Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2022/2023

Veronika Oušková

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Možnosti fotochemické degradace metforminu

Bakalářská práce

Veronika Oušková

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2022/2023

Oušková V., 2022: Možnosti fotochemické degradace metforminu. [Possibilities of photochemical degradation of metformin. Bachelor Thesis, in Czech] – 30 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The Bachelor´s thesis is focused on an antidiabetic drug metformin. In the theoretical part, the characteristic of metformin and its mechanism of action is introduced, concentration of metformin in the aquatic environment and toxic effects on aquatic organisms are mapped, and several studies investigating its photochemical degradation are presented. In the experimental part, the study of photochemical degradation of metformin were performed under light conditions relevant to natural conditions and the stability of the degradation products formed after the irradiation of the metformin solution with the anthraquinone-derivative sensitizer was tested.

Anotace:

Bakalářská práce je zaměřena na lék ze skupiny antidiabetik, metformin. V teoretické části je představena charakteristika metforminu a mechanismus jeho účinku, jsou zmapovány koncentrace metforminu ve vodním prostředí a toxické efekty na vodní organismy, a uvedeno několik studií zabývajících se jeho fotochemickou degradací. V experimentální části byly provedeny pokusy s fotochemickou degradací metforminu za světelných podmínek relevantních k přírodním podmínkách a byla testována stabilita degradačních produktů vzniklých při ozařování roztoku metforminu se sensitizátorem odvozeným od antrachinonu.

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

Místo, datum _____

Podpis _____

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce paní doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za vedení mé bakalářské práce, cenné připomínky, za čas, který si pro mě vyhradila, kdykoliv jsem potřebovala a za ochotu a trpělivost mi vše vysvětlit. Mé poděkovaní patří také paní Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za vstřícnost a pomoc při HPLC analýze. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Monice Křížové, která mi připravila metodu pro analýzu metforminu za použití HPLC. Na závěr bych ráda poděkovala mé rodině a Rodině Panny Marie z Nových Hradů za podporu, kterou mě doprovázeli během psaní bakalářské práce.

Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- zmapovat koncentrace metforminu nalezené v přírodních vodách,
- prostudovat literaturu o možnostech fotochemické degradace metforminu a jeho případných toxických účincích na vodní organismy,
- otestovat reaktivitu při fotochemické reakci v homogenním prostředí při používání záření relevantního pro přírodní podmínky.

Zkratky

AMPK	AMP-aktivovaná proteokináza
AQS	Sodná sůl kyseliny anthrachinon-2-sulfonové
CAS	Chemical Abstracts Service
ČOV	Čistička odpadních vod
DM	Diabetes mellitus
FDA	Food and Drug Administration
HA	Sodná sůl huminové kyseliny
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MM	Methylenová modř

Obsah

1 Úvod 1
1.1 Metformin 2
1.1.1 Charakteristika metforminu 2
1.1.2 Mechanismus působení metforminu 3
1.1.3 Výskyt metforminu v přírodních vodách 4
1.1.4 Možnosti fotochemické degradace metforminu 6
1.1.5 Toxické účinky metforminu na vodní organismy 7
1.2 Fotochemická reakce 9
2 Materiál a metody 13
3 Výsledky 14
4 Diskuse 19
5 Závěr 21
6 Seznam použité literatury 22

1 Úvod

Diabetes mellitus (DM), chronické metabolické onemocnění s přetrvávající hyperglykémií, může vzniknout poruchou sekrece inzulinu, rezistencí vůči periferním účinkům inzulínu nebo kombinací obojího. Rozlišují se 3 třídy DM: DM 1. typu, DM 2. typu a gestační diabetes (Goyal & Jialal, 2018). DM 1. typu vzniká poruchou β-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu (Lüllmann et al., 2012). DM 2. typu vzniká kombinací dvou primárních faktorů. Prvním faktorem je poškození sekrece inzulínu pankreatickými β-buňkami. Druhým faktorem je neschopnost tkání citlivých na inzulín na něj adekvátně reagovat (Galicia-Garcia et al., 2020). Glukózová intolerance rozpoznaná během těhotenství je definována jako gestační diabetes mellitus (Rani & Begum, 2016).

