UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Kristýna Kovářová

FYTOEXTRAKCE METFORMINU A GUANYLMOČOVINY

Phytoextraction of metformin and guanylurea

Diplomová práce

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

Praha 2017

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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2017

Poděkování

V úvodu své práce bych velmi ráda poděkovala Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za odborné vedení, poskytnuté konzultace a připomínky k diplomové práci.

Abstrakt

Farmaceuticky aktivní látky zahrnují také metformin, nejčastěji předepisované léčivo k léčbě diabetu mellitu 2. typu. Metformin je užíván ve vysokých denních dávkách (až 3000 mg/den) a je vylučován ledvinami v původní nemetabolizované formě. Metformin se degraduje až v čistírnách odpadních na guanylmočovinu. Čistírny odpadních vod nejsou zcela schopny vyčistit odpadní vodu a tak se metformin i guanylmočovina dostávají do životního prostředí, zejména do povrchových vod.

V diplomové práci byla studována schopnost odstranění metforminu a jeho environmentálního metabolitu guanylmočoviny prostřednictvím fytoextrakčních technologií. Nejprve byla studována fytoextrakce metforminu pomocí 5 druhů rostlin - kukuřice seté, hrachu setého, ovsa obecného, plevuňky Reineckovy a staurogynu plazivého. V druhém experimentu byla studována fytoextrakce guanylmočoviny pomocí kukuřice seté a hrachu setého. Ve třetím experimentu byla studována fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny najednou pomocí kukuřice seté. Media rostlin byla kontaminována metforminem nebo guanylmočovinou o různých koncentracích. Během jejich kultivace byly odebírány vzorky medií ve 24 – hodinových intervalech a v nich sledován pokles koncentrace xenobiotik pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm u metforminu a 210 nm u guanylmočoviny.

Nejlepší fytoextrakční schopnost metforminu měla vodní rostlina staurogynus plazivý. Jeden gram této rostliny byl schopen exrahovat 1,87 mg metforminu během 5 dnů. Nejlepší fytoextrakční schopnost guanylmočoviny měl hrách setý. Jeden gram hrachu setého byl schopen extrahovat 0,13 mg guanylmočoviny během 5 dnů. Při kombinaci metforminu a guanylmočoviny byla fytoextrakční schopnost až 2 krát nižší, než fytoextrakce těchto látek v monokomponentních vzorcích.

Klíčová slova: metformin, guanylmočovina, fytoextrakce, HPLC

Abstrakt

Pharmaceutically Active Compounds include metformin, the most often prescripted drug for a treatment of the diabetes mellitus type 2. Metformin is used in high daily doses (up to 3000 mg per day) and it is eliminated by kidneys in its original non – metabolized form. Metformin is degraded in the wastewater treatment plants to guanylurea. The wastewater treatment plants aren´t able to clean the waste water, so metformin and guanylurea enter the environment, especially surface water.

This diploma thesis deals with the ability to remove metformin and its environmental metabolite guanylurea via phytoextraction technologies. First experiment was focused on phytoextraction of metformin using 5 plant species - *Zea mays L., Pisum sativum L., Avena sativa L., Alternanthera reineckii Mini L.* and *Staurogyne repens L.* Second experiment studied phytoextraction of guanylurea using *Zea mays L.* and *Pisum sativum L*. The third experiment deals with the phytoextraction of metformin and guanylurea together using *Zea mays L.* The media of all plants were contaminated by metformin or guanylurea at different concentration levels. The samples of media were taken in 24 hours intervals during the plant cultivation and the decrease of its concentration were studied by HPLC with UV detection at 233 nm for metformin and 210 nm for guanylurea.

The best phytoextraction ability of metformin had the aquatic plant *Staurogyne repens L.* One gram of this plant was able to extract 1,87 mg of metformin during 5 days. The best phytoextraction ability of guanylurea had *Pisum sativum L.* One gram of this plant was able to extract 0,13 mg of guanylurea during 5 days. The phytoextraction of metformin and guanylurea in combination was up to twice lower than in monocomponent samples.

Keywords: metformin, guanylurea, phytoextraction, HPLC

Obsah

Poděkování 3

Abstrakt 4

Abstrakt 5

Seznam zkratek 8

1 Úvod 9

2 Cíl práce 11

3 Teoretická část 12

3.1 Výskyt farmak v životním prostředí 12

3.2 Diabetes mellitus 15

3.2.1 Perorální antidiabetika 16

3.3 Metformin 17

3.4 Guanylmočovina 21

3.5 Fytoremediace 23

4 Experimentální část 25

4.1 Přístrojové vybavení 25

4.2 Chemikálie 26

4.3 Rostlinný materiál 27

4.4 Postup práce 28

4.4.1 Příprava medií 28

4.4.2 Kultivace sterilních rostlin 30

4.4.3 Odběry vzorků k analýze 34

4.4.4 HPLC analýza odebraných vzorků 34

5 Výsledky a diskuse 36

5.1 Studium fytoextrakce metforminu 36

5.1.1 Kalibrační závislost metforminu, mez detekce a kvantifikace 37

5.1.2 Kukuřice setá *(Zea mays L.)* + metformin 38
5.1.3 Hrách setý *(Pisum sativum L.)* + metformin 40
5.1.4 Oves obecný *(Avena sativa L.)* + metformin 41
5.1.5 Plevuňka Reineckova Mini *(Alternanthera reineckii Mini L.)* + metformin 43
5.1.6 Staurogynus plazivý *(Staurogyne repens L.)* + metformin 44
5.2 Studium fytoextrakce guanylmočoviny 49
5.2.1 Kalibrační závislost guanylmočoviny, mez detekce a kvantifikace 49
5.2.2 Kukuřice *(Zea mays L.)* + guanylmočovina 51
5.2.3 Hrách setý *(Pisum sativum L.)* + guanylmočovina 52
5.3 Studium fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny v kombinaci 56
5 Závěr 60
Citovaná literatura 62

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
API	Aktivní farmaceutické látky
ATC	Anatomicko – terapeuticko - chemická
ČOV	Čistírna odpadních vod
DDD	Doporučená denní dávka
DM 1. typu	Diabetes mellitus 1. typu
DM 2. Typu	Diabetes mellitus 2. Typu
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GF	Glomerulární filtrace
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KČOV	Kořenová čistírna odpadních vod
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MS medium	Murashige a Skoog medium
MS – BC medium	Murashige a Skoog medium bez cukru
MS – H medium	Murashige a Skoog medium s hormony
MS – P medium	Murashige a Skoog medium s Phytagelem
PCB	Polychlorované bifenyly
PEC	Předpovězená environmentální koncentrace
PhACs	Farmaceuticky aktivní sloučeniny
PPCPs	Farmaka a produkty osobní péče
SDS	Dodecylsulfát sodný
UV	Ultrafialový

1 Úvod

Naše společnost prošla za posledních 30 – 40 let obrovskými změnami. Díky rozvoji průmyslu lze v dnešní době využívat řadu produktů, které v minulosti dostupné nebyly. To se týká i léčivých přípravků. S mohutným rozvojem farmaceutického průmyslu v 80. a 90. letech 20. století se také zvýšila výroba a spotřeba léčivých přípravků, které jsou v hojné míře využívány v humánním i veterinárním lékařství [1].Tyto přípravky jsou používány ku prospěchu lidí a zvířat, na druhou stranu jako odpadní produkty často končí v životním prostředí. Přísun některých látek do životního prostředí lze regulovat omezením či zákazem jejich používání (např. PCB, rtuť), nebo kontrolou potravin [2]. S léčivými přípravky je situace složitější, lidské zdraví má přednost, osud léku je až druhotným problémem. Do životního prostředí, zejména do vodních toků, se léčivé substance dostávají nejčastěji lidskou exkrecí, případně vhozením nepoužitých léčiv do toalety [3]. Tyto látky nejsou zcela odstraněny v čistírnách odpadních vod (ČOV) a vstupují tak do nadzemních vod, podzemních vod a půd a to buď v původní nezměněné, částečně metabolizované, nebo zcela přeměněné formě [4, 5].

Diabetes mellitus 2. typu je celosvětově rozšířené onemocnění. V roce 1980 bylo zaznamenáno 106 milionů dospělých osob trpících DM 2. typu, v roce 2014 byl počet téměř čtyřnásobný, a to 422 milionů případů [6].

Metformin je považován za lék první volby při onemocnění DM 2. typu a patří mezi nejčastěji předepisovaná léčiva na celém světě [4, 7, 8]. Metformin není v lidském těle metabolizován a je z lidského těla eliminován v nezměněné formě močí [8, 9].

Celosvětové rozšíření DM II. typu, emininace metforminu v původní nezměněné formě a vysoká denní dávka metforminu jsou důvody, proč se metformin nachází v životním prostředí, zejména ve vodních tocích [8]. Na základě znalosti množství předepisovaného metforminu v určitých částech světa lze předpovědět jeho koncentraci v životním prostředí. Předpovězená environmentální koncentrace (PEC) je však vyšší, než skutečná koncentrace. Metformin v ČOV podléhá aerobní biodegradaci, konečným produktem biodegradace je guanylmočovina [5].

Fytoremediační metody jsou souhrnný název pro skupinu metod, které využívají rostlin k dočištění půd, kalů a vod kontaminovaných anorganickými a organickými látkami, včetně léčivých látek [10].

Tato diplomová práce navazuje na vlastní bakalářskou práci obhájenou v roce 2015 na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze [11]. V bakalářské práci byla studována fytoextrakce perorálního antidiabetika mettforminu na dvou hladinách koncentrace pomocí kukuřice seté (*Zea mays L.).* V diplomové práci je popsáno použití fytoextrakce perorálního antidiabetika metforminu a jeho konečného čistírenského produktu guanylmočoviny pomocí pěti druhů rostlin – kukuřice seté *(Zea mays L.),* hrachu setého *(Pisum sativum L.),* ovsa obecného (*Avena sativa L.),*staurogynu plazivého *(Staurogyne repens L.)* a plevuňky Reinekovy Mini *(Alternanthera reineckii Mini L.)*

2 Cíl práce

Diabetes mellitus 2. typu je v současné době celosvětově i celorepublikově velmi rozšířené onemocnění. Léčivo metformin je nazýváno lékem první volby při léčbě tohoto onemocnění a řadí se tak mezi nejpoužívanější léčiva. Kvůli vysoké spotřebě, vysoké denní dávce a eliminaci v původní nezměněné formě se metformin dostává z organismu přes čistírny odpadních vod do životního prostředí. V životním prostředí se metformin částečně degraduje na guanylmočovinu a společně kontaminují hlavně vodní ekosystém.

Cílem práce je studium záchytu nízkých koncentrací metforminu a guanylmočoviny fytoextrakční technologií.

Diplomová práce zahrnuje:

1) Studium literatury týkající se celkového zatížení životního prostředí léčivými přípravky s důrazem na metformin.
2) Studium farmakokinetických a farmakodynamických vlastností metforminu, jeho přítomnost v životním prostředí a jeho toxicitu.
3) Studium degradace metforminu na guanylmočovinu, toxicitu guanylmočoviny.
4) Experimentální studium fytoextrakce metforminu v *in vitro* uspořádání s rostlinami *Zea mays L., Pisum sativum L., Avena sativa L., Staurogyne repens L. ,* a *Alternanthera reineckii Mini L.*
5) Experimentální studium fytoextrakce guanylmočoviny v *in vitro* uspořádání s rostlinami *Zea mays L.* a *Pisum sativum L*.
6) Experimentální studium fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny najednou v *in vitro* uspořádání s rostlinou *Zea mays L.*
7) Vyhodnocení experimentů a porovnání fytoextrakce jednotlivých rostlin.

3 Teoretická část

3.1 Výskyt farmak v životním prostředí

V posledních třech až čtyřech desetiletí je stále více vyzdvihováno znečištění životního prostředí vlivem nárůstu chemického a strojírenského průmyslu.[12] Nejvíce jsou diskutovány zejména akutně toxické látky, karcinogenní látky a neodbouratelné látky, které se kumulují v životním prostředí. Toto spektrum chemikálií je však pouhý zlomek látek, které se v životním prostředí nachází.

Obrovská a různorodá skupina sloučenin, jejichž rizika nejsou tak rozsáhle diskutována a tak se jim dostává relativně malé pozornosti, je skupina látek označována jako *Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs)*, v doslovném překladu farmaka a produkty osobní péče.

Skupina PPCPs zahrnuje humánní a veterinární léčivé přípravky, kosmetické a hygienické přípravky, detergenty, herbicidy, pesticidy a rezidua z farmaceutického a zemědělského průmyslu [1, 13]. Tyto látky se díky jejich stále vzrůstajícímu užívání dostávají do životního prostředí, kde kontaminují převážně vodní ekosystémy a mohou se dostat zpět do pitné vody. Vodní ekosystémy, a v nich žijící organismy, jsou kontaminovány nejvíce, protože jsou vystavovány polutantům po celou dobu svého života [14].

Ve skupině PPCPs tvoří významnou část látky označované jako *Pharmaceutically Active Compounds (PhACs)* [15], nebo také *Active Pharmaceutical Ingredients (API)* [16], běžně označované jako léčivé látky. PhACs (API) se mohou dostávat do vodního prostředí několika způsoby, nejčastěji exkrecí lidských a zvířecích organismů, dále z hnojů a biomasy nebo nesprávnou likvidací [17].

Významnou roli při transportu léčivých přípravků hrají čistírny odpadních vod (ČOV). Čistírny odpadních vod jsou navrženy tak, aby byly schopné očistit přitékající odpadní vodu, odstranit z ní odpad organického i anorganického původu a vrátit očištěnou vodu zpět do životního prostředí [12, 18]. V prvním kroku je voda mechanicky očištěna od největších nečistot, jako jsou zbytky jídla, papíry, hadry, hygienické potřeby a drobní odumřelí živočichové [19]. Poté se voda dostává do aktivačních nádrží. Zde dochází k aerobnímu biologickému čištění pomocí kultivovaných bakterií, tzv. aktivovaného kalu [20]. Z aktivačních nádrží voda odtéká

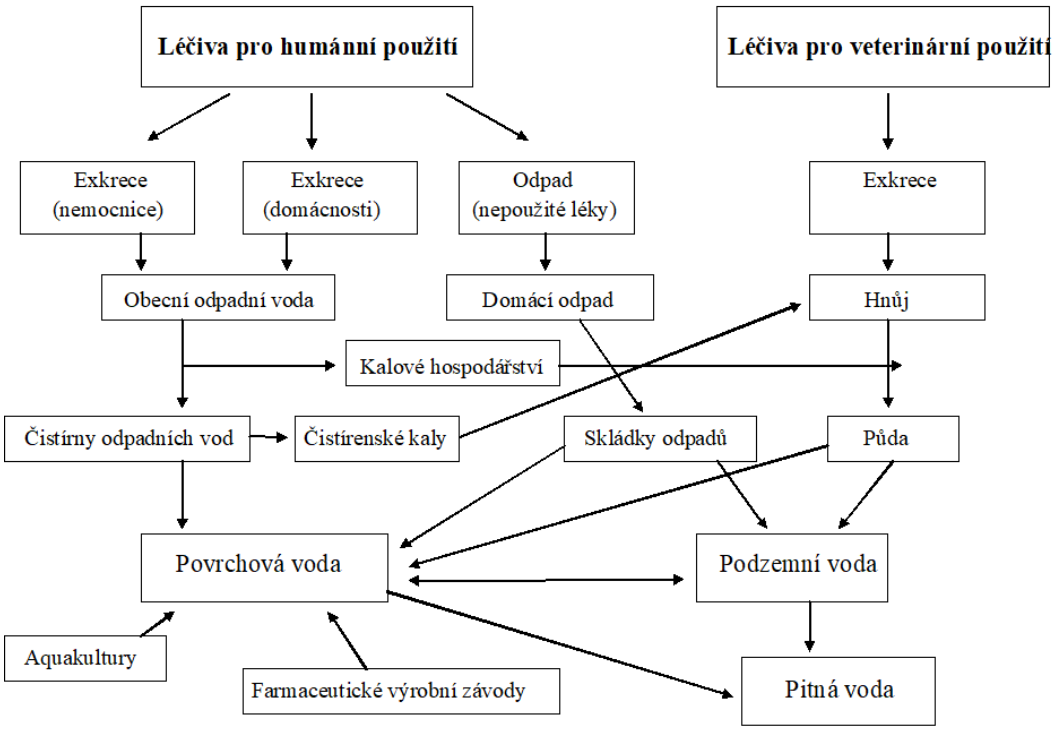
do dosazovací nádrže, kde dochází k oddělení očištěné vody od aktivovaného kalu důsledkem jeho sedimentace [21]. Následně je voda vypuštěna do vodního toku.

Čistírny odpadních vod nejsou schopny zcela očistit znečištěnou přitékající odpadní vodu. Pracují s účinností kolem 95 % [22], což sice znamená, že bezpečně plní stanovené vodoprávní limity, ale zbylých 5 % odpadních látek se vrací zpět do vodního životního prostředí. Léčiva se v ČOV nedegradují snadno a bývají tak vypuštěna buď v původní formě, nebo ve formě metabolitů a konjugátů do vodních toků [14].

