím potravních řetězců. Následným problémem je pak využití povrchové vody pro přípravu pitné vody. Technologie úpravy vody na pitnou nejsou zcela dokonalé a nedokážou z vody odstranit veškerá farmaka a jejich metabolity a tak se jejich zbytky se tak vracejí s přijatou vodou zpět do lidského organismu. Tím se koloběh farmak v životním prostředí uzavírá.

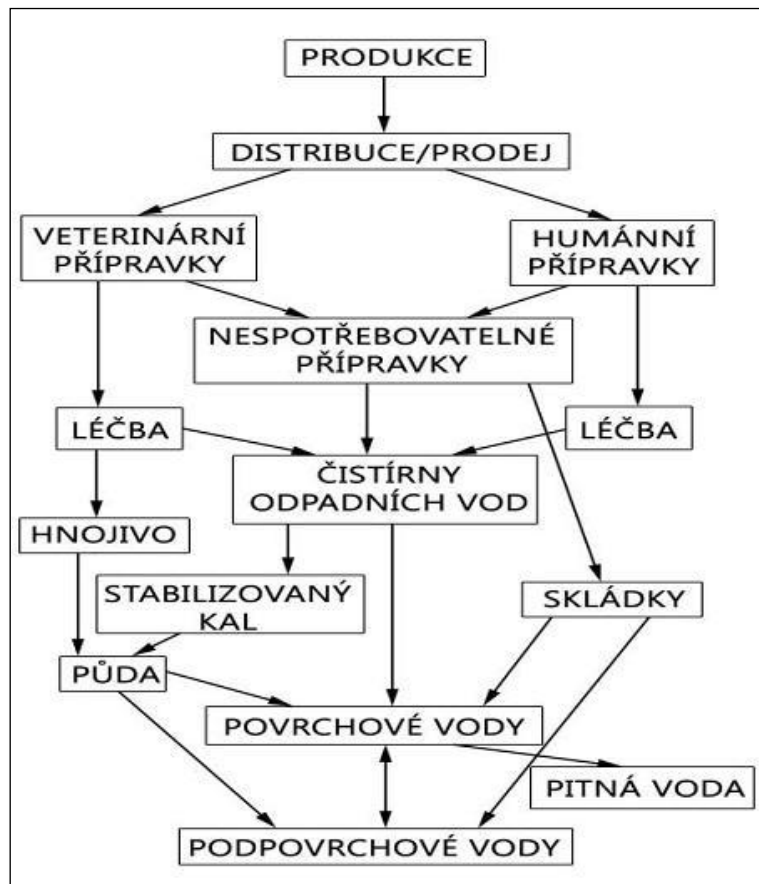
Další způsob, jakým se mohou farmaka dostávat do životního prostředí, je mimo vyloučení močí a výkaly také nesprávná likvidace farmak. Nepoužité či zbylé léky by se měly odevzdat v lékárnách nebo nemocnicích, tak jak je psáno na každém příbalovém letáku. Výzkum společnosti STEM/MARK pro značku Zentiva v roce 2012 ukázal, že téměř jedna pětina obyvatel žijících v České republice likviduje nevyužitá farmaka vyhozením do odpadkového koše [8]. Tento problém byl především identifikován u generace do 30 let věku. Dále lze z výzkumu říci, že nejčastěji vyhazují do odpadu léky obyvatelé ve větších městech nad 100 000 obyvatel, z pohledu regionů nejvíce lidé z Libereckého kraje, nejméně ze Středočeského. Nepoužité léky odnáší do lékárny jen 44 % dotazovaných respondentů, z toho je asi polovina respondentů starších 60 let. Výsledky testu jsou zobrazeny v obrázku č. 1.

Z4: Co děláte s léky, které nespotřebujete?



Obrázek č. 1 : Výsledky výzkumu společnosti STEM/MARK pro značku Zentiva [8]

Jak již bylo zmíněno výše, čistírny odpadních vod nejsou schopny veškerá farmaka zcela odstranit, a tak zbytkové kontaminanty přecházejí do výstupní vody, která se zpravidla vypouští do řek a tím koloběh kontaminantů začíná. Následující obrázek č. 2 zobrazuje osud léčiv a jejich metabolitů v životním prostředí.



Obrázek č. 2 : Tok léčiv a jejich metabolitů do životního prostředí [9].

Povrchové vody, nejvíce střední a dolní toky řek, kde se nachází nejvíce čistíren odpadních vod (ČOV), jsou nejvíce exponovanou částí životního prostředí. U podzemních vod bylo provedeno jen málo měření zabývajících se jejich kontaminací polutanty [9], avšak v již uskutečněných měřeních bylo zjištěno, že 80 % kontaminovaných podzemních vod se nachází maximálně do 20 metrů hloubky od zemského povrchu [10]. Naopak v pitné vodě, u níž se provádí neustálé kontroly, bylo nalezeno velké množství léčiv a jejich transformačních produktů. Kyselina klofibrová, transformační produkt klofibrátu, jenž je součástí léčiv ke snížení hladiny tuků v krvi, byla nalezena v Německu v povrchové vodě v koncentraci až $270 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ [11]. V České republice byly pak nalezeny syntetické estrogény ve vodní nádrži Želivka v koncentraci až $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ [12]. V České republice byly dále v letech 2007 a 2008 analyzovány výtoky z některých ČOV, konkrétně Ústřední čistírna odpadních vod (ÚČOV) v Praze – Podbabě a ČOV v Hostinném [13]. Pro stanovení byla použita metoda HPLC s UV detekcí a mezí stanovitelnosti $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. V odebraných vzorcích byly nalezeny kyselina

salicylová, ibuprofen, karbamazepin a diklofenak. Z tohoto průzkumu jasně plyne, že ČOV nejsou schopné zcela vyčistit vstupní vodu od veškerých xenobiotik a tím se xenobiotika, i když v nepatrném množství, dostávají do koloběhu v životním prostředí.

2 Cíl práce

Léčivo metformin představuje hojně využívané perorální antidiabetikum (APO-metformin, Glucophage, Siofor). Terapeutické dávky u pacientů překračují minimálně 1 g účinné substance za den, přičemž látka není metabolizována a vylučuje se v původní formě ledvinovou exkrecí. Při vysokém výskytu diabetu mellitu 2. typu v populaci, představuje tato látka biquanidového typu vysokou zátěž pro komunální odpadní vody a lze předpokládat i určitý průnik původní substance přes čistírny odpadních vod.

Cílem práce je studium možností zachytu zbytkových koncentrací metforminu pomocí fyto-remediační technologie.

Vlastní práce zahrnuje:

- 1) Studium literatury týkající se metforminu, jeho použití, chemických vlastností a osudu v organismu.
- 2) Studium známých ekotoxikologických interakcí s rostlinami.
- 3) Experimentální studium fytoextrakce metforminu v *in vitro* uspořádání s rostlinami *Zea mays* při dvou hladinách kontaminace živného média.
- 4) Studium extrahovatelných reziduí a případných exsudovaných látek do média.
- 5) Vyhodnocení experimentů.

3 Teoretická část

3.1 Fytoremediace

Způsobů, kterých se využívá k dočištění povrchových vod od xenobiotik, je několik. Jsou to například fotodegradace, biodegradace, sorpce, chemická oxidace, membránové metody a využití aktivního uhlí [9]. Tyto metody mají především tu nevýhodu, že jsou finančně velmi náročné a při transportu kontaminovaných materiálů může docházet k sekundární kontaminaci [14]. Z tohoto důvodu se v posledních letech začalo využívat metod *in situ*, které jsou pro životní prostředí ekonomicky přijatelnější a méně náročné. Tyto metody se nazývají fytoremediační. Fytoremediace je pojem, který označuje proces, při němž se využívají rostliny k odstraňování polutantů a xenobiotik ze životního prostředí [15]. Název fytoremediace se používá již od roku 1991 a tato technologie se často používá ve formě kořenové čistírny odpadních vod (KČOV) [9, 15]. Polutanty přístupné pro rostliny z půdy, sedimentů, podzemních i povrchových vod a z atmosféry, mohou být jak anorganického, tak organického původu [16]. Mezi časté anorganické polutanty patří radionuklidy, ionty kovů (Pb, Hg, Cd, Zn, Cu) a dusičnany a fosforečnany z průmyslových hnojiv. K organickým polutantům se řadí PPCPs, tedy čisticí a desinfekční prostředky, kosmetické přípravky, chemické látky používané k hygieně, výbušniny, rozpouštědla, insekticidy a pesticidy a také farmaka. Fytoremediační techniky zahrnují různé postupy, které jsou závislé na chemické povaze a vlastnostech kontaminující látky a také na vlastnostech rostlin. Na základě toho můžeme fytoremediační metody rozdělit na několik rozdílných technik. Jsou to fytodegradace (fytotransformace), fytostabilizace (fytoimobilizace), fytovolatilizace, fytoextrakce (fytoakumulace), fytofiltrace (rhizofiltrace) a rhizodegradace (fytostimulace).