Ve 21. století dosáhl diabetes se související obezitou epidemických rozměrů. V roce 1995 bylo celosvětově cukrovkou postiženo 135 milionů lidí. Odhad nárůstu lidí s diabetem do roku 2030 je na 366 milionů (Trautwein et al., 2014). Asi 85-95 % diabetiků trpí na DM 2. typu (Allgot et al., 2003).

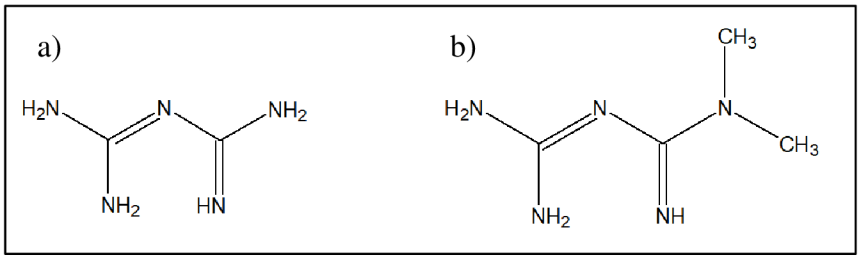
1.1 Metformin

Metformin je nejčastěji předepisované léčivo pro léčbu DM 2. typu. Kromě léčby diabetu našel uplatnění při léčbě rakoviny nebo syndromu polycystických ovarií (Elizalde-Velázquez et al., 2020). Metformin je jedním z derivátů guanidinu. Přítomnost guanidinu a jeho derivátů byla prokázána v jestřabině lékařské (*Galega officinalis*) (Bailey, 2017). Již ve středověké Evropě našla tato bylina uplatnění při léčbě moru, červů, hadího uštknutí a Sydenhamova syndromu neboli nemoci zvané tanec svatého Víta. Také s ní byla krmena zvířata pro zvýšení dojivosti (Bailey, 2004).

Metformin se podává perorálně v potahovaných tabletách o obsahu 500, 850 nebo 1000 mg (SÚKL, 2022). Absolutní perorální biologická dostupnost metforminu je 40-60 % a k úplné gastrointestinální absorpci dochází do 6 hodin po požití. Metformin je vylučován ledvinami v nezměněné formě (Scheen, 1996).

1.1.1 Charakteristika metforminu

Struktura metforminu je odvozena od sloučeniny zvané biguanid[1] (Obr. 1) (Perušičová, 2010). Registrační číslo CAS pro metformin je 657-24-9 a souhrnný vzorec je $C_4H_{11}N_5$. Celý název metforminu dle IUPAC je 3-(diaminomethyliden)-1,1-dimethylguanidin (PubChem, 2022).



Obr. 1: Strukturní vzorec: a) biguanid; b) metformin.