Dalším způsobem, jakým se farmaka mohou dostávat do životního prostředí, je použití čistírenských kalů v zemědělství. Na jedné straně jsou dobrým zdrojem jak organické, tak anorganické hmoty a základních živin, na druhé straně se podílí na významném vstupu nežádoucích látek do životního prostředí [23].

Zemědělské přípravky mohou do životního prostředí vstupovat v důsledku hnojení a veterinární přípravky prostřednictvím přímé aplikace, tzv. aquakultur.

Osud API v životním prostředí je znázorněn na obrázku č. 3.1 (převzato z [15]).



Obr. č. 3.1 (převzato z [15]) : Schéma zobrazující možné zdroje a dráhy léčivých přípravků a jejich výskyt ve vodním prostředí.

V rozvinutých zemích, jako je USA, Kanada, Čína, Korea, Japonsko, Austrálie a Německo, bylo ve vodních ekosystémech nalezeno přes 80 druhů léčivých přípravků [17]. Odhaduje se, že celosvětově je spotřebováno asi 100 000 tun léčivých přípravků za rok. Americká asociace FDA *(Food and Drug Administration)* vydala nařízení, dle kterého je nutné provést hlášení v případě, že koncentrace léčivých přípravků ve studovaných vodních prostředích bude překračovat 1 ng · L^{-1}[14].

Několik studií se zabývalo detekcí farmaceutických látek v povrchových vodách.

V USA byla v letech 1999 – 2000 provedena analýza 139 vodních ploch na přítomnost 95 farmaceutických látek ve 30 státech USA [24]. V téměř 71 % vzorcích byl nalezen kofein průměrně v množství 100 ng · L^{-1}, maximální detegované množství bylo až 5 700 ng · L^{-1}. Nejvyšší průměrná koncentrace ve vzorcích vod byla stanovena u antiflogistika ibuprofenu a to 200 ng · L^{-1} v asi 10 % vzorků. Antipyretikum paracetamol bylo nalezeno ve 24 % vzorků v maximální koncentraci 10 000 ng · L^{-1}. Antidiabetikum metformin bylo nalezeno v necelých 5 % vzorků v průměrné koncentraci 200 ng · L^{-1}.

Přítomnost farmak byla také studována v Michiganském jezeře v letech 2009 – 2010 [25]. Velká pozornost byla věnována perorálnímu antidiabetiku metforminu. Jeho koncentrace se pohybovala v průměru okolo 100 – 110 ng · L^{-1}, v některých místech dosahovala až desetinásobně vyšších hodnot. Koncentrace metforminu se snižovala s přibývající vzdáleností od pobřeží. V odpadní vodě na pobřeží jezera byl metformin nalezen v koncentraci až 50 000 ng · L^{-1}.

V řece Máze, která je zdrojem pitné vody pro více než 6 milionů obyvatel ve Francii, Belgii a Nizozemí, byl proveden další výzkum na přítomnost farmak [26]. V místě využití vody pro přípravu a produkci pitné vody bylo nalezeno 93 % vybraných analyzovaných farmak. V řece byly nalezeny diazepam a theofylin, oba ve velmi nízkých koncentracích pod 0,1 ng · L^{-1}. Okolo 1 ng · L^{-1} byly stanoveny farmaka jako β – blokátor propranolol, nebo diuretikum hydrochlorthiazid. Nejčastěji se koncentrace léčiv pohybovala okolo 10 ng · L^{-1}, příkladem jsou anestetikum lidokain, antibiotikum linkomycin a β – blokátory atenolol, bisoprolol, metoprolol a sotalol. Okolo 60 – 70 ng · L^{-1} byly nalezeny psychostimulační látka kofein a antiepileptikum karbamazepin. Nejvyšší nalezená koncentrace patřila antidiabetiku metforminu. Jeho koncentrace se pohybovala kolem 800 ng · L^{-1} , v některých částech řeky až kolem 1300

$ng \cdot L^{-1}$. Metformin je v Nizozemsku 5. nejčastěji předepisovaným léčivem, ve Francii a Belgii také patří k nejpoužívanějším.

V Evropské unii je registrováno přes 3000 léčivých přípravků, mezi nejpoužívanější patří steroidní i nesteroidní protizánětlivé látky, analgetika, kontraceptiva, antibiotika, β – blokátory, hypolipidemika a neuroaktivní látky [14]. Všechna tato zmiňovaná farmaka se zcela liší mechanismem jejich působení. Jejich společnou vlastností je vysoká spotřeba, biologická aktivita a kumulace v životním prostředí. Tyto vlastnosti jsou předpokladem, že látka je pro životní prostředí nebezpečná [27].

3.2 Diabetes mellitus

Onemocnění diabetes mellitus je souhrnné označení pro dvě různá onemocnění, jejichž společnými znaky jsou hyperglykemie (vysoká hladina glukosy v krvi) a glykosurie (přítomnost glukosy moči) [28]. Liší se příčinou vzniku, průběhem onemocnění a způsobem léčby. Na základě těchto odlišných znaků rozeznáváme diabetes mellitus 1. typu a diabetes mellitus 2. typu.

Diabetes mellitus 1. typu (dále jen DM 1. typu) je autoimunitní onemocnění způsobené destrukcí β – buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, což má za následek nedostatečnou produkci inzulinu a nutnost jeho podávání injekčně po zbytek života [28, 29]. DM 1. typu se objevuje převážně v dětství, v dospívání, případně v raném věku.

Diabetes mellitus 2. typu (dále jen DM 2. typu) vzniká v důsledku inzulinové rezistence (snížená citlivost buněk na inzulin). DM 2. typu je z 90 % spojen s obezitou, nadměrným příjmem kalorií, stravou bohatou na tuky a genetickými dispozicemi. Objevuje se především v rané dospělosti či ve stáří [28, 29]. Přehled společných a rozdílných znaků je uveden v tabulce č. 3.1.

Tabulka 3.1 – Shodné a odlišné znaky DM 1. typu a DM 2. typu

Znaky	DM 1. Typu	DM 2. typu
Hyperglykemie	Ano	Ano
Glykosurie	Ano	Ano
Tvorba inzulinu v těle	Malá, postupně žádná	Normální, zvýšená
Příčina vzniku	Autoimunitní	Obezita, stres, nadměrný příjem tuků, genetické predispozice
Věk	Dětství, raná dospělost	Zralý věk, stáří
Příznaky	Velká žízeň, časté močení, hubnutí, únava	Únava, rozmazané vidění, suchá a svědivá kůže
Možnost uzdravení	Ne	Ano
Léčba	Inzulin injekčně	Dieta, pohyb, perorální antidiabetika
Výskyt v ČR	1:2000	1:20

3.2.1 Perorální antidiabetika

Perorální antidiabetika jsou léčiva, která se používají k léčbě diabetu mellitu 2. typu. Rozdělují se na několik skupin dle mechanismu účinku [29].

První skupinou jsou látky snižující inzulinovou rezistenci, tzv. inzulinové senzitizéry, látky zvyšující citlivost na inzulin. Z chemického hlediska patří mezi biguanidy, jediným bezpečným zástupcem je metformin.

Druhou skupinou jsou inzulinová sekretagoga, která pomáhají syntetizovat inzulin. Z chemického hlediska sem patří deriváty sulfonylmočoviny.

Třetí skupinou jsou inhibitory střevních α – glukosidas (inhibitory štěpení oligosacharidů a disacharidů na vstřebatelnou glukosu [30]). Tyto enzymy působí jen lokálně v tenkém střevě. Glukosa získaná postupným štěpením oligosacharidů se méně a pomaleji vstřebává v zažívacím traktu a její hladina v krvi nezpůsobuje hyperglykemii. Inhibitory střevních α – glukosidas se používají v případech, kdy jiná

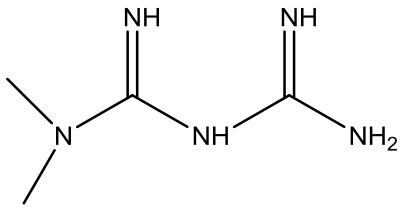
antidiabetika, především metformin nebo deriváty guanylmočoviny, nejsou dostatečně schopná korigovat hladinu glykemie [31].

Antiobezitika nejsou klasická perorální antidiabetika, přesto se uvádí jako čtvrtá skupina látek v léčbě DM 2. typu. Používají se u obézních lidí trpících DM 2. typu.

K nejpoužívanějším léčivům se řadí metformin následovaný deriváty sulfonylmočoviny, případně lze na doporučení lékaře užívat kombinace perorálních antidiabetik.

3.3 Metformin

Metformin je organická sloučenina, která se využívá k léčbě DM 2. typu. Strukturní základ tvoří guanidin, spojením dvou guanidinů přes dusíkový atom vzniká biguanid a dvojnásobnou methylací koncového dusíku biguanidu vzniká metformin, neboli 1,1 – dimethylbiguanid (obrázek č. 3.2). V léčivých přípravcích se metformin vyskytuje ve formě hydrochloridu.



Obr.č. 3.2 – Vzorec metforminu

Denní dávka. Maximální denní dávka je závislá na funkci a stavu ledvin. Ukazatelem funkčnosti ledvin je glomerulární filtrace a u zdravého jedince by se měla pohybovat v hodnotě > 90 ml · min^{-1}. U takového pacienta je doporučená maximální denní dávka 2550 – 3000 mg denně užívaná ve 3 dávkách. Obvyklá úvodní dávka je 850 mg denně jednorázově a zvyšována každý druhý týden o 850 mg. Dávky nad 1500 mg · den^{-1} musí být rozděleny do dílčích dávek. Pacienti se sníženou funkcí ledvin (GF 45 – 59 ml · min^{-1}) mohou užívat metformin v maximální dávce 1000 mg · den^{-1} rozdělené do dvou dávek. Pacienti s GF < 45 ml · min^{-1} by metformin neměli používat vůbec [9, 32].

Farmakodynamika. Mezi hlavní farmaceutické účinky patří [9, 32]:

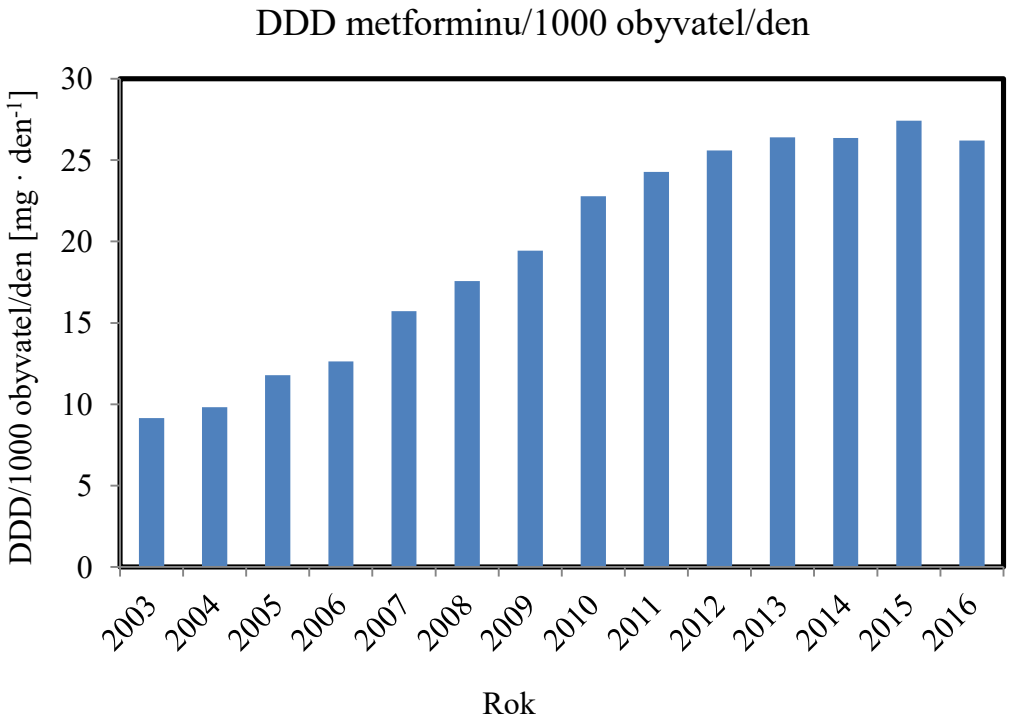
1. snížení produkce glukosy v játrech
2. potlačení glukoneogeneze a glykogenolýzy
3. snížení střevní absorpce glukosy
4. zvýšení citlivosti a absorpce periferních tkání na inzulin
5. působení na glykogen – synthasu, čímž stimuluje buněčnou syntézu glykogenu
6. zvýšení transportní kapacity membránových glukosových transportérů

Farmakokinetika. Po perorálním podání je dosaženo maximální koncentrace v plasmě přibližně za 2,5 hodiny. Biologická dostupnost metforminu je 50 – 60 % a není závislá na velikosti jednotlivé dávky [9, 32, 33]. Metformin se nepatrně váže na bílkoviny krevní plasmy a proniká do erytrocytů. V pravidelně nastavených klinických dávkách je koncentrace metforminu v plazmě ustálena během prvních 24 – 48 hodin. Metformin je vylučován v nezměněné formě močí, hlavní cestou eliminace je tubulární sekrece a není metabolizován v játrech [9, 32]. Při plné funkčnosti ledvin je po perorálním podání asi 90 % metforminu vyloučeno ledvinami během prvních 24 hodin, poločas eliminace metforminu je přibližně 6,2 – 6,5 hodin. U pacientů se sníženou funkcí ledvin je poločas eliminace prodloužen [9, 32, 33].

Nežádoucí účinky. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří gastrointestinální potíže jako průjem, zvracení, bolesti břicha, dále bolesti hlavy, závratě, ospalost a kovová chuť v ústech, která vymizí až při pokračování v léčbě [9]. Velmi vzácně (0,03 případů/1000 pacientů za rok) se může vyskytovat laktátová acidóza [34]. Laktátová acidóza je vzácná, ale velmi vážná metabolická porucha, která může být fatální až v 50 % případů. Často je zmiňována právě s užíváním metforminu při léčbě DM 2. typu, obzvlášť pak při snížené funkci ledvin. Laktátová acidóza je charakterizována jako nadměrné množství laktátu v krvi (> 5 mmol $\cdot$ L^{-1}) a překyselení organismu vlivem nadbytku vodíkových iontů.

Metformin je označován jako lék první volby při léčbě DM 2. typu, je nejpoužívanějším antidiabetikem a řadí se mezi nejvíce předepisovaná léčiva na celém světě [4, 7, 8]. Pro porovnání spotřeby léčiv se často využívá ATC/DDD metodologie,

která umožňuje vzájemné srovnání spotřeby jednotlivých léčivých přípravků. ATC je anatomicko – terapeuticko – chemická klasifikace léčivých přípravků řadící léčivé přípravky do skupin podle orgánových soustav, na které působí. ATC klasifikace metforminu je následující: *A* – Trávicí trakt a metabolismus, *A10* – Léčiva k terapii diabetu, *A10B* – Antidiabetika, kromě inzulinů, *A10BA* – Biguanidy, *A10BA02* – Metformin [35]. DDD je definována jako průměrná denní udržovací dávka, která je podávána v hlavní indikaci u dospělých [36].V České republice stoupla DDD od roku 2003 do roku 2016 o 215 %, viz následující obrázek č. 3.3. Ke zhotovení grafu byla použita databáze Státního ústavu pro kontrolu léčiv a její data z let 2003 – 2016.



Obr. č. 3.3 – Nárůst DDD metforminuv ČR v letech 2003 – 2016

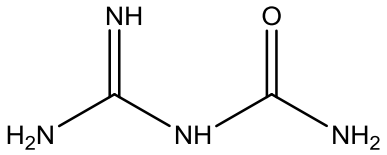
Celosvětové rozšíření DM 2. typu, vysoká denní dávka metforminu, dlouhodobé užívání a eliminace močí v původní nezměněné formě patří k důvodům, proč se metformin nalézá v životním prostředí, zejména pak ve vodních tocích [8], ve vyšších koncentracích, než jsou jiné léčivé látky. Metformin tak může přímo i nepřímo ovlivňovat životní prostředí a organismy v něm žijící.

Ekotoxicita. Všechna farmaka jsou navržena tak, aby ovlivňovala specifické metabolické a molekulární dráhy v lidském či zvířecím organismu [14]. Často mohou mít ale vedlejší účinky. Při vstupu do životního prostředí mohou vyvolávat v orgánech, tkáních, buňkách či biomolekulách nižších organismů stejné účinky jako u lidí. Některé receptory nižších živočichů se podobají těm lidským, jiné jsou rozdílné, nebo mohou zcela chybět, což znamená, že léčivo na ně může mít zcela jiný účinek a může pro ně být toxické. Protože některé mechanismy působení nejsou známé ani u člověka, je těžké odhadnout, jak budou působit na nižší organismy.

Studie akutní toxicity metforminu na zvířatech neprokázaly žádnou zvláštní citlivost při terapeutických dávkách [9]. Akutní toxicita byla prokázána u žab, kterým byl metformin podán parenterálně v dávce 1 450 mg · kg^{-1}, a u myší orálně v dávce 1 450 mg · kg^{-1}. Byly prokázány změny chování, halucinace, křeče a záchvaty. Tyto dávky byly letální pro 50 % studovaných organismů [37]. Výrazně však překračují koncentrace, jež se nachází v životním prostředí, a je tedy velmi nepravděpodobné, aby byly v životním prostředí živé organismy vystaveny takovému množství metforminu v jednorázové dávce. V lidském organismu se projevila toxicita metforminu při perorálním podaní v dávce 321 mg · kg^{-1} u muže a 191 mg · kg^{-1} u ženy, což mělo za následky hemolýzu, anemii, poškození jater, změny složení krve a celkové utlumení organismu [8, 37].