3.1.1 Fytodegradace

Fytodegradace, nebo také fytotransformace je metoda používaná hlavně pro organické polutanty, které jsou metabolizovány a degradovány uvnitř rostlinných buněk pomocí specifických a nespecifických enzymů, jako jsou např. nitroreduktasy a

dehalogenasy [14]. Mezi nevýhody této metody patří fakt, že při dekadačních pochodech může dojít ke vzniku toxičtější sloučeniny než původní polutant [16].

3.1.2 Fytostabilizace

Fytostabilizace, neboli fytoimobilizace, jak název napovídá, je metoda, při které se využívá schopnosti rostlin imobilizovat polutanty pomocí kořenů rostlin a tak zabránit jejich dalšímu šíření do půdy, podzemní vody a potravních řetězců [14, 16, 17]. Dochází ke vzniku nerozpustné formy polutantu zabudovaného do orgánových struktur [18]. Metoda je vhodná jak pro organické, tak anorganické polutanty [14].

3.1.3 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je technika, která využívá schopnost některých rostlin absorbovat kontaminanty z kořenového systému a transportovat ho do ovzduší, kde dojde k jeho naředění. Metoda je vhodná pro ionty prvků například II.B, V.A a VI.A skupiny (Hg, Se, As), které jsou absorbovány kořenovým systémem rostliny, přeměněny na jinou formu a transpirovány do ovzduší [14].

3.1.4 Fytoextrakce

Fytoextrakce, neboli fytoakumulace využívá schopnosti rostliny absorbovat polutant svými kořeny a transportovat jej do nadzemní části rostliny, kde je uložen. Rostliny jsou poté sklizeny a zpracovány (termicky, mikrobiálně, chemicky) [16, 17]. Fytoextrakce se využívá pro anorganické látky (radionuklidy a těžké kovy), ale také pro organické sloučeniny, např. farmaka [14].

3.1.5 Fytofiltrace

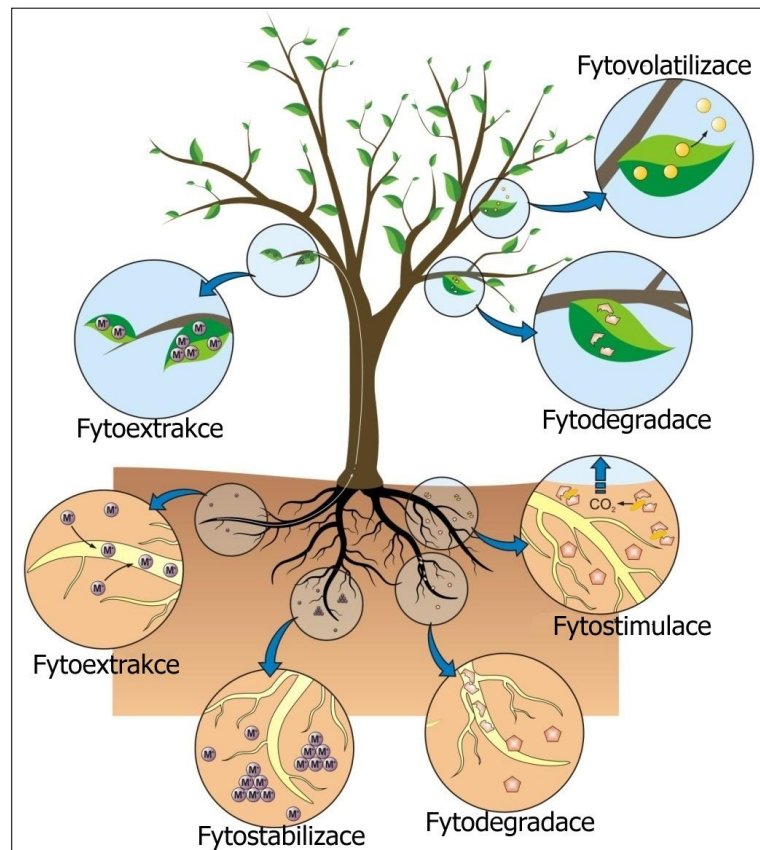
Fytofiltrace (rhizofiltrace) je metoda podobná fytoextrakci a je vhodná pro těžké kovy a radioaktivní prvky. Při fytofiltraci není kontaminant na rozdíl od fytoextrakce transportován do nadzemní části rostliny, ale je pouze uložen na a v kořenech rostlin.

Nejvhodnější rostliny pro použití této metody jsou ty, které mají rozvinutý kořenový systém a tím pádem velkou akumulaci kapacity [14, 16, 18].

3.1.6 Rhizodegradace

Rhizodegradace (fytostimulace) je poslední metoda z fytoremediačních technik. Kořenové exsudáty a metabolické produkty rostliny podporují množení ve rhizosféře se vyskytujících bakterií a mikroorganismů, které napomáhají rozkládat složitější organické polutanty na jednodušší látky [14, 18].

Na obrázku číslo 3. Jsou schematicky znázorněny fytoremediační metody.



Obrázek č. 3: Schematické znázornění fytoremediačních metod [14].

V tabulce č. 1. je přehled fytořediačních metod a jejich využití.

Tabulka č. 1.: Přehled fytořediačních metod a jejich využití

Metoda	Polutanty [14, 18]	Typické rostliny, bakterie [14, 16]
Fytodegradace	Organické polutanty (chlorované uhlovodíky, aromatické uhlovodíky, nitrosloučeniny, ropné deriváty, výbušniny)	<i>Myriophyllum spicatum</i>
Fytostabilizace	Organické i anorganické polutanty	<i>Haumaniastrum sp.</i> <i>Eragrostis sp.</i>
Fytovolatilizace	Organické polutanty anorganické ionty kovů (Hg, Se, As)	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Brassica napus</i>
Fytoextrakce	Anorganické ionty kovů (Cd, Ni, Zn, Pb), radionuklidy, organická farmaka	<i>Thlaspi carulescens</i>
Fytofiltrace	Těžké kovy a radioaktivní prvky	<i>Helianthus annuus</i> <i>Brassica juncea</i> <i>Salix sp.</i>
Rhizodegradace	Organické sloučeniny	<i>Pseudomonas (bakterie)</i>

3.2 Výhody fytořediačních metod

Mezi hlavní výhody fytořediačních metod patří [10]:

- „*In situ*“ aplikace
- Energie se získává ze slunečního záření

- Nízká finanční náročnost v porovnání s tradičními dekontaminačními metodami
- Vhodné pro různé typy kontaminantů
- Přijatelné pro veřejnost
- Estetický přínos

3.3 Nevýhody fytořediačních metod

Mezi nevýhody fytořediačních metod patří: [10]

- Pomalejší než mechanické metody
- Vyšší koncentrace kontaminantů mohou být toxické pro rostlinu, popř. pro živočichy konzumující tyto rostliny a tím se zcela kontaminuje potravní řetězec
- Toxicita biodegradačních produktů kontaminantů není zcela známá
- Kontaminanty mohou být přenášeny do povrchových i podzemních vod a půd
- Metody závisí na půdních a klimatických podmínkách

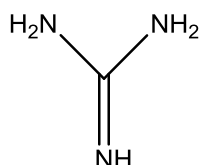
3.4 Perorální antidiabetika

Perorální antidiabetika (PAD) jsou léky, které se používají k léčbě diabetu mellitu 2. typu [19]. Některé z nich, např. deriváty sulfonylmočoviny, se využívají již přes 50 let, konkrétně od roku 1957, některé potom až od konce 20. století [20]. Diabetes mellitus 2. typu je onemocnění, které je podmíněno dvěma základními biologickými defekty, kterými jsou 1. postupné snižování citlivosti periferních tkání na inzulin (*tzv. inzulinová rezistence*) a 2. neschopnost β – buněk pankreatu zvýšit produkci inzulinu tak, aby byla tato inzulinová rezistence překonána (*tzv. inzulinová deficiencie*). [20] . PAD zahrnují několik skupin léků s různými účinky, z nichž nejčastější je zlepšení citlivosti buněk periferních tkání na inzulin [19].

Jednou z velmi používaných skupin PAD, jejichž historie sahá do první poloviny 20. století, jsou biguanidy [20]. Jediný bezpečný derivát biguanidů, který se k léčbě DM 2. typu používá a který je také vysoce účinný, je metformin.

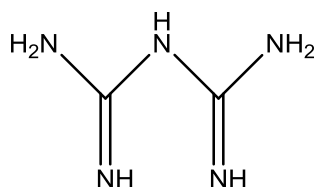
3.4.1 Metformin

Metformin je organická sloučenina, jejíž strukturní základ tvoří guanidin (obrázek č. 4).