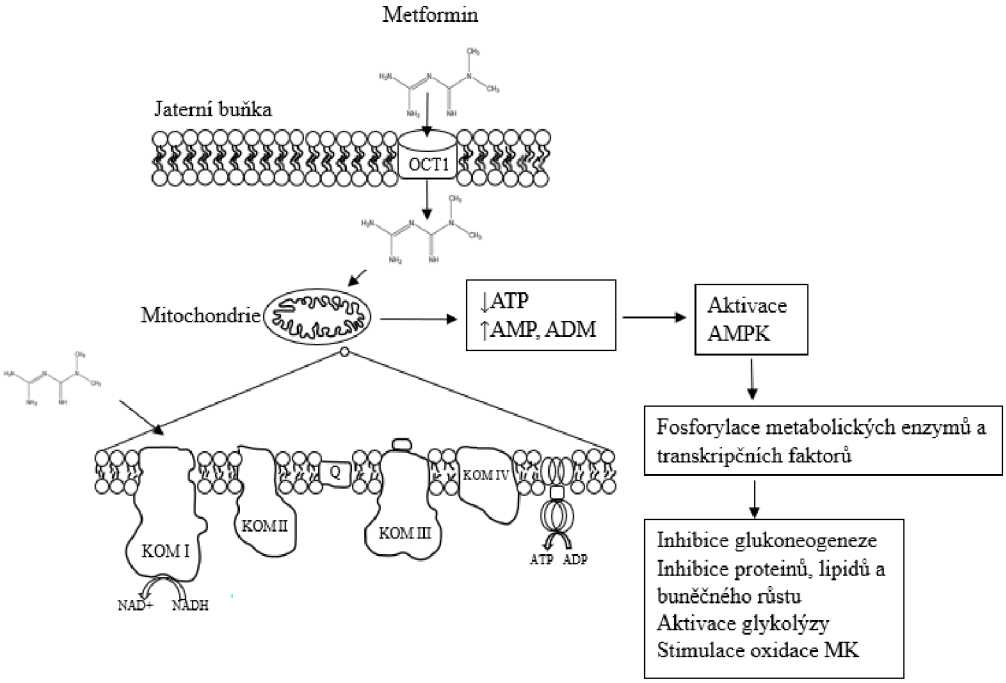
Rozdělovací koeficient oktanol voda (K_{OW}) pro metformin má hodnotu $2{,}29\times10^{-3}$ (měřeno při 25 °C) (PubChem, 2022). Na základě této nízké hodnoty lze konstatovat, že metformin bude hydrofilní, a tedy jeho distribuce ve vodné fázi bude vysoká. Hodnota Henryho konstanty (K_H) je 7.64×10^{-16} atm/m^3/M (měřeno při 25 °C), proto nebude docházet k akumulaci

[1] Biguanidy jsou skupinou perorálních antidiabetik předepisovaných na léčbu DM 2. typu (Velký lékařský slovník).

metforminu ve vzduchu. Databáze PubChem uvádí hodnotu disociační konstanty $3{,}98\times10^{-13}$. Jedná se o velmi slabou kyselinu srovnatelnou s disociační konstantou kyseliny fosforečné do třetího stupně (PubChem, 2022).