Data k posouzení chronické toxicity nejsou dostačující, doposud nebyly publikovány žádné výsledky. Avšak u organismů, jejichž mechanismus využití a transport glukosy je obdobný jako v lidském organismu, existuje předpoklad, že by metformin mohl glykemii ovlivňovat.

3.4 Guanylmočovina



Obr. č. 3.4 – Vzorec guanylmočoviny

Guanylmočovina je chemická látka, která vzniká pouze při aerobní biodegradaci metforminu [5], nikoliv v lidském těle při metabolismu. Metformin není degradován kompletně, proto je v analyzovaných vzorcích vod přítomna nejenom guanylmočovina, ale i původní metformin. Principy degradace metforminu na guanylmočovinu a faktory ovlivňující degradaci nejsou zcela známé [8].

Výskyt v životním prostředí. Ve studii prováděné v Německu v roce 2012 [38] byla zkoumána koncentrace metforminu a guanylmočoviny ve vzorcích vody do čistírny odpadních vod přitékajících a odtékajících. Na základě této studiu je patrné, že guanylmočovina vzniká v největší míře jako bakteriální produkt v čistírnách odpadních vod. Metformin i guanylmočovina se ve vzorcích vyskytovaly ve výrazném množství. Zastoupení metforminu bylo převládající ve vzorcích odebraných na přítoku do čistíren a guanylmočovina dominovala ve vzorcích odtékajících z čistírny odpadních vod.

Koncentrace metforminu a guanylmočoviny v povrchových vodách závisí na zatížení řek, matrici a kvalitě vod [39].

V jiné studii prováděné v Německu v roce 2012 byla zkoumána efektivita technik používaných ve vodárenství k čištění vod [39].

Flokulace byla pro odstranění metforminu a guanylmočoviny za použitých podmínek (chlorid hlinitý a chlorid železitý jako srážecí činidlo, pH 7 – 8) neefektivní. Obě látky se před i po flokulaci objevovaly ve vzorcích vody v přibližně stejných koncentracích.

Při ozonizaci byly použity koncentrace ozonu 0,5 mg · L^{-1} a 1 mg · L^{-1}, koncentrace běžně používané při ozonizaci vod ve vodním hospodářství. Při vyšší koncentraci ozonu

byly obě látky oxidovány rychleji, ovšem ne zcela. Po 60 minutách působení ozonu o koncentraci 1 mg · L^{-1} činila koncentrace metforminu ve vzorku 31 % původní koncentrace a koncentrace guanylmočoviny 24 % výchozí koncentrace. Při procesu ozonizace vznikaly ve vzorcích další oxidační produkty, např. hydroperoxid metforminu a methylbiguanid. Procesem ozonizace tedy lze částečně odstranit metformin a guanylmočovinu z povrchových vod, ovšem vznikají další sloučeniny, které mohou být pro životní prostředí ještě více nebezpečné než původní metformin a guanylmočovina.

Při chloraci vody byly použity 2 úrovně koncentrace chloru běžně používaných při chloraci vod ve vodním hospodářství, a to 0,2 mg · L^{-1} a 1 mg · L^{-1}. Poloviční výchozí koncentrace bylo dosaženo během 5 hodin, a to při použití obou hladin koncentrace. Přibližně 10% koncentrace metforminu bylo dosaženo po 50 hodinách při použití chloru o nižší koncentraci, při použití vyšší koncentrace nebyl ve vzorku přítomen žádný metformin po necelých 10 hodinách. V tomto případě se objevil neočekávaný produkt, a to dimethylamin, který může být pro životní prostředí mnohem více škodlivý, než původní metformin a guanylmočovina.

Nejúčinnější metodou pro odstranění metforminu a guanylmočoviny se na základě tohoto experimentu zdá být chlorace následovaná ozonizací. Flokulace není pro odstranění těchto xenobiotik vhodná. Kvůli vysoké koncentraci metforminu do čistíren vstupující a jeho neúplné degradaci na guanylmočoviny jsou obě tyto látky přítomny v životním prostředí ve vysokém množství.

Ekotoxicita. Bylo prokázáno, že guanylmočovina je absorbována rostlinami a transportována do listů, zrn, semen a plodů a negativně působí na růst rostlin [8]. Z důvodu chybějících dat o degradaci metforminu na guanylmočovinu chybí také informace, které by popisovaly akutní či chronickou toxicitu guanylmočoviny.

3.5 Fytoremediace

Léčiva a další průmyslově významné látky se dostávají prostřednictvím komunálních odpadních vod do čistíren a odtud díky nedokonalé degradaci do životního prostředí. Většinou se jedná o látky toxické, perzistentní, které se hromadí v životním prostředí, pronikají do potravního řetězce a mohou tak nepřímo ohrožovat zdraví člověka [40].

Metod, kterých se využívá pro odstranění či eliminaci organických látek, je několik druhů. K fyzikálně – chemickým metodám se řadí fotodegradace zahrnující samovolnou přeměnu farmak díky absorpci slunečního záření a následný rozpad molekuly léčiva; dále sorpce uplatňující se především v ČOV, kdy působením elektrostatických sil dochází k interakcím pozitivně nabitých léčiv a negativně nabitého aktivovaného čistírenského kalu v případě adsorpce, nebo k hydrofobním interakcím lipofilní membrány bakterií s lipofilním léčivem v případě absorpce [41]. Dalšími fyzikálně – chemickými metodami jsou chemická oxidace, neboli tvorba oxidantů (O_3, ·OH), které mohou ve vodě reagovat s organickými látkami; membránové metody využívající schopnost zachycení léčiva na membránový materiál; a použití aktivního uhlí ve formě prášku nebo granulí k odstranění především nepolárních látek. Nevýhodou těchto metod je vysoká finanční náročnost [40], a proto se neustále hledají a vyvíjí nové levnější metody. V tomto ohledu se nabízí alternativa tzv. kořenových čistíren odpadních vod (KČOV).

Fytoremediace je obecný termín pro skupinu technologií, které využívají rostliny a s nimi spojené mikroorganismy k dekontaminaci, detoxikaci či imobilizaci polutantů v životním prostředí [40, 42]. Fytoremediační technologie se dále dělí na několik skupin, dle chemické povahy a vlastností kontaminantu a dle vlastností použitých rostlin. Společnými znaky fytoremediačních metod jsou jejich poměrně nízké náklady, *in situ* uspořádání, minimální poškození okolí a estetický přínos, přijatelnost veřejností a vhodnost pro různé typy kontaminantů [40]. Polutantem může být látka anorganického i organického původu. K nevýhodám patří dlouhá doba odstranění xenobiotik ze životního prostředí, závislost účinnosti dekontaminace na klimatických a půdních podmínkách a možná kontaminace potravního řetězce díky býložravým druhům zvěře, která se živí nadzemními částmi rostlin, do kterých je transportováno xenobiotikum [40].

Fytodegradace je proces, kdy jsou organické polutanty degradovány prostřednictvím rostlinných enzymů, především nitroreduktas, dehalogenas, cytochromu P – 450, karboxylesteras a transferas [40, 43].

Fytostabilizace, jinak nazývaná fytoimobilizace, je založená na schopnosti rostlin imobilizovat polutanty v okolí rostliny pomocí svých kořenů a zabránit tak jejich dalšímu šíření v půdě, vodě a v potravním řetězci [43, 44].

Fytovolatilizace je založena na schopnosti rostlin absorbovat ionty některých kovů, přeměnit je na těkavou formu a prostřednictvím listů je transportovat do ovzduší [43, 44].

Fytoextrakce je metoda založená na schopnosti rostlin přijmout polutanty kořenovým systémem a transportovat je do nadzemní části rostliny, kde jsou uloženy. Nadzemní části rostlin jsou sklizeny a tak dochází k jejich odstranění z životního prostředí [43, 44].

Rhizofiltrace (fytofiltrace) je metoda podobná fytoextrakci. Využívá především rostliny s mohutným rozvinutým kořenovým systémem k absorpci polutantů, které zůstávají zakoncentrované v kořenech rostlin [43, 44].

Rhizodegradace probíhá výhradně v půdě. Kořenové exsudáty stimulují růst bakterií, které se podílí na úplně či částečné degradaci xenobiotik [43, 44].

4 Experimentální část

4.1 Přístrojové vybavení

- Na analýzu vzorků byly použity:
  - HPLC soustava skládající se z autosampleru Liquid Chromatography Sampler LCS 5040 INGOS, vysokotlakého čerpadla Liquid Chromatography Pump INGOS LCP 5020, detektoru DAD Schimadzu SPD – M20A, kolony Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm) o rozměrech 4,6 x 250 mm a vyhodnocovacího softwaru Clarity (DataApex)

- K určení UV maxima guanylmočoviny byl použit:
  - UV/VIS spektrofotometr Helios α (Anglie)

- Na sterilizaci medií a nádobí byly použity:
  - Elektrický hrnec AVAIR ELLA LUX D6K2A
  - Mikrovlnný sterilizátor MICROJET, ENBIO

- Pro zajištění sterilního prostředí při sázení rostlin a při odběru vzorků medií byly použity:
  - Laminární box s vertikálním prouděním, typ FBB 120, Labox
  - Kahan Fuego pro, WLD – Tec

- K destilaci vody bylo použito zařízení:
  - Demiwa 3 roi, WATEK

- Pro přípravu mobilních fází byly použity:
  - pH metr ISFET mini Lab, model IQ 125
  - pH metr HACH mini Lab, model H 135
  - Magnetické míchadlo IKA® RET basic
  - Mikrovlnná trouba SENCOR s výkonem 900 W

- Pro odplynění mobilních fází byla použita:
  - Ultrazvuková lázeň Fisherbrand ® FB 15050

- Pro uchování odebraných vzorků medií byly použity:
  - Mrazicí box (– 20 ºC) , Liebherr
  - Lednice (3 ºC) , Liebherr

- Pro vážení rostlinného materiálu a veškerých vzorků byly použity:
  - Analytické váhy AFA – 180 LC, ADAM
  - Předvážky AQT – 600, ADAM

- Pro pořízení fotografií zobrazených v diplomové práci byl použit:
  - Mobilní telefon Doogee Y100 Valencia 2 s fotoaparátem 13 Mpx

4.2 Chemikálie

- K rostlinám byly přidávány tyto látky:
  - Metformin izolovaný z Metfogamma 500 potahované tablety, výrobce Wörwag Pharma GmbH (Německo)
  - N – guanylmočovina hemisulfát hydrát (čistota 97 %, Sigma – Aldrich)

- Pro přípravu mobilní fáze potřebné k analýze metforminu byly použity:
  - Dodecylsulfát sodný (čistota 99,8 %, Sigma – Aldrich)
  - Methanol HPLC Super Gradient Grade (čistota 99,8 %, VWR)
  - Acetonitril HPLC (čistota 99,9 %, Lab – Scan)

- Pro přípravu mobilní fáze potřebné k analýze guanylmočoviny byly použity:
  - Mravenčan amonný (čistota 99,995 %, Sigma – Aldrich)
  - Methanol HPLC Super Gradient Grade (čistota 99,8 %, VWR)

- Pro sterilizaci rostlinných semen byly použity:
  - Ethanol denaturovaný
  - Savo Original 900 ml, UNILEVER ČR spol. s.r.o.
  - Jar na nádobí, příchuť citron (Procter & Gamble s.r.o.)

- Pro sterilizaci plastových nádob potřebných k namíchání médií byl použit:
  - Peroxid vodíku 30 % nestabilizovaný (Lach – Ner, s.r.o)

- Chemikálie k přípravě medií:
  - *Myo* – inositol HPLC, čistota 99,0 % (Fluka Analytical)
  - Sacharosa, čistota dle ČSL 3, (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
  - Phytagel ^{TM} (Sigma – Aldrich)
  - Ostatní chemikálie pro přípravu medií byly kvality p.a. (Sigma – Aldrich)

- K úpravě pH medií byly použity:
  - Kyselina citronová bezvodá p.a., čistota 99,5 % (Lach – Ner, s.r.o.)
  - Hydroxid draselný, čistota 84,5 % (Penta)

4.3 Rostlinný materiál

Ke studiu fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny byly použity tyto rostlinné materiály:

- Kukuřice setá *(Zea mays L.)*, polní kultivar DKC 4014, FAO 300 (MONSANTO ČR, s.r.o.)
- Hrách setý *(Pisum sativum L.)*, peluška (dodavatel Vlastimil Kubín)
- Staurogynus plazivý *(Staurogyne repens L.)*, akvarijní rostlina (PROFIPLANTS® Laboratory)
- Plevuňka Reinekova Mini *(Alternanthera reineckii Mini L.)*, akvarijní rostlina (PROFIPLANTS® Laboratory)
- Oves obecný (*Avena sativa L.),* (Johnsons ^{TM}, UK)

4.4 Postup práce

4.4.1 Příprava medií

Pro pěstování rostlin byly použity 4 druhy živných medií:

- Murashige a Skoog medium bez cukru (MS – BC)
- Murashige a Skoog medium obsahující cukr (MS)
- Murashige a Skoog medium obsahující hormony (MS – H)
- Murashige a Skoog medium obsahující Phytagel (MS – P)

Přesná složení medií jsou uvedena v tabulkách 4.1 – 4.4.

Tabulka 4.1 – Složení Murashige and Skoog media bez cukru (MS – BC)

Chemikálie	Koncentrace [mg · L^{-1}]
Makro prvky	
NH_4NO_3	1 650
KNO_3	1 900
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Mikro prvky	
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	22,3
$ZnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	8,3
KI	0,83
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,25
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,025
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,025
Fe^{II} komplex	
Na_2EDTA	37,2
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27,8
pH media upraveno na 5,8	

Tabulka 4.2 – Složení Murashige a Skoog media s cukrem (MS)

Chemikálie	Koncentrace [mg · L^{-1}]
Sacharosa	30000
Myo–inositol	100
Mikroprvky, makroprvky a Fe^{II} komplex ve stejném složení jako MS – BC medium	
pH media upraveno na 5,8	

Tabulka 4.3 – Složení Murashige a Skoog media s hormony (MS – H)

Chemikálie	Koncentrace [mg · L^{-1}]
Sacharosa	30000
Myo–inositol	100
Mikroprvky, makroprvky a Fe^{II} komplex ve stejném složení jako MS – BC medium	
Kys. indolylmáselná	1
Benzylaminopurin	1,5
pH media upraveno na 6,0	

Tabulka 4.4 – Složení Murashige a Skoog media s phytagelem (MS – P)

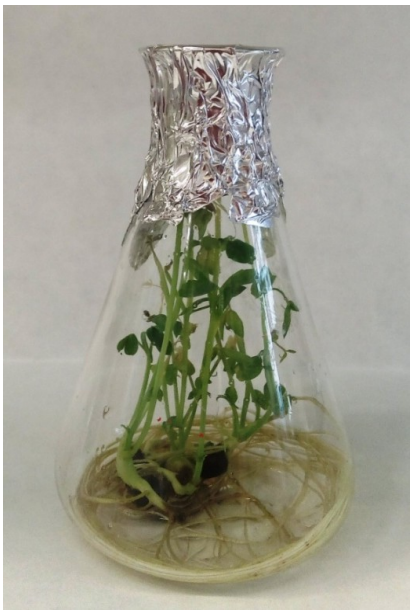
Chemikálie	Koncentrace [mg · L^{-1}]
Sacharosa	30000
Myo–inositol	100
Mikroprvky, makroprvky a Fe^{II} komplex ve stejném složení jako MS – BC medium	
Phytagel	1700
pH media upraveno na 5,6	

Pro dosažení požadované konzistence bylo MS – P medium ohříváno v mikrovlnné troubě po dobu 1 minuty.

4.4.2 Kultivace sterilních rostlin

Semena hrachu setého, kukuřice seté a ovsa obecného byla nejprve odmaštěna 70% ethanolem s kapkou komerčního smáčedla (Jar) po dobu 30 vteřin. Poté byla semena sterilizována 20% roztokem Sava po dobu 10 minut a dále 10% roztokem Sava po dobu 20 minut. Následně byla třikrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou.

Iniciace kultur hrachu setého byla provedena následujícím způsobem: Za sterilních podmínek byla vysterilizovaná semena přenesena v laminárním boxu s vertikálním prouděním do 250 mL Erlenmeyerových baněk se sterilním MS – H mediem o objemu 15 mL. Do každé baňky byla přenesena 4 semena. Následná kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 24 ºC s osvětlením zářivkami White Cool (Philips) 40 W/m^2ze vzdálenosti 40 cm ve světelném režimu 16 h světlo/8 h tma. Po 20 – 25 dnech kultivace bylo přidáno 25 mL MS – BC media a zásobní roztok metforminu a guanylmočoviny o různých koncentracích. V prvním experimentu byl přidán metformin ve dvou koncentracích, a to 15 mg · mL^{-1} k 5 kultivacím hrachu setého a 10 mg · mL^{-1}, taktéž k 5 kultivacím. V dalších experimentech byla přidána guanylmočovina o koncentracích 15 mg · mL^{-1} k 5 kultivacím hrachu setého a 20 mg · L^{-1} opět k 5 kultivacím hrachu setého.