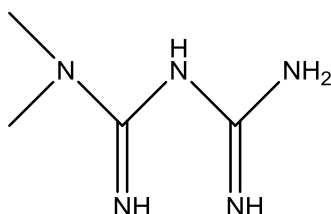
Obrázek č. 4 – Vzorek guanidinu jako základ metforminu

Spojením 2 guanidinů přes atom dusíku vzniká biguanid (obrázek č. 5).



Obrázek č. 5 – Vzorec biguanidu

Dvojnásobnou methyloací aminového dusíku vzniká metformin, neboli 1,1 – dimethylbiguanid (obrázek č. 6).



Obrázek č. 6 – Vzorec metforminu

3.4.1.1 Metformin v léčbě DM 2. typu

Metformin je jediným používaným bezpečným lékem k léčbě DM 2. typu ze skupiny biguanidů. Je znám přes 50 let [21] a je považován za lék první volby při léčbě DM 2. typu [22]. I přesto, že je lék již dlouhou dobu využíván, některé mechanismy jeho účinku nejsou zcela vyjasněny, pravděpodobně zasahuje do oxidačního řetězce v mitochondriích hepatocytů [20, 22]. Důsledky těchto účinků však známy jsou, patří

k nim především snížení produkce glukózy v játrech (snížení glukoneogeneze, ale nezpůsobuje hypoglykemii) a zvýšení citlivosti periferních tkání na inzulin [20]. Další účinky metforminu jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Efekty metforminu [20]

Při léčbě metforminem lze očekávat tyto efekty:	
Snížení glykemie na lačno	20 – 30 %
Snížení glykemie po jídle	30 – 40 %
Snížení triacylglycerolemie	0 – 30 %
Snížení LDL – cholesterolu	0 – 25 %
Snížení volných mastných kyselin	0 – 14 %
Zvýšení HDL – cholesterolu	0 – 17 %
Snížení tělesné hmotnosti	0 – 6 %

Metformin se vstřebává v tenkém střevě, biologická dostupnost je 50 – 60 %, maximální hladiny v plazmě dosahuje asi 2 hodiny od podání, poločas eliminace záleží na lékové formě a dávce, ale pohybuje se okolo 4 – 6 hodin, v těle není prakticky metabolizován a je vylučován ledvinami [20, 22].

Mezi nežádoucí účinky metforminu patří gastrointestinální potíže, průjem, kovová chuť v ústech, při dlouhodobém používání může vést ke snížení absorpce vitamínu B12 [19, 20]. Nejzávažnější a zároveň velmi vzácný (0,03 případů na 1000 léčených osob za rok) nežádoucí účinek je laktátová acidosa. Její vznik je však podmíněn selháním nějakého orgánu, např. ledvin, srdce, poruchou funkce jater, poruchou dýchacího systému, nebo požitím alkoholu [20].

Maximální dávka metforminu je 2000 – 2550 mg za den, některé prameny uvádí až 3000 mg za den [20].

V současné době se metformin vyskytuje v těchto komerčních preparátech: [19].

- Siofor 500, 850, 1000
- Apo – Metformin 500, 850, 1000
- Metformin – Teva 500, 850, 1000
- Glukophage 500, 850, 1000

- Metfogamma 500, 850,1000
- Stadamet 500, 850, 1000

3.4.1.2 Metformin a životní prostředí

Metformin je, vzhledem ke své vysoké využívanosti při léčbě DM 2. typu, v současné době jedním z nejčastějších léčiv, které se nachází v životním prostředí [23]. V ČOV v Milwaukee v USA byl metformin nalezen v koncentracích od $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ do $47 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, v povrchových vodách v koncentracích od $0,06 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ do $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Byl proveden experiment, do jaké míry metformin ovlivňuje vodní organismy. Jako modelové vodní organismy byly použity střevle (*Pimephales promelas*). V experimentu bylo 12 párů (samec – samice) vystaveno po dobu 28 dní metforminu o koncentraci $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, což je podobná koncentrace, jaká byla nalezena v ČOV. Další 12 párů bylo použito jako kontrolní vzorky. Analýza metforminu ve vodě byla stanovena pomocí HPLC – MS/MS. V kontrolních vzorcích nebyl metformin detegován, v exponovaných vzorcích byl detegován v koncentraci $41 \pm 8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Po 28 dnech expozice metforminem byly střevle usmrceny, z ocasní tepny byla odebrána krev a pomocí centrifugy byla získána plazma k analýze bílkoviny vitellogeninu. Hladina vitellogeninu byla měřena pomocí specifické enzymaticky značené imunoanalýzy (ELISA), absorbance byla měřena při 450 nm a koncentrace byla vypočítána pomocí kalibrační křivky. Hladiny vitellogeninu u exponovaných a kontrolních samic se výrazně nelišily, hladiny vitellogeninu u exponovaných samců byly více než 2 krát větší. Vitellogenin je bílkovina, která je za normálních okolností přítomna pouze v samičích jikrách. Z tohoto výzkumu vyplývá, že metformin zvyšuje hladinu vitellogeninu u samců, a vyvolává narušení žláz s vnitřní sekrecí. Vitellogenin tedy může být použit jako specifický marker narušení endokrinních žláz při kontaminaci vodního prostředí a vystavení vodních střevlí cizorodým látkám [23].

4 Experimentální část

4.1 Přístrojové vybavení

- HPLC systém Schimadzu skládající se z vysokotlakého čerpadla LC – 20AD, UV detektoru SPD – 20A, dávkovacího kohoutu Rheodyne (20 μ l), kolony Watrex o rozměrech 250 x 4 mm se sorbentem Reprosil 100 C18 (5 μ m) a vyhodnocovacího softwaru Clarity (DataApex)
- Tlakový hrnec na sterilizaci medií a nádobí Morphy Richards Rapid Cook
- pH metr ISFET mini Lab, model IQ 125
- Kahan Fuego pro, WLD – Tec
- Magnetické míchadlo Wise Stir $\text{\textcircled{R}}$, MSH – 20D
- UV lampa typ Nu – 4KL, 220 V, 254 nm
- Vakuová rotační odparka Laborota 4002 – digital (Heidolph)
- Ultrazvuková lázeň Fisherbrand $\text{\textcircled{R}}$ FB 15050
- Laminární box s vertikálním prouděním, typ FBB 120(Labox)
- Elektronická horkovzdušná pistole HG 3002 LCD (Steinel)
- TLC destičky ALUGRAM $\text{\textcircled{R}}$ SIL G/UV 254, 2,5 x 7 cm (Macherey – Nagel)
- Mrazicí box (– 20 $^{\circ}$ C) (Liebherr)

4.2 Chemikálie

- Metformin izolován z Metfogamma 500 potahové tablety, výrobce Wörwag Pharma GmbH (Německo)
- Savo Original 900 ml, UNILEVER ČR spol. s.r.o.
- Methanol HPLC Gradient Grade (čistota 99,8 %, J. T. Baker)
- Acetonitril HPLC (čistota 99,9 %, Lab – Scan)
- Dodecylsulfát sodný (čistota 99,8%, Sigma – Aldrich)
- Chloroform (čistota 99,8 %, Lach – Ner s.r.o.)
- Hydrogenuhličitan sodný (Lach – Ner, s.r.o.)
- Síran hořečnatý bezvodý čistý (Lach – Ner, s.r.o)

- Mořský písek SEA SAND (Lach – Ner, s.r.o.)
- *N*-guanylmočovina (čistota 97 %, Sigma – Aldrich)
- Chemikálie pro přípravu Murashige and Skoog media a Hoaglandova media byly kvality p.a. (Lach – Ner, s.r.o.)

Složení Murashige and Skoog (MS) media a Hoaglandova (HG) media jsou uvedena v tabulkách 3 a 4.

Tabulka č. 3 – Složení Murashige and Skoog media

Chemikálie	Koncentrace [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]
Sacharosa	30000
<i>Myo</i> -inositol	100
Makro prvky	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
Mikro prvky	
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	8,3
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
Fe^{II} komplex	
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	37,2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8

Tabulka č. 4 – Složení Hoagland media

Chemikálie	Množství [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	115
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	656
KNO_3	657
MgSO_4	242
Mikro prvky	
H_3BO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	8,3
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
Fe^{II} komplex	
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	37,2
$\text{FeSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	27,8
pH media bylo upraveno na 5,9	

4.3 Specifikace rostlinného materiálu

Ke studiu fytoextrakce metforminu byla použita semena kukuřice seté (*Zea mays*) polní kultivar DKC 4014 (Monsanto ČR, s.r.o.). Kultivace byly prováděny na MS a HG mediích.