Obr. č. 4.1 – Ukázka kultivace sterilního hrachu setého (*Pisum sativum L.*) (fotografie pořízena 25. den kultivace)

Iniciace kultur kukuřice seté probíhala následujícím způsobem: Za sterilních podmínek byla vysterilizovaná semena přenesena v laminárním boxu s vertikálním prouděním do 500 mL Erlenmeyerových baněk se sterilním MS mediem o objemu 20 mL; do každé baňky byla vnesena 4 semena. Následná kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 24 ºC s osvětlením zářivkami White Cool (Philips) 40 W/m^2ze vzdálenosti 40 cm ve světelném režimu 16 h světlo/8 h tma. Kultury, které během kultivace vykazovaly známky kontaminace, byly průběžně likvidovány. Po 10 - 14 dnech kultivace bylo ke kukuřicím přidáno 100 mL MS – BC media a připravený zásobní roztok metforminu nebo guanylmočoviny o různých koncentracích. V prvním experimentu byl přidán zásobní roztok metforminu k 5 kultivacím kukuřice seté tak, aby jeho výsledná koncentrace v přidaném MS – BC mediu byla 15 mg · mL^{-1}. Schopnost fytoextrakce metforminu kukuřicí setou byla testována již v bakalářské práci [11], nyní byl experiment pro ověření zopakován. V dalších experimentech byla přidána guanylmočovina tak, aby její finální výchozí koncentrace v MS – BC mediu 8 kultivací byla 20 mg · mL^{-1} a v 6 kultivacích 15 mg · mL^{-1}. V posledním experimentu byl přidán zásobní roztok metforminu a guanylmočoviny k 5 kultivacím současně, obě látky v koncentraci 15 mg · mL^{-1}.

Obr. č. 4.2 – Ukázka sterilní kultivace kukuřice seté (*Zea mays L.*) (fotografie pořízena 8. den kultivace)

Iniciace kultur ovsa obecného byla provedena následujícím způsobem: Za sterilních podmínek byla vysterilizovaná semena přenesena v laminárním boxu s vertikálním prouděním do 500 mL Erlenmeyerových baněk se sterilním MS mediem o objemu 20 mL. Do každé baňky bylo přeneseno 8 semen. Následná kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 24 ºC s osvětlením zářivkami White Cool (Philips) 40 W/m^{2}ze vzdálenosti 40 cm ve světelném režimu 16 h světlo/8 h tma. Po 4 týdnech kultivace bylo ke 4 kulturám ovsa obecného přidáno 100 mL MS – BC media a zásobní roztok metforminu tak, aby jeho výsledná koncentrace v přidaném MS – BC mediu byla 10 mg · mL^{-1}.

Obr. č. 4.3 – Ukázka sterilní kultivace ovsa obecného *(Avena sativa L.)* (fotografie pořízena po měsíci kultivace)

Iniciace obou druhů vodních rostlin se lišila od kultivace suchozemských druhů ze semen. Vodní rostliny byly dodány v plastových kelímcích o průměru 6,5 cm a výšce 6 cm. Kelímek obsahoval sterilní agar a byl uzavřen plastovým víčkem. Pro dosažení většího počtu rostlin se vodní rostliny rozsazovaly do čistých kelímků se sterilním MS – P mediem. Následná kultivace probíhala v kultivační místnosti při teplotě 24 ºC s

osvětlením zářivkami White Cool (Philips) 40 W/m^{2}ze vzdálenosti 40 cm ve světelném režimu 16 h světlo/8 h tma. Takto se kultivovaly asi měsíc. Pro studium fytoextrakce byly rostliny očištěné od MS – P media přeneseny v laminárním boxu s vertikálním prouděním do 250 mL Erlenmeyerových baněk se sterilním MS - BC mediem o objemu 200 mL obsahujícím metformin o koncentraci 10 mg · mL^{-1}. V případě vodní rostliny plevuňky Reineckovy mini byly použity 4 kultury této rostliny, v případě staurogynu plazivého 6 kultur.

Obr. č. 4.4 – Ukázka sterilních vodních rostlin – vlevo Staurogynus plazivý *(Staurogyne repens L.)* a vpravo plevuňka Reinekova Mini *(Alternanthera reineckii mini L.)* (fotografie pořízena první den od přesazení z plastového kelímku obsahujícího MS – P medium do Erlenmeyerovy baňky obsahující MS – BC media – tedy asi měsíc od zakoupení originálního balení)

4.4.3 Odběry vzorků k analýze

Ihned po prvním přídavku metforminu, resp. guanylmočoviny, byl odebrán vzorek MS – BC media z Erlenmeyerovy baňky s rostlinou pomocí injekční stříkačky a sterilní jehly ke stanovení přesné výchozí koncentrace xenobiotika. Baňka byla opět sterilně uzavřena hliníkovou folií. Následující dny byly odebírány vzorky vždy ve 24 – hodinových intervalech pomocí injekční stříkačky a sterilní jehly. Vzorky byly uchované v mrazicím boxu pro následné analýzy. Baňky, v nichž byla pozorovatelná kontaminace a medium nebo rostliny plesnivěly, byly zlikvidovány a odběr byl ukončen. Odběr všech vzorků byl ukončen obvykle po 5 dnech, výjimkou byly oba druhy vodních rostlin, které nebyly tolik náchylné ke kontaminaci. Odběr u vodních rostlin byl proveden ještě 8. a 15. den od prvního přídavku metforminu. Rostliny byly po kultivaci omyty destilovanou vodou, osušeny pomocí filtračního papíru a zváženy.

4.4.4 HPLC analýza odebraných vzorků

Pro výzkum fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí.

Mobilní fáze pro analýzu metforminu byla 5 mM SDS : methanol : acetonitril v poměrech 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok mobilní fáze byl 1,2 mL · min^{-1}, UV detekce při 233 nm, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm. Zvolená mobilní fáze a vlnová délka byla totožná s měřením metforminu v bakalářské práci a byla zvolena na základě publikované literatury [44, 45, 46]. Kvantifikace metforminu byla provedena dle kalibrační řady s jednotlivými koncentracemi 5; 10; 20; 30 a 40 mg · mL^{-1}. Odebrané vzorky medií s metforminem byly analyzovány vždy od prvního do posledního dne odběru jedné rostliny a tím byl stanoven pokles koncentrace metforminu v mediu. Pro porovnání byla schopnost fytoextrakce metforminu různými kulturami přepočtena na gram čerstvé hmotnosti rostliny.

Mobilní fází pro analýzu guanylmočoviny byla 5 mM mravenčan amonný ve vodě : methanol v poměru 90 : 10 (v/v), průtok mobilní fáze 0,7 mL · min^{-1}, zvolená UV detekce byla 210 nm, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm. Složky

mobilní fáze byly zvoleny na základě publikované literatury [38] a byl optimalizován poměr vodné a organické složky tak, aby byly co nejlépe odděleny složky MS – BC media a guynylmočovina. UV detekce nebyla uvedena v dosud žádné publikované literatuře, proto bylo změřeno UV absorpční maximum guanylmočoviny, na jehož základě byla látka měřena při 210 nm. Kvantifikace guanylmočoviny byla provedena dle kalibrační řady s jednotlivými koncentracemi 5; 10; 20; 30 a 40 $mg \cdot mL^{-1}$. Odebrané vzorky medií s guanylmočovinou byly analyzovány vždy od prvního do posledního dne odběru jedné rostliny a tím byl stanoven pokles koncentrace guanylmočoviny v mediu. Pro porovnání byla schopnost fytoextrakce guanylmočoviny různými kulturami přepočtena na gram čerstvé hmotnosti rostliny.

K určení přesného množství guanylmočoviny pro navážky a kalibraci HPLC měření ve vzorku byla provedena elementární analýza v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, neboť zakoupený vzorek guanylmočoviny byl hemisulfát s nedefinovaným množstvím vody. Elementární analýzou byl stanoven sumární vzorec $C_4H_{16}N_8O_7S$, což odpovídá hemisulfátu monohydrátu guanylmočoviny. Obsah báze guanylmočoviny je potom 63,75%. Navážky pro kultivace jsou udávány pro dodaný materiál, hemisulfát mohohydrát guanylmočoviny, pro vyhodnocení fytoextrakčních parametrů byly potom navážky přepočteny na čistou bázi guanylmočoviny.

5 Výsledky a diskuse

V diplomové práci byla zkoumána fytoextrakce metforminu a jeho metabolitu vznikajícího v čistírnách odpadních vod - guanylmočoviny pomocí *in vitro* kultivovaných rostlin kukuřice seté *(Zea mays L.)*, hrachu setého *(Pisum sativum L.)*, ovsa obecného *(Avena sativa L.)*, staurogynu plazivého (*Staurogyne repens L.)* a plevuňky Reinekovy mini *(Alternanthera reineckii Mini L.).*

Ke kultivacím byly přidávány metformin a guanylmočovina o různých koncentracích a sledován pokles koncentrace testovaných látek v mediu v časové závislosti. Odběry byly v kultivacích prováděny sterilně, ve 24 – hodinových intervalech. Po ukončení kultivací byly rostliny z jednotlivých kultur zváženy a celková fytoextrakční schopnost vztažena k čerstvé hmotnosti rostlin.

Některé rostliny během experimentu viditelně odumíraly a byla u nich pozorována plíseň. To mohlo být způsobeno kontaminací v průběhu odebírání vzorku media. Vzorky od kontaminovaných kultur nebyly dále odebírány a byly ze sady měření vyloučeny. V průběhu měření se předpokládal pokles xenobiotika s narůstající dobou kultivace. Některé hodnoty koncentrací metforminu však oproti předchozímu dni vzrostly. To může být způsobeno zpětným přechodem adsorbovaného či absorbovaného metforminu zpět do media v důsledku odumírání či jiné destrukce kořenového systému. Metabolické pochody rostlin ani jejich enzymová výbava nebyly v diplomové práci studovány, proto tyto vzorky byly opět ze sady vyloučeny.

5.1 Studium fytoextrakce metforminu

Schopnost fytoextrakce metforminu byla postupně prováděna na všech výše zmíněných rostlinách.

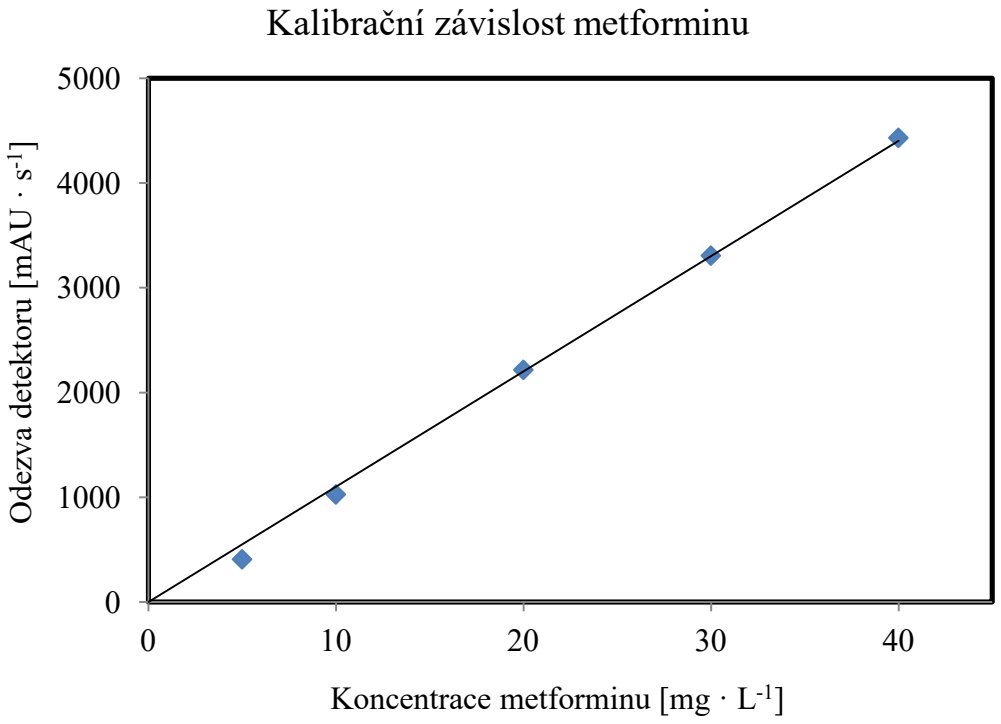
Analytická stanovení metforminu byla prováděna pomocí HPLC s UV detekcí (233 nm). Mobilní fáze byla 5 mM SDS : methanol : acetonitril 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok 1,2 ml · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm) o rozměrech 4,6 x 250 mm.

5.1.1 Kalibrační závislost metforminu, mez detekce a kvantifikace

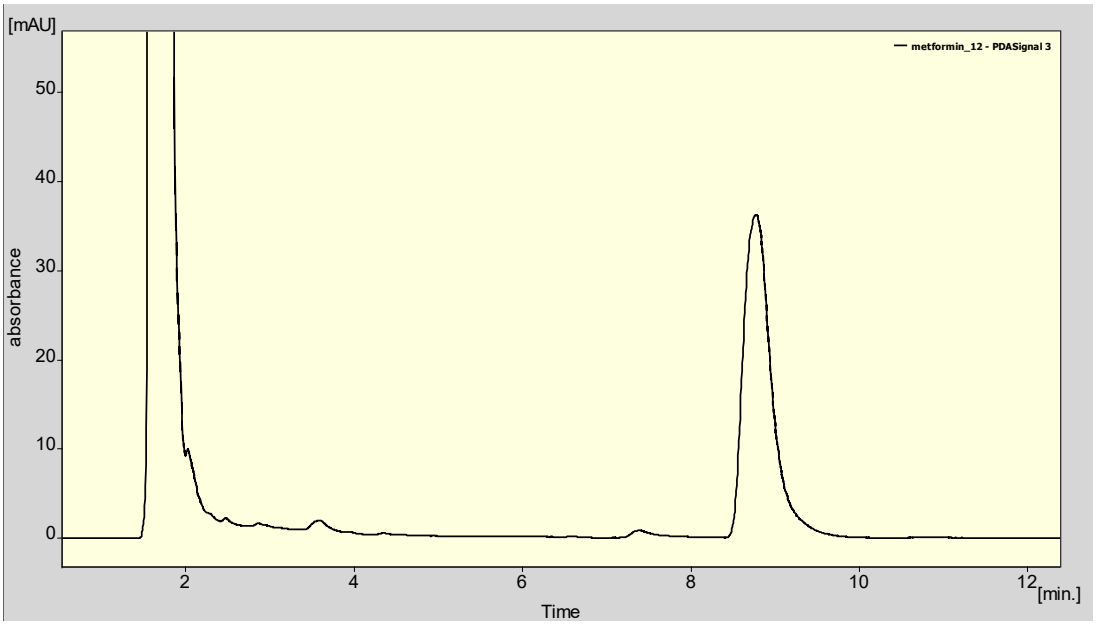
Ke kvantifikaci metforminu byla nejprve proměřena kalibrační závislost jako závislost odezvy UV detektoru na koncentraci metforminu. K sestrojení závislosti byly použity kalibrační roztoky metforminu o koncentracích 5; 10; 20; 30 a 40 mg · L^{-1}.

Kalibrační závislost je zobrazena na obrázku č. 5.1, chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci 20 mg · L^{-1} je zobrazen na obrázku č. 5.2.

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) metforminu byly určeny jako trojnásobek, resp. desetinásobek výšky šumu u kalibračního roztoku o koncentraci 5 mg · L^{-1}. Mez detekce LOD metforminu byla 17 µg · L^{-1}, mez kvantifikace LOQ metforminu byla rovna 56 µg · L^{-1}.



Obr. č. 5.1 – Kalibrační závislost metforminu (HPLC/ UV 233 nm, mobilní fáze 5 mM SDS : methanol : acetonitril (50 : 25 : 25 (v/v/v)), 1,2 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 µm), 4,6 x 250 mm).



Obr. č. 5.2 – Chromatogram kalibračního roztoku metforminu o koncentraci 20 mg · L^{-1}. (HPLC/ UV 233 nm, mobilní fáze 5 mM SDS : methanol : acetonitril (50 : 25 : 25 (v/v/v)), 1,2mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm).

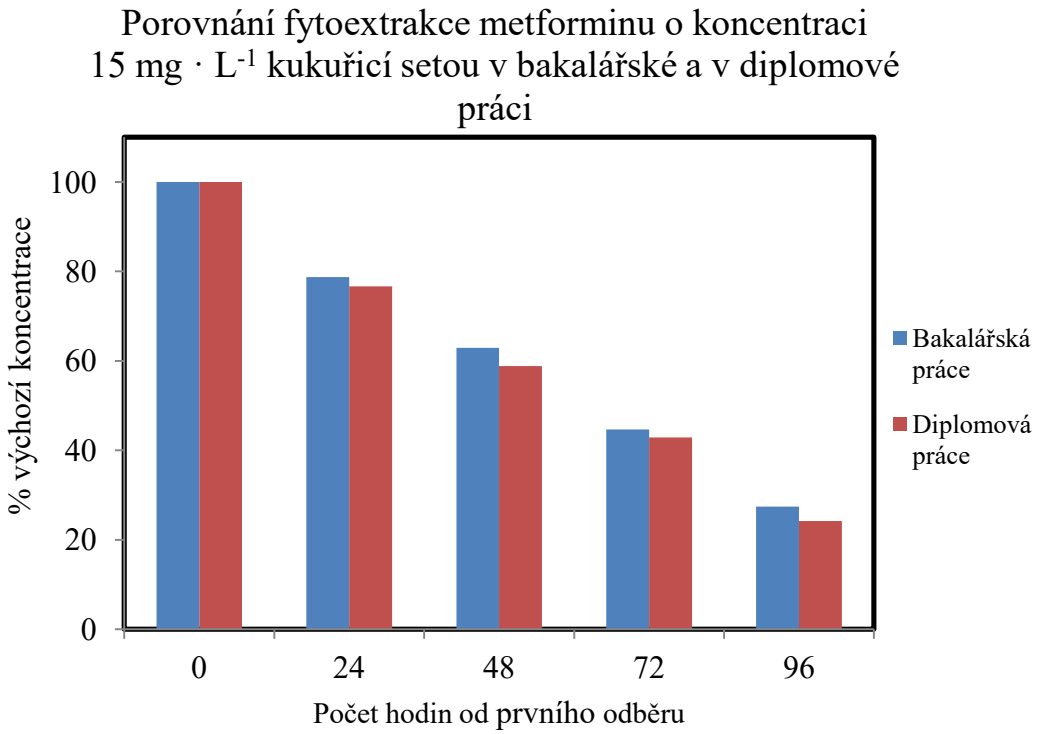
5.1.2 Kukuřice setá *(Zea mays L.)* + metformin

Fytoextrakce metforminu pomocí kukuřice seté *(Zea mays L.)* byla studována již ve vlastní bakalářské práci obhájené v červnu 2015. Hodnoty koncentrací metforminu v mediu klesaly lineárně v průměru o 15 – 20 % oproti předchozímu dni. Průměrná výchozí koncentrace 12,29 mg · L^{-1} klesla za 96 hodin na 3,43 mg · L^{-1}, tedy asi na 27 % výchozí koncentrace. Jeden gram rostliny byl schopen vyextrahovat 0,15mg metforminu během 5 dnů.

V diplomové práci byl tento experiment zopakován pro ověření metody. Bylo použito 5 kultivací kukuřice seté, do kterých bylo po 14 dnech kultivace přidáno 100 mL MS – BC media a zásobní roztok metforminu tak, aby jeho koncentrace v mediu byla 15 mg · L^{-1}. Odběr vzorků trval 5 dní vždy ve 24 – hodinových intervalech. Během 5 dnů klesla koncentrace metforminu v mediu na 24 % původní výchozí koncentrace, každým dnem klesala koncentrace v průměru o 15 – 20 % oproti

předchozímu dni. Jeden gram rostliny kukuřice seté byl schopen vyextrahovat 0,15 mg metforminu během 5 dnů.

Porovnání poklesu koncentrace metforminu v bakalářské a v diplomové práci je znázorněno na obrázku č. 5.3.



Obr. č. 5.3 – Porovnání fytoextrakce metforminu kukuřicí setou *(Zea mays L.)* v bakalářské práci a v diplomové práci.

Výsledek experimentu v diplomové práci je v souladu s výsledkem měření v bakalářské práci. Výsledky tak byly ověřeny a analytická metoda byly použita pro studium fytoextrakce metforminu dalšími druhy rostlin.

5.1.3 Hrách setý *(Pisum sativum L.)* + metformin

K dalšímu studiu fytoextrakce metforminu byl použit hrách setý *(Pisum sativum L.).* Metformin byl k hrachu přidán ve dvou koncentracích – v prvním experimentu bylo k pěti kultivacím hrachu přidáno 25 mL MS – BC media a zásobní roztok metforminu tak, aby jeho koncentrace v přidaném MS – BC mediu byla 15 mg · L^{-1}; a v druhém experimentu 10 mg · L^{-1}, taktéž k pěti kultivacím.

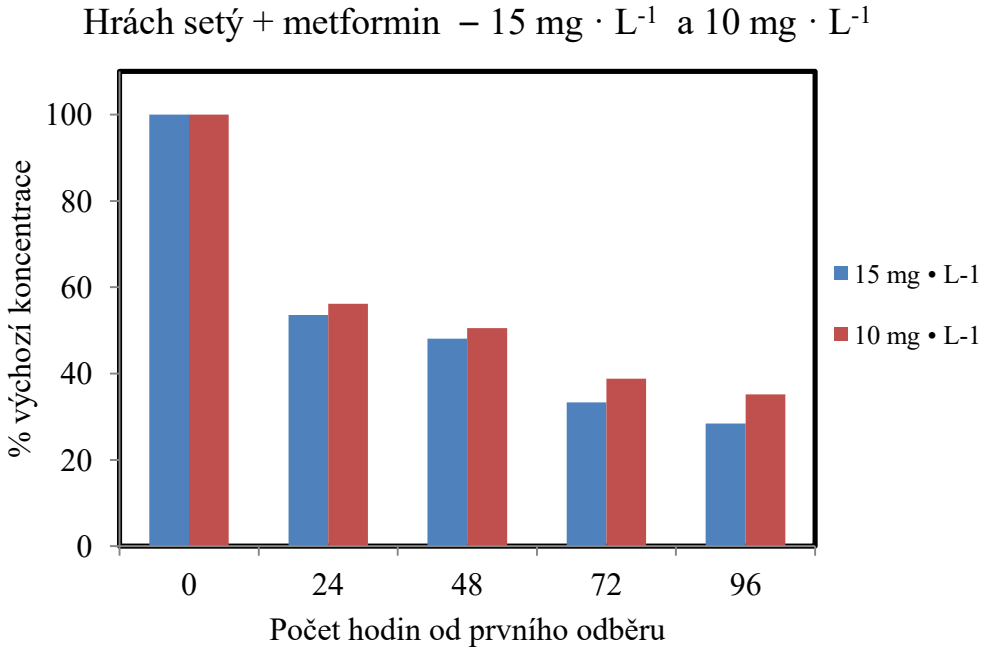
U koncentrace 15 mg · L^{-1} byla stanovena průměrná výchozí koncentrace na 14,56 mg · L^{-1}. Rozdíl teoretické a stanovené koncentrace metforminu může být způsoben okamžitou primární sorpcí léčiva na kořeny rostliny, nebo případně naředěním MS – BC media, jelikož zbytkové množství media, které zůstalo v Erlenmeyerově baňce v průběhu 20 – 25 denní kultivace, nebylo slito z důvodu omezení kontaminace rostliny.

Průměrná koncentrace metforminu klesala každým dnem, což se při experimentu předpokládalo. Největší pokles na této hladině koncentrace byl zaznamenán mezi 1. – 2. odběrem. Během prvních 24 hodin klesla výchozí koncentrace metforminu na necelých 54 %. Odběry probíhaly po dobu 5 dnů vždy ve 24 – hodinových intervalech. Poslední den odběru byla stanovena průměrná koncentrace 4,14 mg · L^{-1}, tedy asi 28 % výchozí koncentrace. Pátý den již rostliny vykazovaly známky odumírání a jejich medium bylo zakalené. Proto byl odběr vzorků 5. den ukončen, rostliny omyty destilovanou vodou, osušeny filtračním papírem a zváženy. Jejich celková hmotnost byla 25,09 g. Jeden gram čerstvé hmotnosti hrachu setého je schopen během 5 dnů extrahovat 0,05 mg metforminu při výchozí koncentraci 15 mg · L^{-1}.

Při přídavku metforminu do 25 mL MS – BC media na požadovanou koncentraci 10 mg · L^{-1} byla stanovena výchozí koncentrace léčiva na 9,52 mg · L^{-1}. Rozdíly teoretické a stanovené koncentrace jsou stejné jako u předchozího experimentu – tedy primární sorpce léčiva na kořeny rostliny a případné naředění přidaného MS – BC media původním zbytkovým MS – H mediem použitým při kultivaci rostliny. Zhruba 50% výchozí koncentrace metforminu bylo dosaženo za 48 hodin od prvního přídavku, během 5 dnů klesla koncentrace metforminu o necelých 65 %. Pátý den byl odběr ukončen a rostliny zpracovány stejným způsobem jako u předchozího experimentu. Jejich hmotnost činila celkem 22,02 g. Jeden gram čerstvé hmotnosti rostliny hrachu

setého byl schopen vyextrahovat 0,04 mg metforminu na hladině koncentrace 10 mg · L^{-1} během 5 dnů.

Poklesy koncentrací metforminu na obou hladinách koncentrace jsou zobrazeny na obr. č. 5.4.



Obr. č. 5.4 – Fytoextrakce metforminu se vstupními koncentracemi 15 mg · L^{-1} a 10 mg · L^{-1} hrachem setým *(Pissum sativum L.)*.

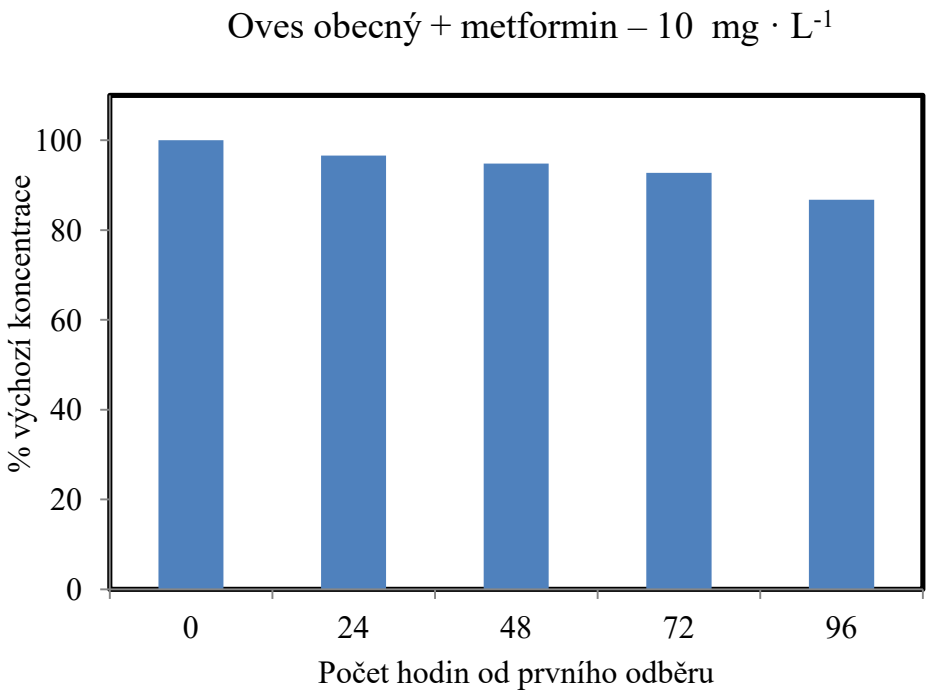
5.1.4 Oves obecný *(Avena sativa L.)* + metformin

V dalším experimentu fytoextrakce metforminu byly použity 4 rostliny ovsa obecného *(Avena sativa L.)*. Po 4 týdnech kultivace bylo k rostlinám přidáno 100 mL MS – BC media a zásobní roztok metforminu tak, aby jeho výsledná koncentrace v mediu byla 10 mg · L^{-1}. Protože rostliny ovsa obecného byly velmi slabého vzrůstu, byla zvolena nižší výchozí koncentrace, aby rostlina nebyla vyšší koncentrací zlikvidována.

Průměrná výchozí koncentrace byla stanovena na 8,84 mg · L^{-1}. Rozdíl teoretické a stanovené koncentrace je opět stejný – primární záchyt léčiva na kořeny rostlin, který nesouvisí s extrakčními pochody a naředění zbylého MS media použitého při kultivaci. Tato poznámka již nebude u dalších experimentů zmiňována.

Hodnoty koncentrací klesaly v průměru jen o 5 - 8 % oproti předchozímu dni.

Poklesy koncentrací metforminu jsou zobrazeny na obr. č. 5.5.



Obr. č. 5.5 – Fytoextrakce metforminu pomocí ovsa obecného *(Avena sativa L.)*.

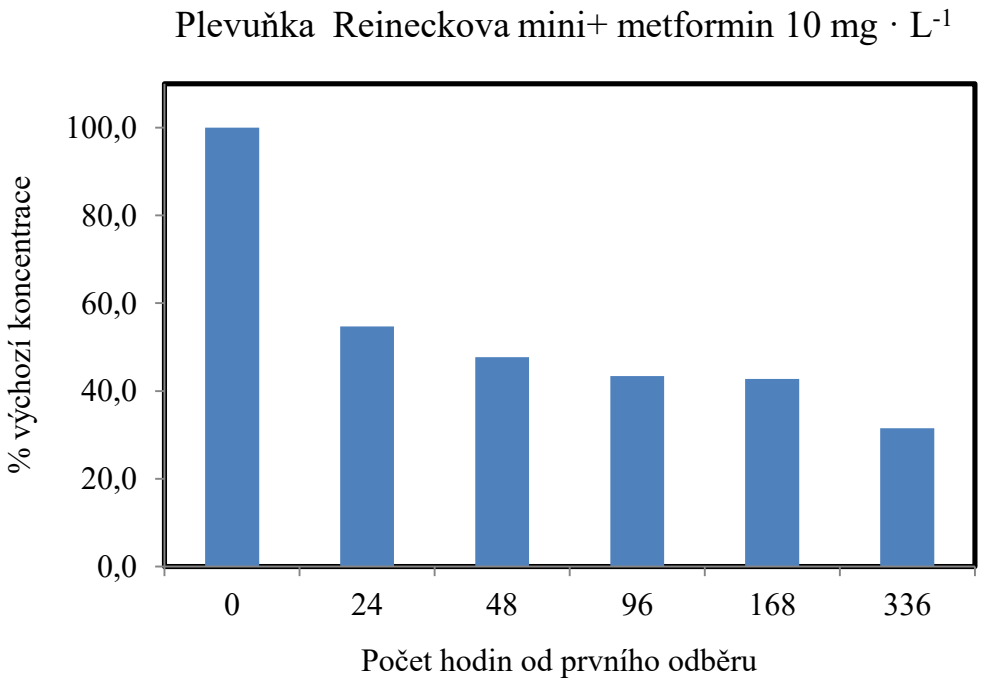
Protože je schopnost fytoextrakce přepočtena na váhu čerstvé hmotnosti rostlinné tkáně, tyto nízké poklesy nelze vzhledem k nízké tvorbě biomasy u ovsa obecného přímo porovnávat s poklesy koncentrací u předchozích experimentů, kdy v průběhu kultivace klesla výchozí koncentrace až o 65 – 75 %. Celková hmotnost 4 rostlin ovsa obecného činila 10,00 g. Jeden gram ovsa obecného byl schopen extrahovat 0,09 mg metforminu během 5 dnů. Tuto hodnotu lze s předchozím experimentem srovnávat a lze říct, že 1 gram ovsa obecného je schopen vyextrahovat během 5 dnů přibližně 1,7 – 2,3 krát více metforminu než hrách setý.

5.1.5 Plevuňka Reineckova Mini *(Alternanthera reineckii Mini L.)* + metformin

V následném experimentu byla provedena fytoextrakce metforminu na vodní rostlině plevuňce Reineckově *(Alternanthera reineckii Mini L.).* Ke 4 rostlinám plevuňky bylo přidáno 200 mL MS – BC media již obsahujícího metformin o koncentraci 10 mg · L^{-1}. Přesná výchozí koncentrace metforminu ve vzorku MS – BC media byla stanovena na 9,92 mg · L^{-1}. Vzorek MS – BC media s metforminem ke stanovení přesné výchozí koncentrace byl odebrán ještě před přídavkem k rostlinám, proto se rozdíl teoretické a přesně stanovené výchozí koncentrace liší jen minimálně, nejsou zde přítomny žádné vlivy, které by mohly hodnotu výchozí koncentrace výrazně ovlivnit.

K nejvýraznějšímu poklesu došlo v průběhu prvních 24 hodin, kdy koncentrace klesla oproti stanovené výchozí koncentraci na téměř 55 % její hodnoty. Protože pluvuňka Reineckova nebyla tolik náchylná na odumírání a plesnivění jako předchozí použité kukuřice setá, hrách setý a oves obecný, nebyly rostliny 5. den sklizeny a experiment pokračoval. Vzorky byly odebrány ještě 8. den a 15. den od prvotního přídavku metforminu. Mezi 5. a 8. dnem došlo k poklesu průměrně jen o 0,7 %. Mezi 8. a 15. dnem došlo k poklesu o 11 % na průměrnou hodnotu koncentrace 3,15 mg · L^{-1}. Koncentrace léčiva by s přibývajícím časem pravděpodobně stále klesala, poklesy by však nebyly již tak významné, proto byl odběr vzorků ukončen a rostliny omyty, osušeny a zváženy.

Poklesy koncentrace metforminu během experimentu jsou zobrazeny na obrázku č. 5.6.



Graf č. 5.6 – Fytoextrakce metforminu pomocí plevuňky Reineckovy *(Alternanthera reineckii Mini L.)*.

Aby byla schopnost fytoextrakce metforminu plevuňkou srovnatelná s ostatními experimenty, byla vyhodnocena k 5. dni odběru a také k celkové době experimentu. Jeden gram plevuňky Reineckovy je schopen extrahovat 1,01 mg metforminu během 5 dnů, resp. 1,20 mg během 15 dnů.