4.4 Postup práce

4.4.1 Kultivace sterilních rostlin

Rostlinná semena byla nejprve odmaštěna 70% ethanolem po dobu 30 vteřin, poté 20% roztokem Sava po dobu 10 minut, dále 10% roztokem Sava po dobu 20 minut

a nakonec třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Následně byla semena za sterilních podmínek přenesena v laminárním boxu do Erlenmeyerových baněk o objemu 500 mL (do každé baňky 4 semena). Každá baňka obsahovala 15 mL sterilního Murashige a Skoog media. Semena byla kultivována v místnosti při teplotě 24 °C a při osvětlení zářivkami White Cool (Philips) 40 W/m² v režimu 12 h světlo/12 h tma. Kontaminované kultivace, v nichž byla objevena plíseň, byly postupně likvidovány. Po dosažení požadované velikosti rostlin (po 10 – 14 dnech kultivace) bylo ke kukuřicím přidáno Hoagland medium (100 mL do každé baňky) a zásobní roztok metforminu o koncentraci 2 mg · mL⁻¹ tak, aby výsledná koncentrace metforminu v přidaném HG mediu byla 15 mg · L⁻¹. Stejným postupem byla provedena druhá výsadba, do níž byl zásobní roztok metforminu o koncentraci 2 mg · mL⁻¹ přidán tak, aby jeho výsledná koncentrace v přidaném HG mediu byla 10 mg · L⁻¹.

4.4.2 Odběr vzorků k analýze

Ihned po přidání metforminu ke kultivaci byl sterilně z každé Erlenmeyerovy baňky odebrán vzorek ke stanovení výchozí koncentrace. Každá Erlenmeyerova baňka byla poté opět sterilně uzavřena alobalem. Odebrané vzorky byly uloženy v mrazicím boxu pro následnou analýzu. Následující 4 dny vždy po 24 hodinách byly vzorky odebírány pomocí sterilní jehly a injekční stříkačky. Po 5 dnech byla v některých baňkách pozorovatelná kontaminace a ve všech, i nekontaminovaných kultivacích, rostliny vykazovaly známky poruch růstu. Odebírání vzorků bylo proto ukončeno, nekontaminované rostliny byly omyty v destilované vodě a uchovány v mrazicím boxu pro další analýzy. Veškeré nekontaminované zbylé medium bylo spojeno a také uchováno v mrazicím boxu pro další analýzy. U části nekontaminovaných rostlin byl ještě proveden odběr vzorku media přesně týden od přidání metforminu, déle již nebylo možné vzorky kvůli poruchám růstu a odumírání rostlin odebírat.

Na obrázku č. 7 je ukázka sterilní kultivace kukuřice *Zea mays*. Tato kukuřice byla kultivována 14 dnů bez metforminu a dále ještě 5 dní s metforminem. Snímek je pořízen pátý den odběru media s metforminem.



Obrázek č. 7 – Ukázka kultivace kukuřice (*Zea mays*) ve sterilní Erlenmeyerově baňce.

4.4.3 HLPC analýza

Pro výzkum fytoextrakce metforminu pomocí kukuřice (*Zea mays*) byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Mobilní fází byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, detekce při 233 nm. Tato vlnová délka byla zvolena na základě publikovaných dat zabývajících se analýzou metforminu, ve kterých se hodnota detekce při 233 nm objevovala nejčastěji [24, 25, 26].

Nejprve byla měřena kalibrační řada metforminu, s jednotlivými koncentracemi 20; 15; 12,5; 10; 5; 2,5 a $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ metforminu v HG mediu. Získaná data byla použita pro výpočet kalibrační přímky. Dále byly měřeny jednotlivé odebrané vzorky – vždy vzorek

jedné kultivace od prvního do posledního dne odběru - čímž byly získány koncentrace metforminu v jednotlivých odběrech.

4.4.4 Izolace rostlinných částí a jejich následná extrakce chloroformem

Po rozmražení rostlin v teplé vodní lázni byly odděleny kořeny od zelených rostlin a obě části byly zváženy. Kořeny a zelené rostliny byly zvlášť homogenizovány v třecí misce s přidavkem mořského písku. Vzniklá suspenze byla přelita do baňky o objemu 250 mL a pomocí 10% roztoku hydrogenuhličitanu sodného zalkalizována na hodnotu pH 9 – 10. Po úpravě pH byl roztok 3 krát extrahován destilovaným chloroformem. Organické fáze byly ze zkumavky odebírány pomocí injekční stříkačky s jehlou do Erlenmeyerovy baňky a následně byly přes noc vysušeny bezvodým síranem hořečnatým. Poté bylo sušidlo odfiltrováno a filtrát byl odpařen na vakuové rotační odparce. Pevný odparek byl zvážen.

Analýza odparků byla provedena pomocí TLC. Část odparků kořenů i zelených rostlin byla rozpuštěna chloroformu a nanesena na tenkou vrstvu. Jako standard byl použit metformin rozpuštěný v chloroformu. Mobilní fází byl methanol, detekce byla provedena pod UV lampou o vlnové délce 254 nm. Zbylé odpařené extrakty byly uchovány v mrazicím boxu pro další analýzy.

4.4.5 Analýza HG media

HG medium spojené po ukončení kultivace kukuřic a uchované v mrazicím boxu, bylo rozmraženo a naředěno s mobilní fází v poměru 1 : 1 (v/v). Takto vzniklý vzorek media byl analyzován pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm a za stejných podmínek jako analýzy odebíraných vzorků medií.

5 Výsledky a diskuse

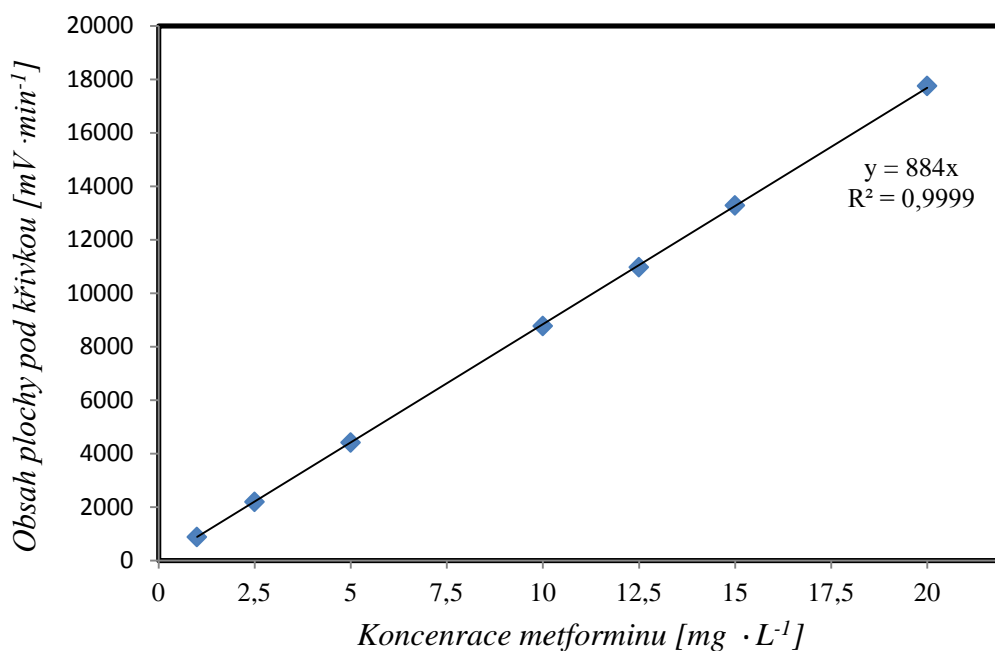
V práci byla zkoumána fytoextrakce metforminu pomocí *in vitro* kultivovaných rostlin kukuřice seté (*Zea mays*).

Při prvním experimentu byl ke kultivacím přidán roztok metforminu tak, aby výsledná koncentrace metforminu ve 100 mL přidaného HG media byla $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a při druhém experimentu potom $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. V jednotlivých kultivacích byly prováděny postupné odběry vzorků ve 24 – hodinových intervalech a byla sledována časová závislost poklesu koncentrace metforminu v mediu. Kořenové a nadzemní části rostliny byly poté analyzovány na obsah metforminu pomocí TLC, spojené medium bylo analyzováno pomocí HPLC u UV detekcí při 233 nm.

5.1 Kalibrační přímka metforminu

Pro kalibraci metforminu byly použity roztoky o koncentracích 20; 15; 12,5; 10; 5; 2,5 a $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ metforminu rozpuštěného v HG mediu. Mobilní fázi byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), detekce při 233 nm, průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Kalibrační přímka metforminu je zobrazena v grafu č. 1.