5.1.6 Staurogynus plazivý *(Staurogyne repens L.)* + metformin

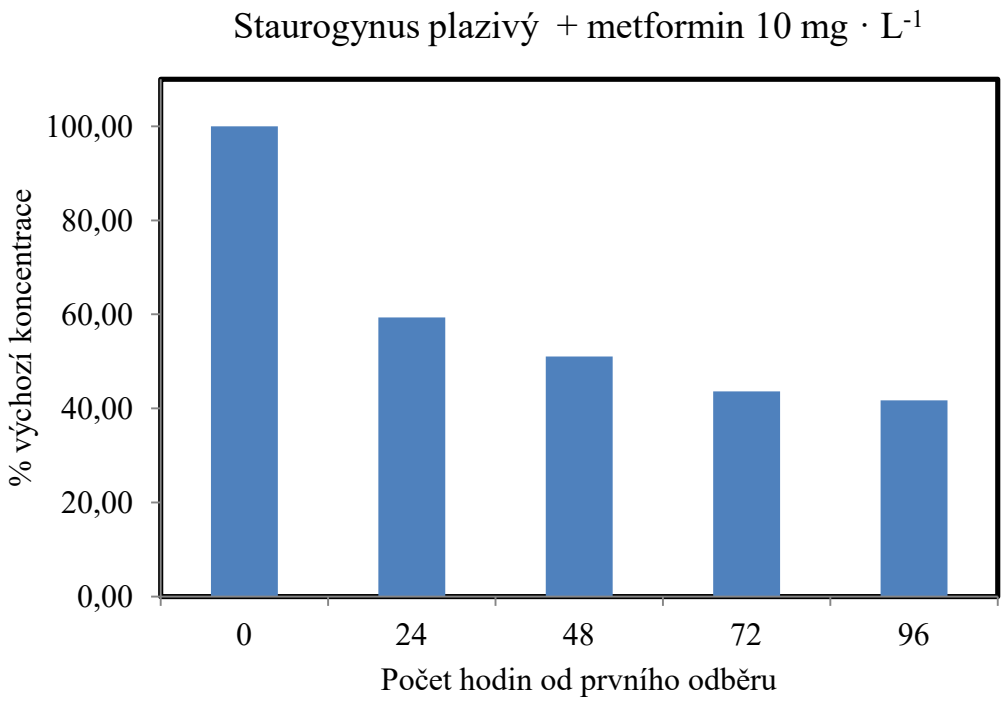
V posledním experimentu studující fytoextrakci samotného metforminu byla použita vodní rostlina staurogynus plazivý *(Staurogyne repens L.)*. K 6 kultivacím této vodní rostliny bylo přidáno 200 mL MS – BC media s metforminem o koncentraci 10 mg · L^{-1}. Výchozí koncentrace metforminu byla stanovena na 9,92 mg · L^{-1}. Stejně jako u plevuňky, i zde byla stanovena přesná výchozí koncentrace metforminu ve vzorku MS – BC media před jeho přídavkem k rostlině, proto je rozdíl teoretické a

přesně stanovené výchozí koncentrace minimální, nedochází zde k žádným vlivům, které by mohly hodnotu výchozí koncentrace výrazně ovlivnit.

Nejvyššího poklesu výchozí koncentrace metforminu bylo dosaženo během prvních 24 hodin a to přibližně o 40 %. Pátý den činila koncentrace metforminu v MS – BC mediu průměrně 5,1 mg · L^{-1}, tedy asi 51 % výchozí koncentrace.

Protože nebyl staurogynus natolik náchylný na odumírání a plesnivění jako předchozí použité kukuřice setá, hrách setý a oves obecný, nebyly rostliny 5. den sklizeny a experiment pokračoval. Vzorky byly odebrány ještě 8. den a 15. den od prvotního přídavku metforminu. Mezi 5. a 8. dnem došlo k poklesu o necelých 7 %, mezi 8. a 15. dnem jen o necelá 2 %. Koncentrace léčiva by se zřejmě s narůstajícím časem dále snižovala, pokles by však nejspíš nebyl natolik výrazný, a proto byl experiment ukončen. Rostliny byly zpracovány stejným způsobem jako u předchozích experimentů – omyty destilovanou vodou, osušeny filtračním papírem a zváženy.

Výsledky tohoto experimentu jsou zobrazeny na obrázku č. 5.7.



Obr. č. 5.7 – Fytoextrakce metforminu vodní rostlinou staurogynem plazivým *(Staurogyne repens L.).*

Aby byla fytoextrakce metforminu starogynem plazivým porovnatelná s ostatními experimenty, byla přepočítána k 5. dni odběru a také k celkové době experimentu. Jeden gram této vodní rostliny je schopen vyextrahovat 1,87 mg během 5 dnů, resp. 2,22 mg během 15 dnů.

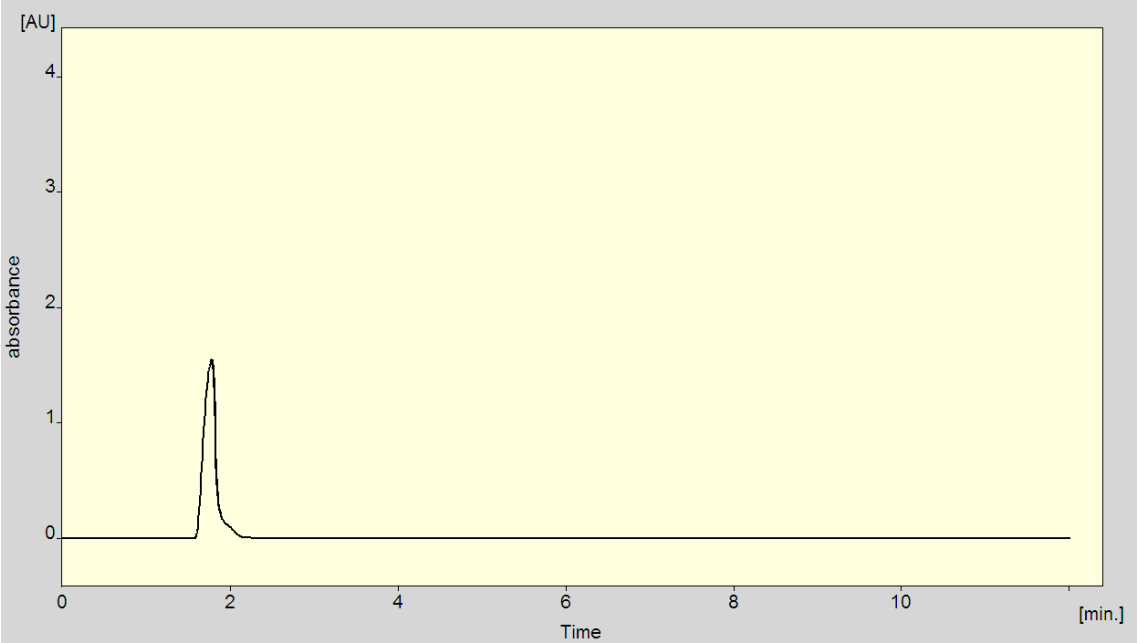
Shrnutí schopnosti fytoextrakce metforminu s různými výchozími koncentracemi s využitím 5 druhů rostlin je uvedeno v následující tabulce č. 5.1.

Tab. č. 5.1 – Shrnutí výsledků fytoextrakce metforminu pomocí 5 druhů rostlin.

Rostlina	Koncentrace metforminu [mg · L^{-1}]	Fytoextrakce za 5 dnů [mg léčiva · g^{-1} rostliny]
Zea mays L.	15	0,15
Pisum sativum L.	15	0,05
Pisum sativum L.	10	0,04
Avena sativa L.	10	0,09
Alternanthera reineckii Mini L.	10	1,01
Staurogyne repens L.	10	1,87

Aby bylo zřejmé, že sloučeniny vylučované rostlinou do media neinterferují s analýzou metforminu či zda samotný metformin nepodléhá změnám při kultivaci vlivem světla nebo složek media, byly provedeny dva slepé pokusy.

U prvního slepého pokusu bylo k vypěstované kultuře kukuřice seté přidáno pouze MS – BC medium bez metforminu. Vzorky media byly odebírány stejným způsobem jako všechny ostatní vzorky media obsahující metformin. Při měření těchto slepých pokusů každý den eluovaly pouze složky MS – BC media ve 2. – 3. minutě, v oblasti eluce metforminu (10. minuta) nebyly pozorovány žádné píky. Tím bylo ověřeno, že složky MS – BC media nenarušují analýzu stanovovaného léčiva. Slepá analýza metforminu je zobrazena na obrázku č. 5.8.



Obr. č. 5.8 – Slepý pokus měření – MS – BC medium bez metforminu. (HPLC/ UV 233 nm, mobilní fáze 5 mM SDS : methanol : acetonitril (50 : 25 : 25 (v/v/v)), 1,2 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 µm), 4,6 x 250 mm).

V druhém slepém pokusu probíhaly odběry vzorků media s metforminem o koncentraci 15 mg · L^{-1} z Erlenmeyerovy baňky bez rostliny. Hodnoty koncentrací těchto vzorků se během 5 dnů pohybovaly v rozmezí 14,87 mg · L^{-1} ± 0,09 mg · L^{-1}. V tomto experimentu bylo určeno, že metformin v prostředí MS – BC nepodléhal během 5 dnů žádným přeměnám. Statistické zpracování bylo provedeno dle Deanova a Dixonova testu [47].

Na základě výše uvedených výsledků je patrné, že všechny použité rostliny byly schopné alespoň částečné množství metforminu extrahovat. V našich laboratorních podmínkách byl metformin extrahován nejlépe staurogynem plazivým *(Staurogyne repens L.)*, následován plevuňkou Reineckovou mini *(Alternanthera reineckii Mini L.)*. V obou případech se jedná o vodní rostliny. Hlavní důvod, proč tyto vodní rostliny extrahují metformin v porovnání s jinými použitými druhy rostlin během 5 dnů až

15 krát více, je způsob příjmu živin [48]. U nadzemních (emerzních) rostlin převažuje příjem živin prostřednictvím kořenového systému a příjem je tedy závislý na mohutnosti a stavu kořenového systému. U vodních (submerzních) druhů rostlin je příjem živin odlišný. Kořenový systém u vodních druhů rostlin slouží především k uchycení do substrátu na dně vodních nádrží, případně může být tvorba kořenů zcela potlačena a příjem živin probíhá celým povrchem těla.

Pro hodnocení fytoextrakce byly použity zjednodušené laboratorní podmínky, reálné podmínky v životním prostředí mohou výsledky výrazně ovlivnit, neboť reálná environmentální matrice je mnohem složitější než simulace životního prostředí prostřednictvím živných medií.

5.2 Studium fytoextrakce guanylmočoviny

Schopnost fytoextrakce guanylmočovinybyla postupně testována na kukuřici seté *(Zea mays L.)* a hrachu setém *Pisum sativum L.).*

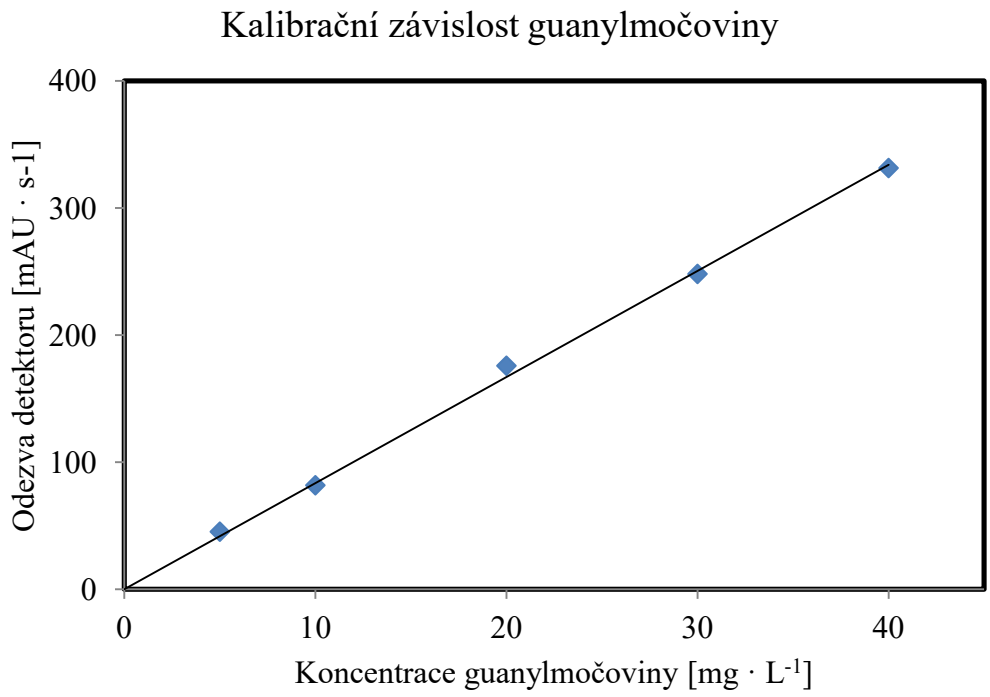
Koncentrace guanylmočoviny byla stanovena pomocí HPLC s UV detekcí při 210 nm. Mobilní fází byla směs 5 mM mravenčanu amonného ve vodě : methanol 90 : 10 (v/v), průtok mobilní fáze 0,7 ml · min^{-1}. Byla použita kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm).

5.2.1 Kalibrační závislost guanylmočoviny, mez detekce a kvantifikace

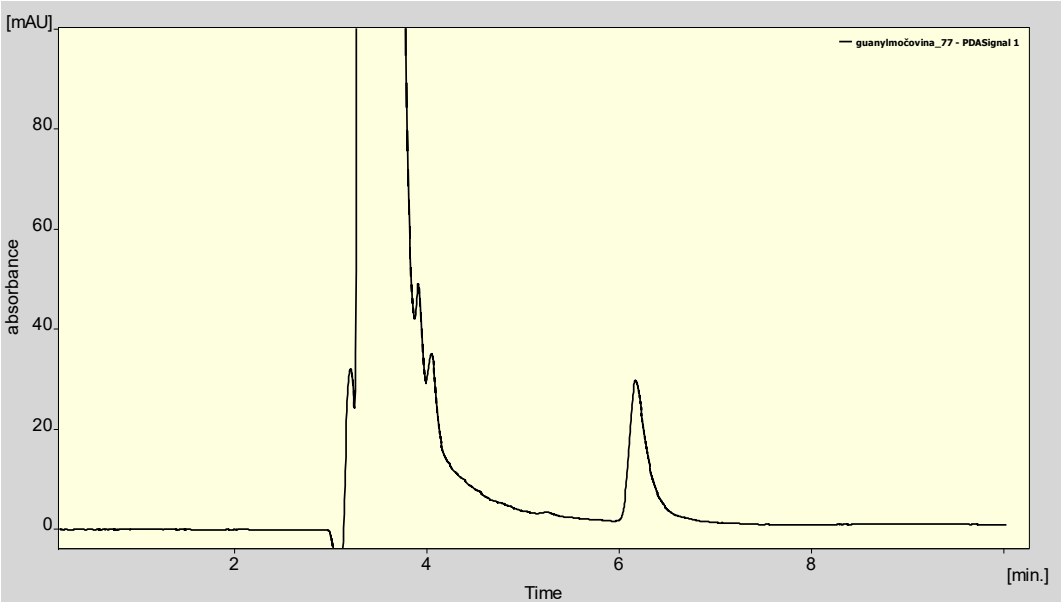
Ke kvantifikaci guanylmočoviny byla nejprve proměřena kalibrační závislost jako závislost odezvy UV detektoru na koncentraci metforminu. K sestrojení závislosti byly použity kalibrační roztoky guanylmočoviny o koncentracích 5; 10; 20; 30 a 40 mg · L^{-1}.

Kalibrační závislost je zobrazena na obrázku č. 5.9, chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci 20 mg · L^{-1} je zobrazen na obrázku č. 5.10.

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) guanylmočoviny byly určeny jako trojnásobek, resp. desetinásobek výšky šumu u kalibračního roztoku o koncentraci 5 mg · L^{-1}. Mez detekce LOD guanylmočoviny byla 297 μg · L^{-1}, mez kvantifikace LOQ guanylmočoviny byla rovna 990 μg · L^{-1}.



Obr. č. 5.9 – Kalibrační závislost guanylmočoviny (HPLC/ UV 210 nm, mobilní fáze 5 mM mravenčan amonný ve vodě : methanol (90 : 10 (v/v)), 0,7 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 µm), 4,6 x 250 mm).

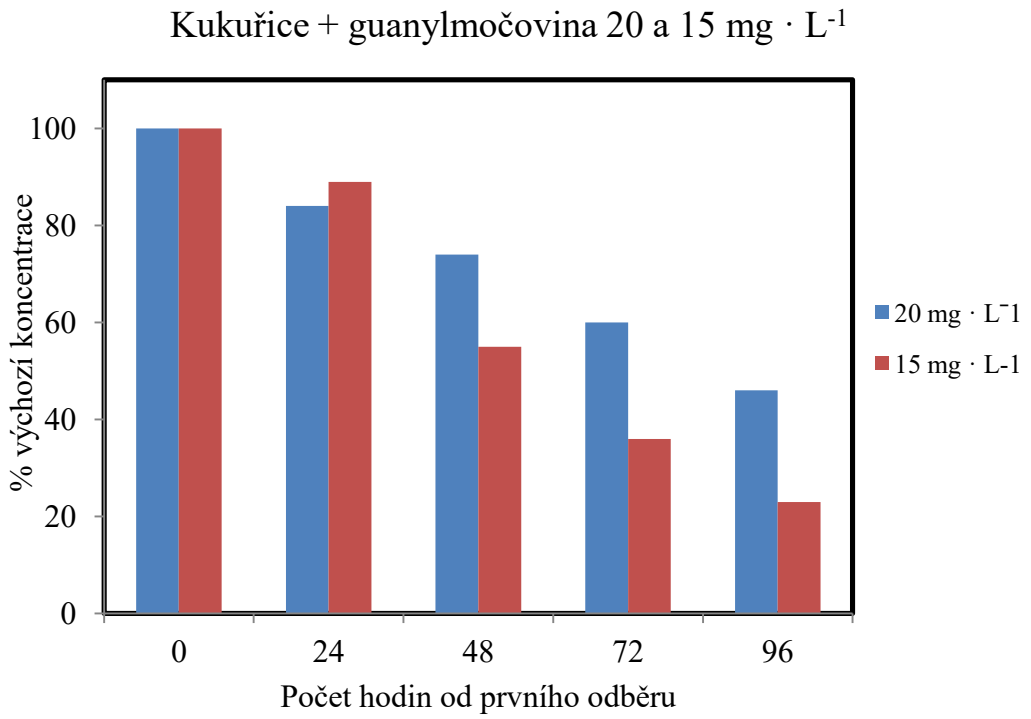


Obrázek č. 5.10 – Chromatogram guanylmočoviny (HPLC/ UV 210 nm, mobilní fáze 5 mM mravenčan amonný ve vodě : methanol (90 : 10 (v/v)), 0,7 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 µm), 4,6 x 250 mm).

5.2.2 Kukuřice *(Zea mays L.)* + guanylmočovina

Schopnost fytoextrakce guanylmočoviny kukuřicí setou *(Zea mays L.)* byla testována při dvou koncentracích. V prvním experimentu bylo k 8 kulturám kukuřice seté přidáno 100 mL MS – BC media a roztok guanylmočoviny tak, aby její koncentrace v přidaném mediu byla 20 mg · L^{-1} (12,75 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny). V druhém experimentu bylo k 6 kulturám kukuřice seté přidáno opět 100 mL MS – BC media a roztok guanylmočoviny tak, aby její koncentrace v přidaném mediu byla 15 mg · L^{-1} guanylmočoviny (9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny). Odběr vzorků probíhal po dobu 5 dnů ve 24 – hodinových intervalech.

Poklesy koncentrace guanylmočoviny během kultivace jsou zobrazeny na obrázku č. 5.11.



Obr. č. 5.11 – Fytoextrakce guanylmočoviny kukuřicí setou *(Zea mays L.)* při 2 výchozích koncentracích 20 mg · L^{-1} a 15 mg · L^{-1}. (HPLC/ UV 210 nm, mobilní fáze 5 mM mravenčan amonný ve vodě : methanol (90 : 10 (v/v)), 0,7 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 µm), 4,6 x 250 mm).

Při obou vstupních koncentracích byly poklesy koncentrace guanylmočoviny v mediu konstantní, průměrně o 15 – 20 % oproti předchozímu dni. Z grafu se na první pohled může zdát, že guanylmočovina o koncentraci 15 mg · L^{-1} (9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny) byla kukuřicí zachycována lépe, protože její konečná průměrná koncentrace je 2 krát nižší než na hladině koncentrace 20 mg · L^{-1} guanylmočoviny (12,75 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny). Při výpočtu schopnosti fytoextrakce na 1 gram rostliny bylo však více guanylmočoviny extrahováno právě na nižší hladině koncentrace 15 mg · L^{-1} guanylmočoviny (9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny). Jeden gram kukuřice seté byl schopen extrahovat 0,12 mg báze guanylmočoviny na hladině vstupní koncentrace 20 mg · L^{-1} během 5 dnů, na hladině koncentrace 15 mg · L^{-1} 0,11 mg guanylmočoviny během 5 dnů.

5.2.3 Hrách setý *(Pisum sativum L.)* + guanylmočovina

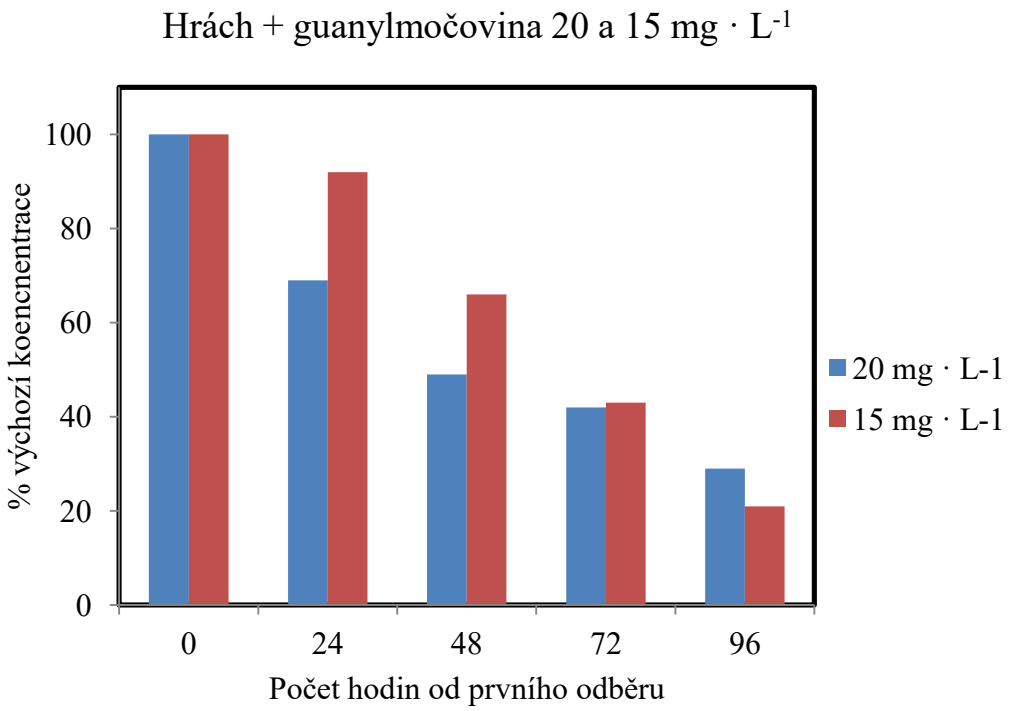
V dalším experimentu byla testována schopnost fytoextrakce guanylmočoviny hrachem setým na dvou hladinách koncentrace totožných s experimentem předchozím.

Odběr vzorků probíhal po dobu 5 dnů ve 24 – hodinových intervalech.

Při vstupní koncentraci 20 mg · L^{-1} guanylmočoviny (12,75 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny) byl zaznamenán největší pokles mezi 1. a 2. dnem odběru (o 31 % oproti výchozí koncentraci) a nejnižší pokles mezi 3. a 4. dnem jen o 7 %. Pátý den odběru činila průměrná koncentrace u 5 kultivací hrachu setého 31 % výchozí koncentrace. Jeden gram hrachu setého byl schopen extrahovat 0,12 mg guanylmočoviny při této koncentraci.

Při koncentraci koncentrace 15 mg · L^{-1} guanylmočoviny (9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny) byl zaznamenán nejnižší pokles mezi 1. a 2. dnem odběru (o 9 % výchozí koncentrace), poté již koncentrace v médiích 5 rostlin hrachu setého klesala v průměru o 22 – 26 % až na 21 % výchozí koncentrace báze guanylmočoviny. Jeden gram hrachu setého byl schopen extrahovat 0,13 mg guanylmočoviny během 5 dnů.

Průměrné poklesy na obou hladinách koncentrace jsou zobrazeny na obrázku č. 5.12.



Obrázek č. 5.12 – Fytoextrakce guanylmočoviny hrachem setým *(Pisum sativum L.)* při dvou vstupních koncentracích 12,75 a 9,56 mg · L^{-1} (báze).

Shrnutí schopnosti fytoextrakce guanylmočovinyna různých úrovních koncentrace pomocí kukuřice seté a hrachu setého je zobrazeno v následující tabulce č. 5.2.

Tabulka č. 5.2 – Shrnutí fytoextrakce guanylmočoviny

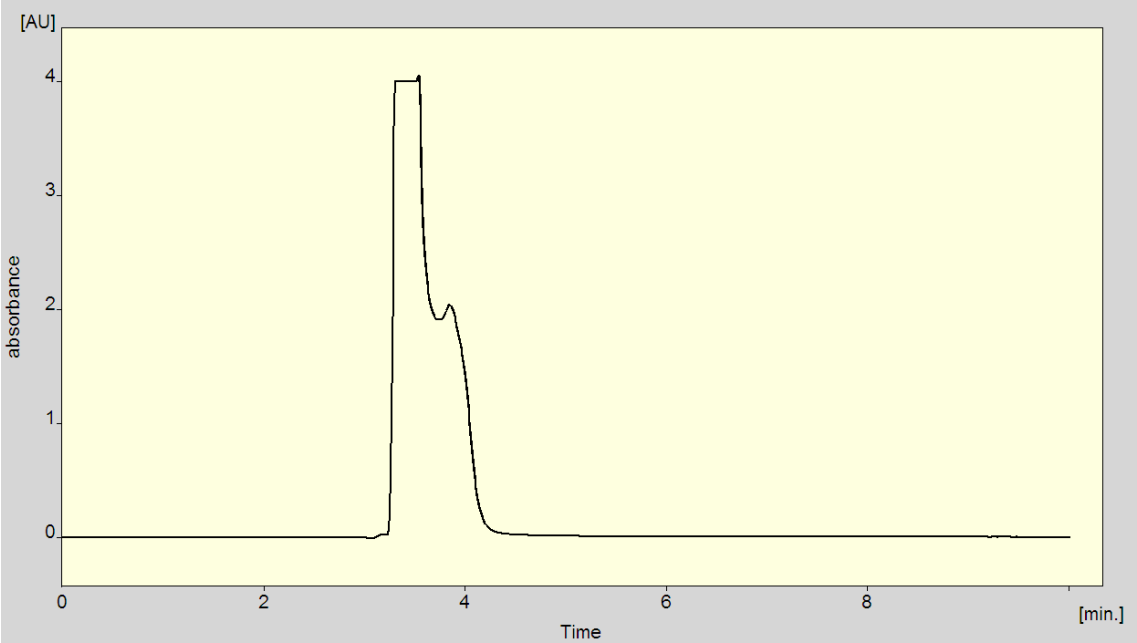
Rostlina	Vstupní koncentrace guanylmočoviny [mg · L^{-1}]	Fytoextrakce za 5 dnů [mg léčiva · g^{-1} rostliny]
Zea mays L.	20	0,12
Zea mays L.	15	0,11
Pisum sativum L.	20	0,12
Pisum sativum L.	15	0,13

Nejlepší schopnost fytoextrakce guanylmočoviny byla zaznamenána při vstupní koncentraci 15 mg · L^{-1} u hrachu setého. Domnívám se, že vyšší koncentrace guanylmočoviny mohla být pro hrách toxická a pozastavovala schopnost fytoextrakce. Tomu napovídá i fakt, že na rostlinách byly již 3. den od prvního přídavku guanylmočoviny o koncentraci 20 mg · L^{-1} (12,75 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny) viditelné známky růstových poruch. Přesto byl ale experiment ukončen až 5. den, aby byla schopnost fytoextrakce porovnatelná s ostatními experimenty.

Aby bylo zřejmé, že sloučeniny vylučované rostlinou do media neinterferují s analýzou guanylmočoviny či zda samotná guanylmočovina nepodléhá změnám při kultivaci vlivem světla nebo složek media, byly provedeny dva slepé pokusy.

U prvního slepého pokusu bylo k vypěstované kultuře kukuřice seté přidáno pouze MS – BC medium bez guanylmočoviny. Vzorky media byly odebírány stejným způsobem jako všechny ostatní vzorky media obsahující xenobiotikum. Při měření těchto slepých pokusů eluovaly každý den pouze složky MS – BC media ve 3. – 5. minutě, v oblasti eluce guanylmočoviny (7. minuta) nebyly pozorovány žádné píky. Tím bylo ověřeno, že složky MS – BC media nenarušují analýzu stanovované látky.

Chromatogram slepého pokusu je zobrazen na obrázku č. 5.13.



Obr. č. 5.13 – Slepý pokus měření – MS – BC medium bez guanylmočoviny (HPLC/ UV 210 nm, mobilní fáze 5 mM mravenčan amonný ve vodě : methanol (90 : 10 (v/v)), 0,7 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm).

V druhém slepém pokusu probíhaly odběry vzorků media s guanylmočovinou o koncentraci 15 mg · L^{-1}, tedy 9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny z Erlenmeyerovy baňky bez rostliny. Hodnoty koncentrací těchto vzorků se během 5 dnů pohybovaly v rozmezí 9,51 mg · L^{-1} ± 0,03 mg · L^{-1}. V tomto experimentu bylo ověřeno, že guanylmočovina v prostředí MS – BC nepodléhá metabolickým procesům a veškeré poklesy koncentrace mají za následek fytoextrakční procesy. Statistické zpracování bylo provedeno dle Deanova a Dixonova testu [47].

5.3 Studium fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny v kombinaci

V posledním experimentu byla studována schopnost fytoextrakce metforminu a guanylmočoviny na kukuřici seté najednou.

Koncentrace metforminu byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí při 233 nm. Mobilní fáze byla 5 mM SDS : methanol : acetonitril v poměrech 50 : 25 : 25 (v/v/v), průtok mobilní fáze byl 1,2 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm)

Koncentrace guanylmočoviny byly stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí při 210 nm, mobilní fáze 5 mM mravenčan amonný ve vodě : methanol (90 : 10 (v/v)), průtok mobilní fáze 0,7 mL · min^{-1}, kolona Agilent Eclipse XDB – C18 (5 μm), 4,6 x 250 mm).

Nejprve bylo provedeno měření vzorku s přesně známou koncentrací metforminu a guanylmočoviny k vyloučení koeluce či jiného ovlivnění výsledku. Množství metforminu i guanylmočoviny ve vzorku byla zvolena ve stejné koncentraci jako v experimentu, tedy 15 mg · L^{-1} metforminu a 15 mg · L^{-1}guanylmočoviny (9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny). Koncentrace 15 mg · L^{-1} byla vybrána z důvodu, že při této koncentraci byla testována fytoextrakce kukuřice seté metforminu i guanylmočoviny.

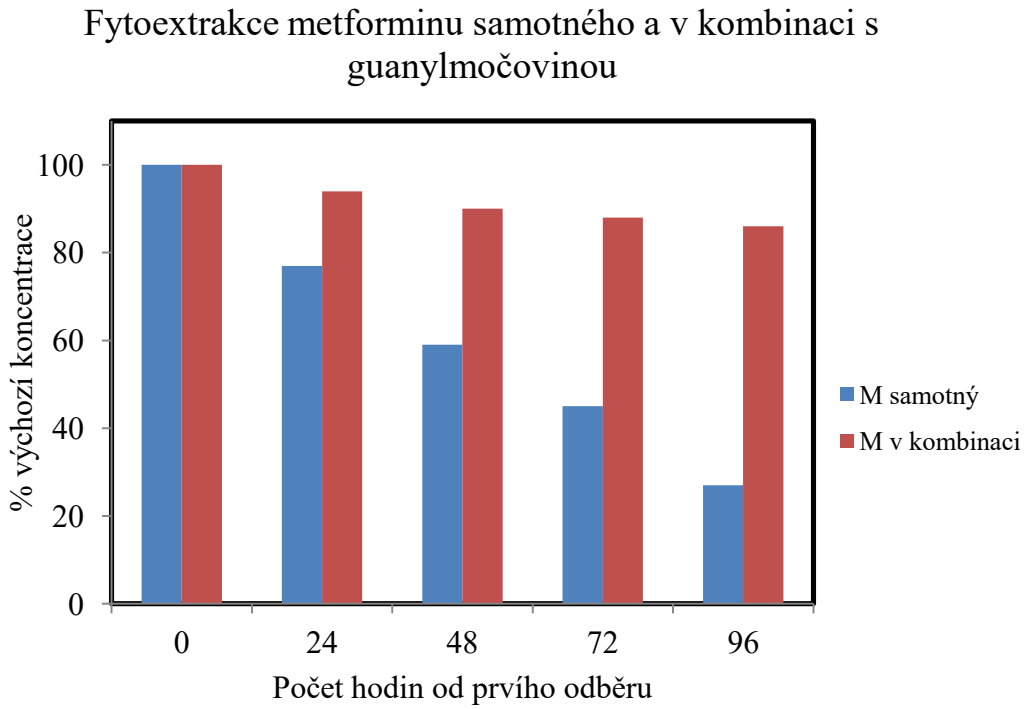
Vzorek byl proměřen za podmínek měření metforminu i za podmínek měření guanylmočoviny. Naměřená koncentrace metforminu se oproti teoretické koncentraci 15 mg · L^{-1} lišila o 0,14 mg · L^{-1} a koncentrace báze guanylmočoviny byla oproti teoretické koncentraci 9,56 mg · L^{-1} nižší o 0,20 mg · L^{-1}. Chyba může být ovlivněna nepřesností vážení a odchylkou měření HPLC přístroje či vyhodnocení dat a nepřesahuje 2 % výchozí hodnoty. Z tohoto měření byl vyvozen závěr, že tyto dvě látky se při analýze neovlivňují a lze je teda za rozdílných podmínek měření stanovit v jednom vzorku najednou.