Kalibrační přímka metforminu



Graf č. 1 – Kalibrační přímka metforminu

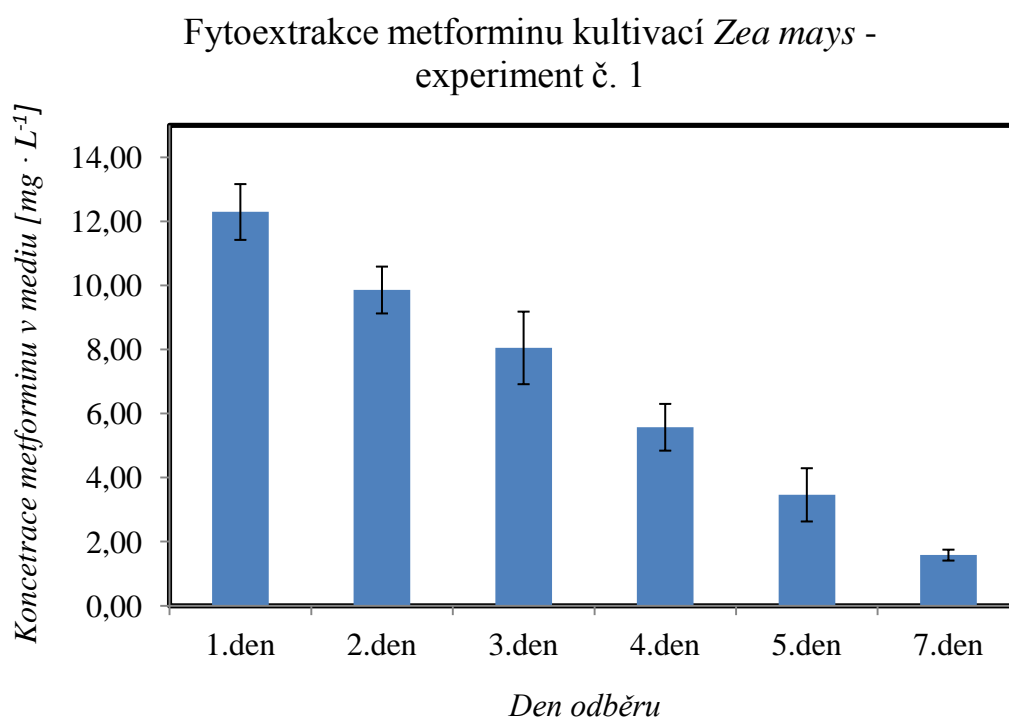
5.2 Studium fytoextrakce metforminu

Hodnoty koncentrací v odebraných mediích jednotlivých kultivací byly stanoveny postupně v časové posloupnosti s intervalem odběru 24 hodin. Některé naměřené hodnoty se velmi odchylovaly od průměrných vypočítaných hodnot, popř. se hodnota koncentrace metforminu v mediu v průběhu stanovení jedné kultivace zvyšovala. Tyto hodnoty byly v průběhu vyhodnocení ze systému vyloučeny, a proto je u každého výsledného grafu uveden počet vzorků medií, ze kterých se vycházelo. Důvodem anomálních hodnot může být například odumírání či kontaminace rostliny během její kultivace nebo reakce na jakýkoliv vnější podnět. Odumírání rostlinných tkání může vést k zpětnému uvolňování absorbovaného či adsorbovaného metforminu do kultivačního média. Tyto procesy však nebyly předmětem výzkumu této bakalářské práce.

Při prvním experimentu byl přidán metformin prostřednictvím zásobního roztoku o koncentraci $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tak, aby jeho výsledná koncentrace ve 100 mL

přidaného HG media byla $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Skutečná výchozí koncentrace byla stanovena pomocí HPLC systému s UV detekcí při 233 nm. Průměrná hodnota výchozí koncentrace metforminu byla $12,29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Rozdíl teoretické a přesně stanovené výchozí koncentrace metforminu může být způsoben tím, že množství zásobního roztoku metforminu bylo přepočteno na 100 mL přidaného HG media, ale v téměř všech kultivacích zbylo ještě nějaké MS medium, jehož množství se u jednotlivých kultivací lišilo a objem se nedal změřit. Druhým, a zřejmě podstatnějším, důvodem rozdílných hodnot teoretické a přesně stanovené výchozí koncentrace může být okamžitá primární adsorpce metforminu na povrch kořenů rostlin, která nesouvisí s metabolickými a fytoextrakčními pochody, nicméně snižuje aktuální koncentraci studované látky v roztoku.

Hodnoty koncentrací metforminu v mediu klesaly s každým dnem odběru, což se také předpokládalo. Koncentrace metforminu klesala téměř lineárně a to přibližně o 15 – 20 % oproti předchozímu dni odběru. Hodnoty klesající koncentrace metforminu v mediu v $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ včetně směrodatné odchylky jsou zobrazeny v grafu č. 2.



Graf č. 2 – Fytoextrakce metforminu kultivací *Zea mays* – experiment č. 1

Dny odběru znamenají tyto časové úseky od přidání metforminu: 1. den = 0 hodin, 2. den = 24 hodin, 3. den = 48 hodin, 4. den = 72 hodin, 5. den = 96 hodin, 7. den = 144 hodin. Koncentrace metforminu byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fáze byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), , průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

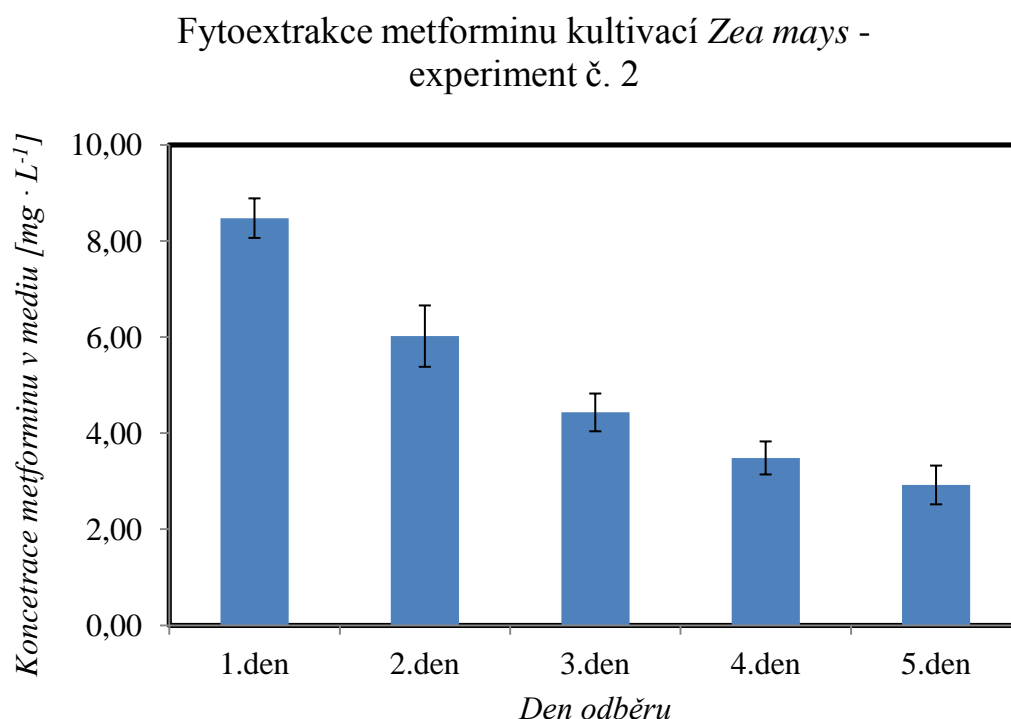
Pro tento experiment bylo použito celkem 15 kultivací kukuřice. Z 10 kultivací byly vzorky odebírány jen prvních pět dnů, poté vykazovaly media kontaminaci a kukuřice odumíraly, odběr bylo nutné ukončit a nekontaminované rostliny i spojené medium uchovat v mrazícím boxu pro následné analýzy. U 5 zbývajících byl proveden odběr ještě sedmý den, tedy 144 hodin od přidání metforminu. První až čtvrtý den klesaly jednotlivé koncentrace metforminu v HG mediu odebraném od všech kultivací rovnoměrně o 15 – 20 % oproti předchozímu odběru. Pátý den se u jedné kukuřice hodnota koncentrace metforminu v mediu oproti předchozímu 4. dni zvýšila, u další kukuřice se hodnota koncentrace metforminu v mediu odebraném 5. den od přidání metforminu téměř nelišila od hodnoty koncentrace metforminu v mediu odebraném 4. den od přidání metforminu. Tyto dvě hodnoty byly proto z dat vyloučeny. Metabolické procesy v rostlinách nebyly studovány, a tudíž není znám ani důvod, proč byla fytoextrakce metforminu těmito rostlinami narušena. Průměrné hodnoty koncentrací metforminu v mediu se počítaly 1. – 4. den odběru z 15 vzorků, 5. den se vycházelo ze 13 odebraných vzorků a 7. den od přidání metforminu jen z 5 odebraných vzorků.