Pro tento experiment bylo použito 5 kultivací kukuřice seté. Ke každé rostlině bylo přidáno 100 mL MS – BC media, zásobní roztok metforminu a guanylmočoviny tak, aby jejich koncentrace v přidaném mediu byla 15 mg · L^{-1} metforminu a

15 mg · L^{-1} guanylmočoviny (9,56 mg · L^{-1} báze guanylmočoviny). Odběr vzorků probíhal 5 dnů vždy ve 24 – hodinových intervalech.

Porovnání fytoextrakce samotných xenobiotik a jejich kombinace jsou zobrazeny na obrázcích č. 5.14 a 5.15.

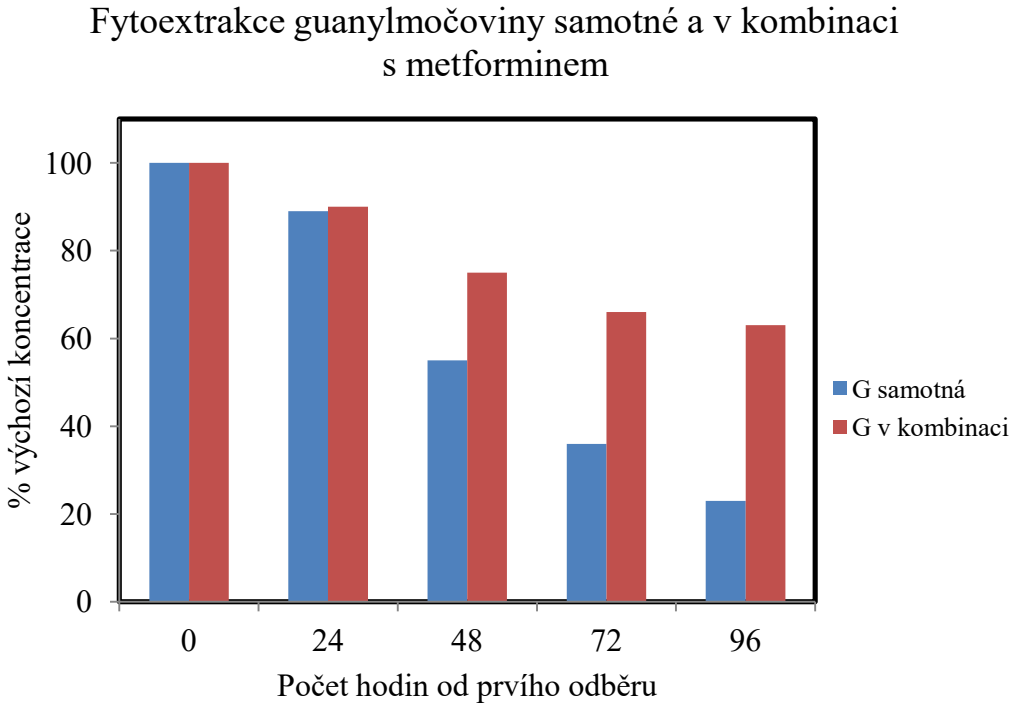
Jak je z obrázku č. 5.14 patrné, samotný metformin je kukuřicí extrahován mnohem lépe, než metformin v kombinaci s guanylmočovinou. Koncentrace samotného metforminu 5. den odběru má hodnotu 3,63 mg · L^{-1}, což představuje 24 % výchozí naměřené koncentrace. Koncentrace metforminu v kombinaci s guanylmočovinou klesla 5. den pouze na hodnotu 10,36 mg · L^{-1}, to je 63 % výchozí naměřené koncentrace. Schopnost fytoextrakce samotného metforminu byla vypočítána na 0,15 mg · g^{-1} rostliny během 5 dnů (viz kapitola 5.1.2). Schopnost fytoextrakce metforminu v kombinaci s guanylmočovinou je téměř dvojnásobně nižší, byla vypočítána na 0,08 mg během 5 dnů.



Obr. č. 5.14 – Srovnání fytoextrakce metforminu samotného a metforminu v kombinaci s guanylmočovinou.

Výsledky poklesu koncentrací guanylmočoviny ve vzorcích MS – BC media obsahujících metformin i guanylmočovinu jsou zobrazeny na obrázku č. 5.15.

Guanylmočovina v kombinaci s metforminem je kukuřicemi extrahována v mnohem nižší míře, než guanylmočovina samotná. U samotné guanylmočoviny klesla koncentrace na 46 % a schopnost fytoextrakce byla vypočítána na 0,11 mg během 5 dnů (kapitola 5.2.2). V kombinaci s metforminem klesla koncentrace guanylmočoviny na 63 % výchozí naměřené koncentrace a schopnost fytoextrakce 1 gramu kukuřice seté byla 1,5 krát nižší než u samotné guanylmočoviny, tedy 0,07 mg během 5 dnů.



Obrázek č. 5.15 – Srovnání fytoextrakce guanylmočoviny samotné a v kombinaci s metforminem

Tento experiment mnohem více napodobuje procesy v životním prostředí, neboť životní prostředí je zatíženo více xenobiotiky najednou a rostlina extrahuje kořenovým systémem (v případě suchozemských rostlin) nebo celým povrchem těla (v případě vodních rostlin) více xenobiotik najednou. Proto se mohou reálné hodnoty fytoextrakce mnohonásobně lišit od našeho experimentu. Reálná environmentální vodní matrice je

značně komplikovaná, zahrnuje velké množství organických sloučenin s odlišnými chemickými a fyzikálně - chemickými vlastnostmi a záchyt substancí kořenovým systémem je ovlivňován komplexně. Vzhledem k tomu, že mechanismy záchytu nejsou kompletně známy, je těžké predikovat synergistické či antagonistické efekty a v současné době se fytoextrakce testuje především v monokomponentním uspořádání. Podstatným faktem je, že fytoextrakce v tomto modelovém *in vitro* uspořádání je reálná.

5 Závěr

Studium interakce farmak a jejich humánních či environmentálnívh metabolitů s vyššími rostlinami představuje v současné době významnou složku studia kontaminace ekosystému. Výsledky studií poskytují důležité a nezastupitelné informace o chování a distribuci těchto sloučenin v životním prostředí a jsou rovněž podnětem pro navazující ekotoxikologické experimenty. Ve fázi získaných výsledků poskytují data využitelná pro fytoremediační technologie, ale zároveň poukazují na možnost kontaminace potravních řetězců. Studované léčivo metformin je lékem první volby při dekompenzaci diabetu mellitu 2. typu a vylučuje se kompletně v původní formě močí. Vzhledem k vysokým, až několikagramovým denním dávkám, je průnik do životního prostředí významný a nic na tom nemění ani fakt, že je v menší či větší míře transformován v biologickém stupni čistění odpadních vod na guanylmočovinu. I když zatím nejsou známá data chronické toxicity, lze vzhledem k mechanismu účinku předpokládat vliv na organismy využívající glukosu, případně i jiné netypické efekty nesouvisející s primární farmakologickou kategorizací, tak jak je známe u jiných léčiv.

Studium fytoextrakce na několika typech rostlin ukázalo zřejmou možnost záchytu metforminu i guanylmočoviny kořenovým systémem těchto rostlin. To ukazuje na možnost využití těchto rostlin ve fytoremediačních technologiích. Lepší záchyt byl prokázán při interakci metforminu s vodními rostlinami, což rovněž poukazuje na možnost praktického využití při dočišťování odpadních vod. Získané hodnoty záchytu jsou pouze modelové, kdy přírodní vodní matrice je simulována kultivačním mediem. Reálná environmentální matrice je mnohem složitější, a jak se ukázalo v kombinovaném pokusu se směsí metforminu a guanylmočoviny, významně ovlivňuje účinnost fytoextrakce. I přesto, že by byly reálné technologické hodnoty s největší pravděpodobností výrazně nižší, významným faktem je, že k záchytu studovaných látek kořenovým systémem jednoznačně dochází a využití rostlinných technologií k dekontaminaci povrchových vod či půd je reálné.

Samotný fakt reálného záchytu látek v rhizosféře rovněž představuje možnost jejich translokace do nadzemních částí rostlin a následnou pravděpodobnou kontaminaci potravních řetězců studovanými látkami či jejich sekundárními produkty vznikajícími vlivem působení rostlinných enzymů. Samotná translokace a rostlinné biotransformace

nebyly dosud studovány a představují další etapu ve výzkumu teoretických aspektů fytoremediačních technologií.

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. 21. 2. 2017].

[2] Váňa, M.; Wanner, F.; Fuksa, J.; Matoušová, L.; Pospíchalová, D.: *Mikropolutanty a situace na čistírnách odpadních vod v ČR.* Dostupné z URL: <http://www.vodarenstvi.com/media/konference/vodaforum-prednasky/30-02-vana-situace-na-cov.pdf>. [cit. 21. 2. 2017].

[3] Vodarenstvi.cz: *Mohou nás ohrozit léčiva v pitné vodě?* Dostupné z URL: <http://www.ovodarenstvi.cz/clanky/mohou-nas-ohrozit-leciva-v-pitne-vode>. [cit. 22. 2. 2017].

[4] Kosma, C.I.; Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A.: Occurence of metformin and guanylurea in wastewates in Greece. *Proceedings of the 14th International Conference on Environmental Science and Technology (* 2015).

[5] Trautwein, Ch.; Kümmerer, K.: Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead - end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* **85**, 765 - 773 (2011).

[6] World Health Organization: *Global report on diabetes (2016)*. Dostupné z URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf?ua=1>. [cit. 22. 2. 2017].

[7] Svačina, Š.: *Postavení metforminu jako antidiabetika první volby*. FAMA Facta Medica, III. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha, 2010.

[8] Ter Lakk, T.; Baken, K.: The occurence, fate and ecological and human health risk of metformin and guanylurea in the water cycle. KWR Watercycle Research Institute, Nizozemsko (2014).

[9] Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Souhrn údajů o přípravku ADIMET (2005)*. Dostupné z URL: <www.sukl.cz/download/spc/SPC15486.doc>. [cit. 22. 2. 2017].

[10] United Nations Environment Programme. *Phytoremediation: An Environmentally Sound Technology for Pollution Prevention, Control and Remediation.* Dostupné z URL: <htttp://www.unep.or.jp/Ietc/Publications/Freshwater/FMS2/1.asp>. [cit. 22. 2. 2017].

[11] Kovářová, K.: *Fytoextrakce metforminu.* Bakalářská práce, Praha (2015).

[12] Daughton, Ch.D.; Ternes T. A.,: Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents or Subtle Change?. *Environmental Health Perspectives* **108**:3, 907-938 (2000).

[13] Hirsch, K.: *Pharmaceuticals and Personal Care Products*. Dostupné z URL: <http://serc.carleton.edu/NAGTWorkshops/health/case_studies/pharmaceutical.html> [cit. 17.4.2017]

[14] Fent, K.; Wetson, A.A.; Caminada, D.: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**, 122-159 (2006).

[15] Heberer, T.: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment. *Toxicology Letters* **31**:1-2, 5-17 (2002).

[16] ZETA Holding GmbH: *Aktivní farmaceutické substance.* Dostupné z URL: <http://www.zeta.com/cs/aktivni-farmaceuticke-substance_188.htm>. [cit 27. 2. 2017].

[17] Jayasiri, H.B.; Purushothaman, C.S., „Pharmaceutically Active Compounds (PhACs): A Threat for Aquatic Environment?. *Marine Science Research & Development* **4**:1, 1-2 (2013).

[18] Back, E.: *How Does a Waste Water Treatment Plant Work?* Dostupné z URL:<http://sciencing.com/waste-water-treatment-plant-work-4896800.html>. [cit. 27. 2. 2017].

[19] E. A. B. s.r.o.: *ČOV 01 - Nátok a hrubé předčištění.* Doodpadu (2015).

[20] E. A. B. s.r.o.: *ČOV 02 - Provzdušnění.* Doodpadu (2015).

[21] E. A. B. s.r.o.: *ČOV 03 - Dosazovací nádrže.* Doodpadu (2015).

[22] E. A. B. s.r.o., *ČOV 04 - Odtok.* Doodpadu (2015).

[23] ÚKZÚZ - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: *Monitoring kvality kalů z ČOV a půd a rostlin po aplikaci kalů.* Dostupné z URL: < http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/hnojiva-a-puda/bezpecnost-pudy/monitoring-vstupu-do-pudy/kontrola-kalu/>. [cit. 19.4.2017]

[24] Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, S.D.; Buxton, H.T.: Pharmaceuticals, Hornomes, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999 - 2000. *Environmental Science & technology* **36**, 1202 - 1211 (2002).

[25] Blair, B.D.; Crago, J.P.; Hedman, C.J.; Klaper, R.D.: Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentration of environmental concern. *Chemosphere* **93**:9, 2116 - 2123 (2013).

[26] Houtman, C.J.; Broek, R.T.; John, K.; Pieterse, B.; Kroesbergen, J.: A multicomponent snapshot of pharmaceuticals and pesticides in the river Meuse basin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**:11, 2449 - 2459 (2013).

[27] Ter Laak, T.L.; van den Aa, M.; Houtman, C.J.; Stoks, P.G., van Wezel, A.P.: Relating environmental concentrations of pharmaceuticals to consumption: A mass balance approach for the river Rhine. *Environment International* **36**:5, 403 - 409 (2010).

[28] Zdravý život s cukrovkou. Dostupné z URL: <http://www.zdravyzivotscukrovkou.cz/cukrovka/zakladni-informace-o-lecbe/formy-diabetu>. [cit. 20. 3. 2017].

[29] Vlček, J.; Fialová, D. a kolektiv: Klinická farmacie I. Praha, GRADA (2010).

[30] Velký lékařský slovník. Dostupné z URL: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/alfa-glukosidaza>. [cit. 21. 3. 2017].

[31] Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Příbalová informace - informace pro uživatele*. Dostupné z URL: <www.sukl.cz/download/pil/PI92485.doc>. [cit. 21. 3. 2017].

[32] Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Souhrn údajů o přípravku METFOGAMMA 850*. Dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC97135.pdf&type=spc&as=metfogamma-850-spc>. [cit. 10. 4. 2017].

[33] Information Project Care Netherlands Institute, GIP databank. Dostupné z URL: <https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/m/metformine. [cit. 10. 4. 2017].

[34] FDA - U.S. Food and Drug Administration: *Metformin hydrochloride tablets.* Dostupné z URL: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/May02/053102/800471e6.pdf.> [cit. 10. 4. 2017].

[35] Státní ústav pro kontrolu léčiv: *ATC skupiny.* Dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=A10BA#A10B.> [cit. 10. 4. 2017].

[36] Kořístková, B.; Grundmann, M.: Metodika studia spotřeb léků. *Klinická farmakologie a farmacie* **20**:4, 219 - 222 (2006).

[37] U.S. National Library of Medicine: *TOXNET - Toxicology data network.* Dostupné z URL: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/657-24-9.> [cit. 21. 2. 2017].

[38] Trautwein, Ch.; Berset, J.D.; Wolschke, H.; Kümmerer, K.: Occurence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environmental International* **70**, 203 - 212 (2014).

[39] Scheurer, M.; Michel, A.; Brauch, J.B.; Ruck, W.; Sacher, F.: Occurence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *SciVerse ScienceDirect* **46**, 4790 - 4802 (2012).

[40] Kučerová, P.; Macková, M.; Macek, T.: Perspektivy fytoremediace při odstraňování organických polutantů a xeniobiotik z životního prostředí. *Chemické listy* **93**, 19 - 26 (1999).

[41] Kotyza, J.; Soudek, P.; Kafka, Z.; Vaněk, T.: Léčiva - „Nový environmentální polutant". *Chemické listy* **103**, 540 - 547 (2009).

[42] UNEP - United Nations Environment Programme: *Phytoremediation: An Environmentally Sound Technology for Pollution Prevention, Control and Remediation.*Dostupnéz URL: <http://www.unep.or.jp/Ietc/Publications/Freshwater/FMS2/1.asp> [cit. 22.4.2017]

[43] Paulo, J.C.F.; Pratas, J.; Varun, M.; D´Souza, R.; Paul, M.S.: Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* **17**, 485 – 517 (2014).

[44] 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).

[45] 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).

[46] 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).

[47] Nesměrák, K.: *Návody k praktiku z analytické chemie (verze 2017)*. Dostupné z URL: <https://web.natur.cuni.cz/analchem/zprakt/navody.pdf.> [cit. 5. 4. 2017].

[48] Pelikán, V.: A*kvárium.* Dostupné z URL:<http://planta.aquariana.cz/vyziva.htm.> [cit. 7. 5. 2017].

[49] BHS - Bio Health Science. Dostupné z URL: <http://www.biohealthscience.com/2013/07/diabetes-drug-metformin-could-help-you-live-longer/.> [cit. 21. 3. 2017].