Můžeme se domnívat, že by koncentrace metforminu v mediích odebraných delší časovou jednotku od nadávkování stále klesala, možná by se nacházela pod limitem detekce nastavené metody. Tato teorie však nemohla být kvůli kontaminacím medií a odumírání rostlin potvrzena, ani vyvrácena.

V druhém experimentu byl přidán metformin prostřednictvím zásobního roztoku o koncentraci $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tak, aby jeho výsledná koncentrace ve 100 mL přidaného HG media byla $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Skutečná výchozí koncentrace byla stanovena pomocí HPLC systému s UV detekcí při 233 nm a její hodnota byla $8,47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Opět může být rozdíl teoretické a stanovené koncentrace způsoben tím, že množství zásobního roztoku metforminu bylo přepočteno na 100 mL přidaného HG media a nepočítalo se se

zbytkovým množstvím MS media; druhý důvod rozdílných koncentrací může být okamžitá primární adsorpce metforminu na povrch kořenů kukuřice, která nesouvisí s metabolickými a fytoextrakčními procesy.

Hodnoty koncentrací metforminu v mediu opět klesaly s každým dnem odběru, což se také předpokládalo. Pro měření byly použity stejné podmínky, jako při proměřování kalibrační přímky metforminu a při prvním experimentu studia fytoextrakce. Hodnoty klesající koncentrace metforminu včetně směrodatné odchylky v mediu jsou zobrazeny v grafu č. 3.



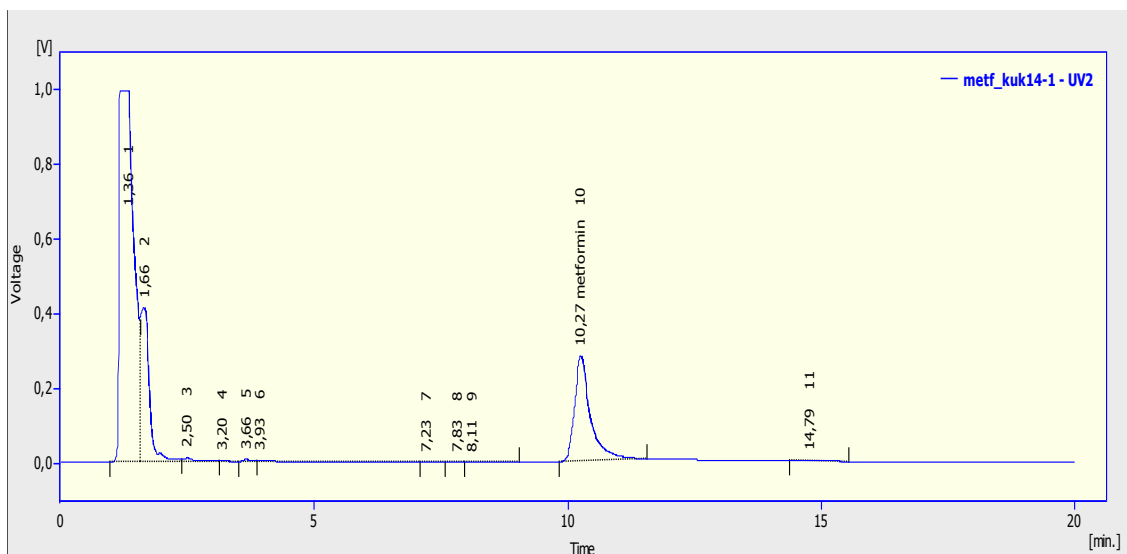
Graf č. 3 – Fytoextrakce metforminu kultivací *Zea mays* – experiment č. 2

Dny odběru znamenají časové úseky od přidání metforminu: 1. den = 0 hodin, 2. den = 24 hodin, 3. den = 48 hodin, 4. den = 72 hodin, 5. den = 96 hodin. Koncentrace metforminu byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fáze byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), , průtok mobilní fáze 1,2 mL · min⁻¹.

Pro tento experiment bylo použito celkem 8 kultivací kukuřice *Zea mays*. Odběr media od všech kukuřic probíhal 5 dní od přidání první dávky metforminu. Hodnoty jednotlivých koncentrací metforminu v mediu klesaly každý následující den odběru, tentokrát nejvíc mezi prvním a druhým dnem od nadávkování metforminu (téměř o 30% výchozí naměřené koncentrace). Polovina výchozí koncentrace metforminu v mediu byla naměřena třetí den od nadávkování, pátý den bylo v mediu stanoveno průměrně 30 % výchozí koncentrace metforminu.

Opět je možné domnívat se, že by koncentrace metforminu v mediích odebraných delší časovou jednotku od nadávkování stále klesala a nacházela by se pod limitem detekce nastavené metody. Tato teorie však nemohla být vzhledem kontaminacím medií a odumírání rostlin ani potvrzena, ani vyvrácena.

Na obrázku č. 8 je ukázka chromatogramu metforminu. První píky eluující v 2. – 3. minutě jsou složky HG a MS medií. Metformin eluuje v 11. minutě. Tento pík odpovídá metforminu v HG mediu o koncentraci $7,92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.



Obrázek č. 8 – Chromatogram metforminu

Koncentrace metforminu byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fází byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), , průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Dále byla vyhodnocena schopnost fytoextrakce metforminu na 1 gram rostliny u 10 kukuřic. Jejich celková hmotnost byla 75,9 g. Do těchto 10 rostlin bylo prostřednictvím zásobního roztoku metforminu přidáno celkem 15 mg metforminu. Celkové průměrné množství metforminu 5. den odběru media těchto 10 kultivací bylo 3,43 mg. Pokles činil 77,13 %. Jeden gram rostliny je schopen extrahovat 0,05 g metforminu během 5 dnů, tedy průměrně 0,01 g metforminu za 24 hodin.

5.3 Analýza pevných extraktů pomocí TLC

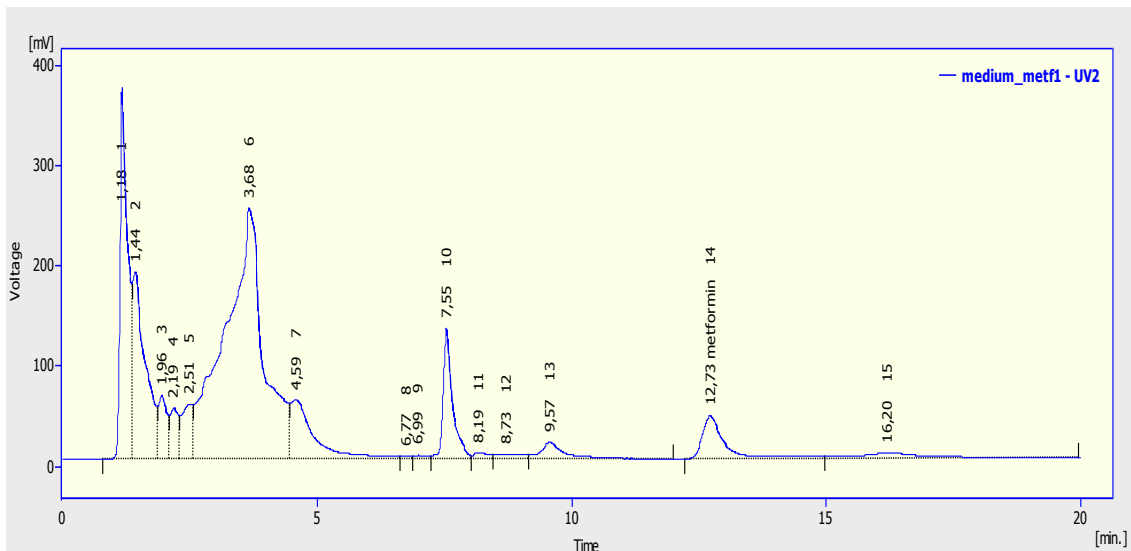
Analýza odpařených extraktů nadzemních a kořenových částí rostlin byla provedena pomocí TLC. Malé množství odparek kořenů i nadzemních částí rostlin bylo rozpuštěno v chloroformu a nanášeno na tenkou vrstvu. Jako standard byl použit pevný metformin rozpuštěný v chloroformu. Mobilní fází byl methanol, detekce byla provedena pod UV lampou o vlnové délce 254 nm.

Tato analýza prokázala přítomnost metforminu pouze v kořenové části experimentálních rostlin. V nadzemních částech nebyla sledovaná látka prokázána. Z toho lze usuzovat žádnou či minimální translokaci studovaného xenobiotika v rostlině. Určitou možností je potom transformace metforminu enzymovými systémy rostlinného metabolismu na jinou látku, jejíž přítomnost nelze takto jednoduchým způsobem prokázat ve složité matici extraktu ze zelených částí rostlin. V kořenové části může být přítomnost metforminu důsledkem sorpce na povrch kořenů či absorpce do vnitřních částí tkáně. Vzhledem k pečlivému omytí kořenů a značné rozpustnosti metforminu ve vodě lze usuzovat aktivní či pasivní absorpci do kořenové tkáně.

5.4 Analýza použitého media

HG medium spojené po ukončení kultivace kukuřic a uchované v mrazícím boxu bylo rozmrazeno a naředěno s mobilní fází v poměru 1 : 1 (v/v). Takto vzniklý vzorek media byl analyzován pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm.

Chromatogram HG media je na obrázku č. 9.

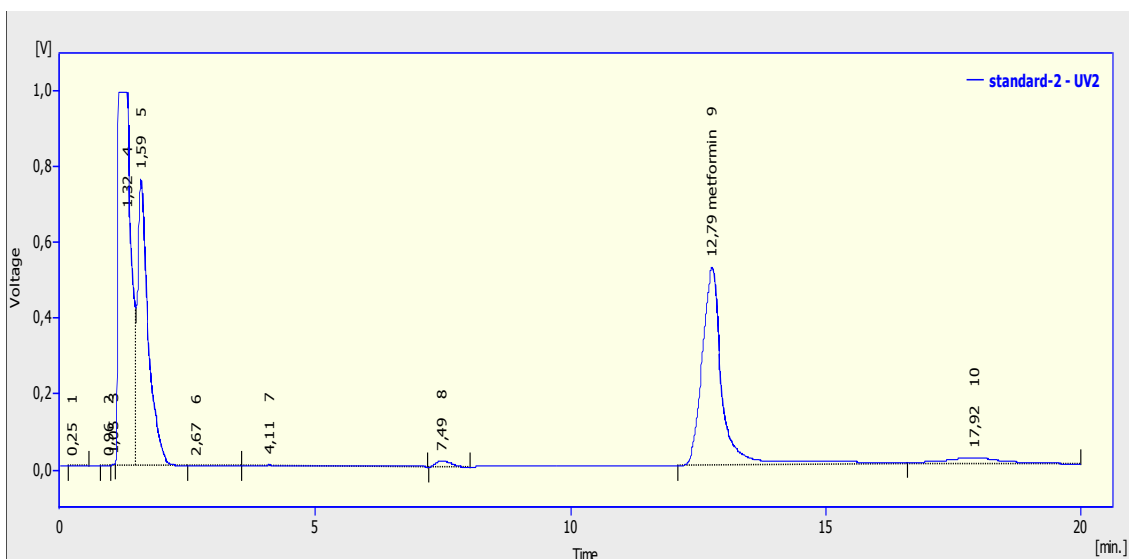


Obrázek č. 9 – Chromatogram HG media obsahující zbytkový metformin

Analýza media byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fázi byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), , průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Látky eluující v 1. – 5. minutě, odpovídají zhruba chromatogramu původního HG media. V mediu se také nachází malé množství metforminu, které nebylo extrahováno kukuřicemi. Pro určení píku patřící metforminu v HG mediu z experimentu byl použit standard metforminu ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) rozpuštěný v čistém HG mediu. Identifikace metforminu byla provedena na základě shodných retenčních časů. Pík ve vzorku HG media s retenčním časem 12,73 min a retenční čas standardu metforminu (12,79 min) jsou téměř shodné (liší se jen o 0,06 min). Ve vzorku HG media se nachází metformin, což se také předpokládalo.

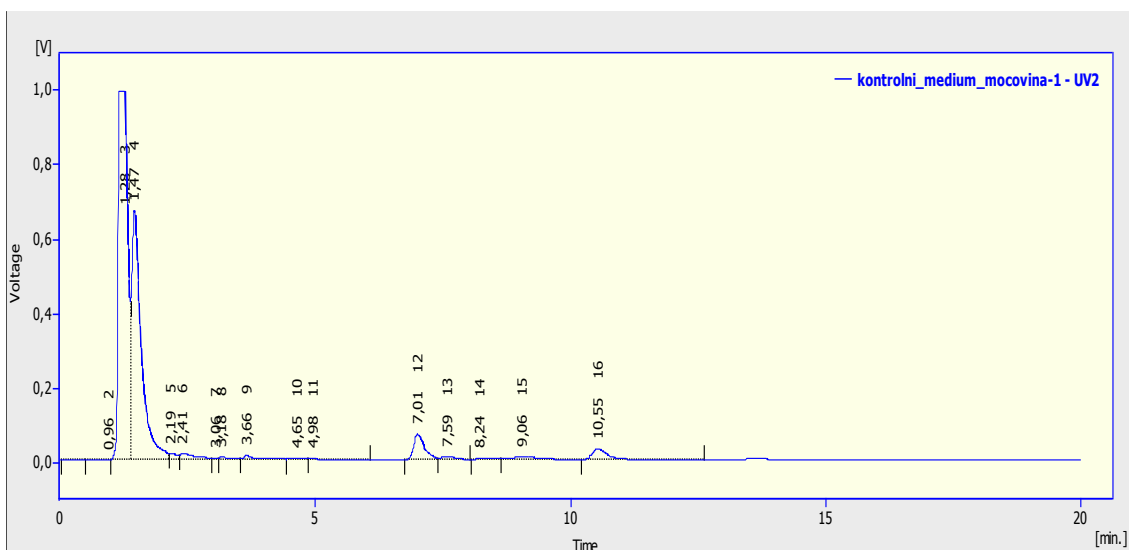
Chromatogram standardu metforminu je na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10 – Chromatogram standardu metforminu

Retenční čas metforminu byl určen pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fází byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

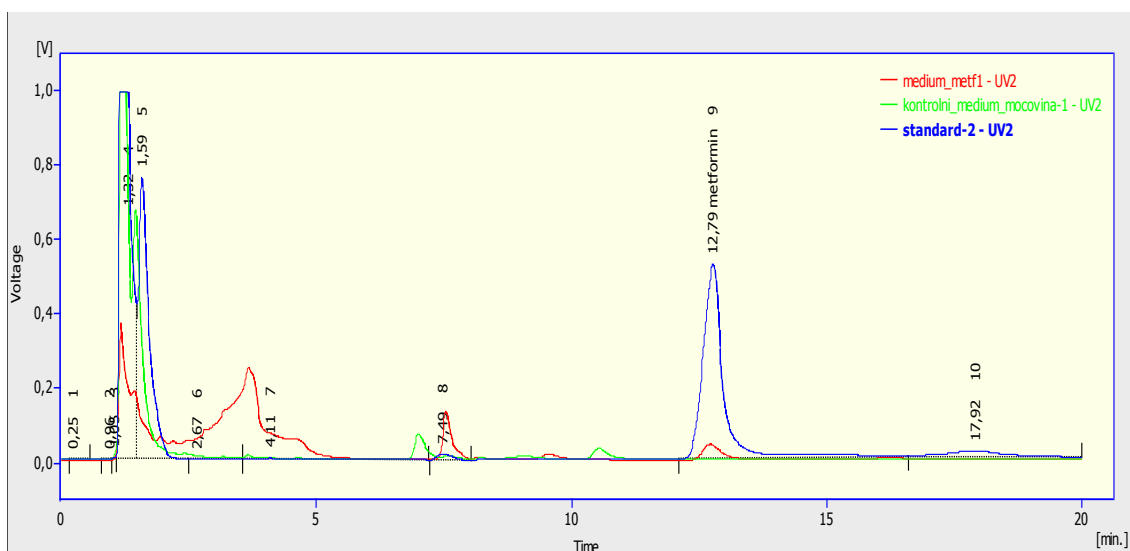
Další neznámé látky v HG mediu eluují s retenčními časy 7,55 min a 9,57 min. Primárním rozkladným produktem metforminu v odpadních vodách je guanylmočovina a proto byly porovnány retenční časy píků neznámých látek z HG media se standardem guanylmočoviny rozpuštěné v čistém HG mediu. Chromatogram standardu guanylmočoviny je na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11 – Chromatogram standardu guanylmočoviny

Retenční čas guanylmočoviny byl určen pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fází byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Při analýze retenčního času guanylmočoviny eluovaly z kolony 2 píky v retenčních časech 7,01 min a 10,55 min. Neznámé látky ve vzorku HG media eluovaly s retenčními časy 7,55 min a 9,57 min. I přesto, že není známo, který pík z analýzy guanylmočoviny patří právě této látce a který nečistotě, retenční časy ani jednoho píku se neshodují s neznámými píky ze vzorku HG media. Lze tedy říct, že guanylmočovina se ve vzorku HG media nevyskytuje. Vzhledem ke druhu detekce není možné blíže analyzovat neznámé látky ve vzorku HG media. Pro názornější porovnání retenčních časů jsou na obrázku č. 12 porovnány chromatogramy vzorku HG media, standardu metforminu a standardu guanylmočoviny.



Obrázek č. 12 – Chromatogramy vzorku HG media, standardu metforminu a standardu guanylmočoviny

Červená křivka patří vzorku HG media, modrá je standard metforminu a zelená standard guanylmočoviny.

Analýza byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fází byla směs 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok mobilní fáze $1,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

6 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium fytoextrakce metforminu a následnou analýzu extrahovatelných reziduí a případných exsudovaných látek v médiu.

Metformin je v současné době hojně využíván k léčbě diabetu mellitu 2. typu. V lidském těle není metabolizován a je vylučován ledvinami v původní formě. Ve zbytkových koncentracích se může nacházet v životním prostředí a právě fytoextrakce je jednou z metod, jak tyto zbytkové koncentrace v životním prostředí eliminovat.

V práci byla ověřena možnost záchytu metforminu z vodných roztoků kořenovým systémem polního kultivaru kukuřice seté (*Zea mays*). Pomineme-li primární fázi fytoextrakčního procesu zahrnující v použitém uspořádání převážně sorpci na povrch kořenové tkáně, lze konstatovat, že samotná extrakce se v použitém experimentálním uspořádání ukázala reálnou. Pokles koncentrace metforminu v kultivačním médiu se navíc stupňuje s klesající výchozí koncentrací studované látky. Proto lze předpokládat, že v reálných environmentálních koncentracích, které jsou mnohonásobně nižší, by byla účinnost záchytu metforminu ještě podstatně vyšší než experimentálně zjištěných maximálních 30 % mezi prvním a druhým dnem odběru. Odpovědně však lze pouze usuzovat, že fytotechnologická extrakce metforminu by možná byla, konkrétní účinnost však nelze přímo odvozovat z provedených jednoduchých modelových experimentů, neboť reálná environmentální matrice je mnohem složitější než její simulace pomocí kultivačního media a v systému se zcela jistě vyskytne spousta dalších interferencí.

Významným faktem se jeví zjevně minimální translokace metforminu do nadzemních částí rostlin, které tak nebudou i při kultivaci na kontaminované půdě, či při zálivce kontaminovanou vodou obohaceny o studovanou látku a použití takových půd či zálivkové vody je z hlediska zemědělské produkce zcela bezpečné. Poněkud horší situace nastává při hodnocení kořenových exsudátů. Předpokládaná *N*-guanylmočovina nebyla při zpětné analýze prokázána, nicméně v médiu se objevují minimálně dvě další látky, jejichž struktura zůstává vzhledem ke zvolené detekci neznámá. Není ani jisté, zda se jedná o látky související s přidaným kontaminantem - metforminem, či zda se jedná o stresové metabolity v důsledku přítomnosti xenobiotika. V budoucnu by stanovení jejich struktury mohlo přinést další konkrétní informaci o vhodnosti hydroponických čistíren pro vody s obsahem metforminu.

Citovaná literatura

- [1] Leitner, P.: *PPCPs - Farmaka a produkty osobní péče a vody*. Dostupné z URL: < <http://www.enviweb.cz/clanek/chemlatky/84704/ppcps-farmarka-a-produkty-osobni-pece-a-vody> > [cit. 22.2.2015]
- [2] Daughton, G. C.; Ternes, A. T.: Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents or Subtle Change?. *Environmental Health Perspectives* **107** : 6, 906-946 (1999).
- [3] Daughton, G.C.: Pharmaceuticals in the Environment: Sources and Their Management. *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry* **50** : 1, 1-58 (2007).
- [4] European Environment Agency: *Pharmaceuticals in the environment – Results of an EEA workshop*. Dostupné z URL< <http://epa.gov/ppcps/faq.html#define>> [cit. 23.3.2015]
- [5] National Geographic Česko: *Antibiotika v životním prostředí jsou časovanou bombou. Čeští vědci jsou znepokojeni*. Dostupné z URL <<http://www.national-geographic.cz/clanky/antibiotika-v-zivotnim-prostredi-jsou-casovanou-bombou-cesti-vedci-jsou-znepokojeni.html>> [cit.23.3.2015]
- [6] Kidd, A. K.; Blanchfield, J. P.; Mills, H.K.; Palace, P. V.; Evans, E. R.; Lazorchak, M. J.; Flick, W. R.: Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS* **104** : 21, 8997-8901 (2007).
- [7] Smrček, S.: *Cesty k odmoření vod*. Dostupné z <<http://vesmir.cz/2014/07/16/cesty-odmoreni-vod>> [cit.13.4.2015]
- [8] Zentiva – Společnost skupiny Sanofi: *Nepoužité léky často končí v odpadkovém koši* [Tisková zpráva ze dne 10.7.2012]. Dostupné z <https://www.zentiva.cz/>

- MEDIA-CENTRE/PRESS-RELEASES/Pages/press-release-detail.aspx?ItemId=14 [cit. 31.3.2015]
- [9] Kotyza, J.; Soudek, P.; Kafka, Z.; Vaněk, T.: Léčiva – nový environmentální polutant. *Chemické listy* **103**, 540 – 547 (2009).
- [10] Susarla, S.; Medina, F. V.; McCutcheon C. S.: Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18** : 5, 647 – 658 (2002).
- [11] Matoušová, L.; Váňa, M.; Hubáčková, J.; Fuksa, J.: *Účinnost procesů úpravy vody na odstraňování farmak*. Dostupné z URL: <http://archiv.ekomonitor.cz/sites/default/files/file/seminare/2011-02-02/prezentace/35_Vana.pdf> [cit. 14. 4. 2015]
- [12] Pouzar, M.: *rezidua léčiv v životním prostředí*. Dostupné z URL: <http://www.mpouzar.net/prednasky_leciva.htm> [cit. 14.4. 2015]
- [13] Svoboda, J.; Fuksa, J. K.; Matoušová, L.; Schönbauerová, L.; Svobodová, A.; Váňa, M.; Šťastný, V.: Léčiva a čistírny odpadních vod – možnost odstraňování a reálná data. *VTEI* **51** : 2, 9 – 11 (2010).
- [14] Favas, J. C. P.; Pratas, J.; Varun, M.; D'Souza, R.; Paul, S. M.: *Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora*. Dostupné z URL: <<http://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination/phytoremediation-of-soils-contaminated-with-metals-and-metalloids-at-mining-areas-potential-of-nativ>> [cit. 15. 4.2015]
- [15] Macková, M.; Macek, T.: *Využití rostlin k eliminaci xenobiotik z životního prostředí*. Dostupné z URL: <<http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-13-04.pdf>> [cit. 17.4.2015]

- [16] Barabášová, K.: *Studium abiotického stresu u rostlin na úrovni proteomu*. Diplomová práce. Univerzita Karlova V Praze, Přírodovědecká fakulta. Praha (2011).
- [17] Šlechtová, M.: *Využití rostlinných biotechnologií k odstraňování farmak ze životního prostředí*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Praha (2010).
- [18] Vaněk, T.; Soudek, P.; Tykva, R.; Kališová, I.: *Možnosti využití fytořemediace pro odstranění kontaminace způsobené toxickými kovy a radionuklidy*. Dostupné z URL: <http://slon.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/zahlazovani/Z07/P_07.htm> [cit. 17.4.2015]
- [19] Štěpánek, J.: *Perorální antidiabetika – PAD*. Dostupné z URL: <<http://www.stefajir.cz/?q=peroralni-antidiabetika-pad>> [cit. 13.4.2015]
- [20] Perušicová, J.; Kvapil, M.; Perušicová, S.; Svačina, Š.; Šmahelová, A.: *Perorální antidiabetika*. Praha, Galén 2003.
- [21] Perušicová, J.: Je metformin pouze antidiabetikum? *Medicína pro praxi* **8** : 3, 130 – 131 (2011).
- [22] Flekač, M.: *Postavení metforminu v léčbě diabetu mellitu 2. typu*. Dostupné z <<http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Postaveni-metforminu-v-lecbe-diabetu-mellitu-2-typu/6-F-Sq.magarticle.aspx>> [cit. 13.4.2015]
- [23] Niemuth, J. N.; Jordan, R.; Crago, J.; Blanksma, C.; Johnson, R.; Clapeter, D. R.: Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* **34** : 2, 291 – 296 (2014).
- [24] Chhetri, P. H.; Thapa, P.; Schepdael, V. A.: Simple HPLC – UV method for the

quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharmaceutical Journal* **22** , 483 – 487 (2014).

- [25] Arayne, S. M.; Sultana, N.; Zuberi, H. M.: Development and validation of RP – HPLC method for the analysis metformin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **19** : 2, 231 – 235 (2006).
- [26] Kar, M.; Choudhury, P. K.: HPLC Method for Estimation of Metformin Hydrochloride in Formulated Microspheres and Tablet Dosage Form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **71** : 3, 318 – 320 (2009).