1.1.2 Mechanismus působení metforminu

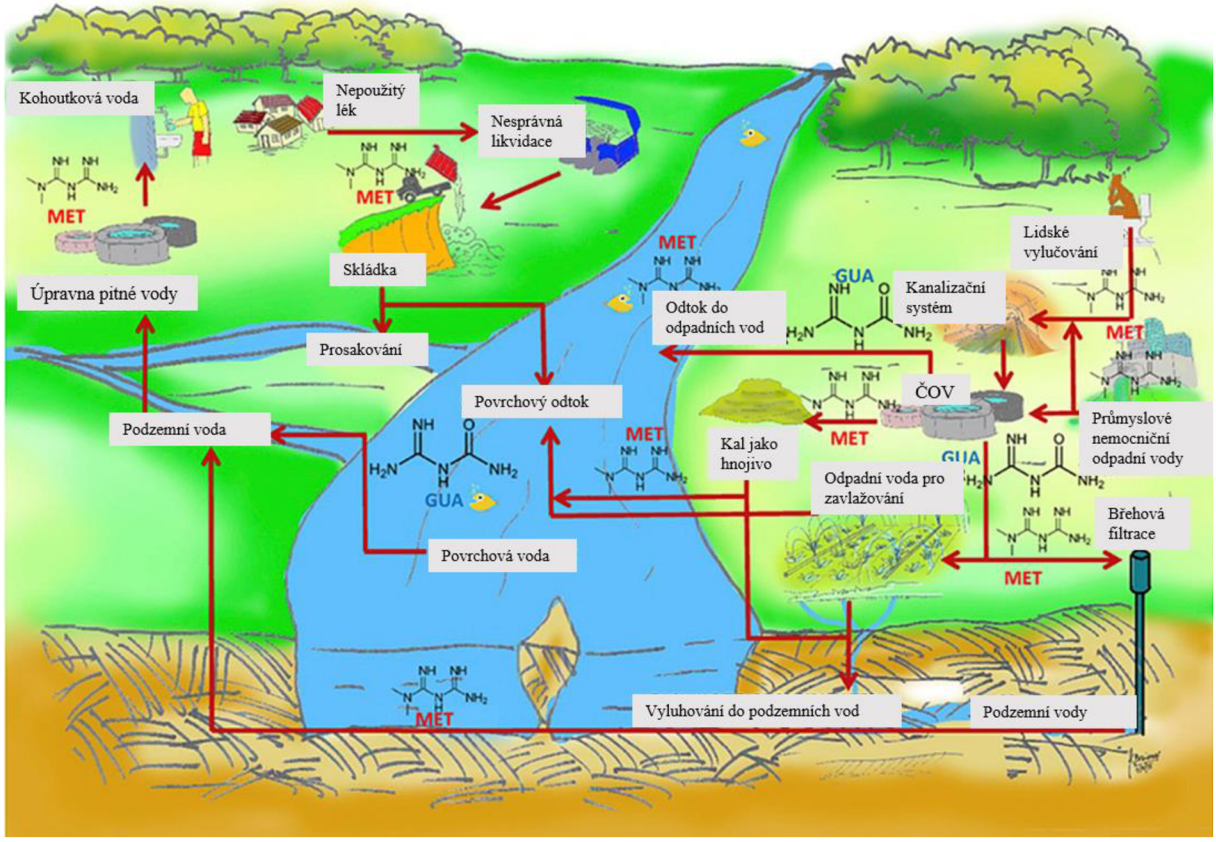
I přesto, že byl metformin poprvé představen v roce 1957, dodnes není přesně objasněn mechanismus jeho účinku. Metformin vstupuje do jaterních buněk pomocí transportérů organických kationtů 1. Po vstupu do jaterní buňky se začne hromadit v mitochondriální matrici. Klíčovým cílem metforminu je komplex I dýchacího řetězce (Pryor & Cabreiro, 2015). Inhibicí tohoto komplexu dochází k přerušení mitochondriálního dýchání a také protony řízenou ATP syntézu. Následkem toho vzniká energetický stres a zvyšuje se podíl AMP/ATP (Luengo et al., 2014). Tím se aktivuje AMP-aktivovaná proteokináza (AMPK) (Pryor & Cabreiro, 2015). Po aktivaci AMPK přepne buňky z anabolického stavu do stavu katabolického. Tato regulace zahrnuje fosforylaci metabolických enzymů a transkripčních faktorů a důsledkem toho dochází k inhibici syntézy glukózy, lipidů, proteinů a buněčného růstu. Také dochází ke stimulaci oxidace mastných kyselin a příjmu glukózy (Viollet et al., 2012). Působení metforminu v těle je znázorněno na Obr. 2.



Obr. 2: Působení metforminu v těle (OCT1 – transportér organických kationtů; KOM I, II, III, IV – transmembránové komplexy; Q – koenzym Q; NAD^+/NADH – přenašeče elektronů; ATP – adenosintrifosfát; ADP – adenosindifosfát; AMP – adenosinmonofosfát; AMPK – AMP-aktivovaná proteokináza; MK – mastné kyseliny) upraveno dle Viollet B., 2012.

1.1.3 Výskyt metforminu v přírodních vodách

Z důvodu narůstajícího lékařského předepisování metforminu je toto léčivo jedním z nejčastěji se vyskytujících ve vodním prostředí (Ambrosio-Albuquerque et al., 2021). V roce 2006 byl metformin poprvé identifikován jako vysoce potenciální perzistentní environmentální kontaminant (Trautwein et al., 2014). Metformin lze v přírodních vodách detekovat v koncentracích od nanogramů až po mikrogramy na litr. (Ambrosio-Albuquerque et al., 2021). Literatura týkající se výskytu metforminu v životním prostředí se objevila teprve v posledních letech. Vysoké koncentrace se očekávají v Portoriku, Španělsku a Indii, kde se nacházejí významní výrobci. Hlavní cestou vstupu metforminu do životního prostředí je vypouštění odpadních vod z ČOV, nemocnic a z průmyslových zdrojů. (Briones et al., 2016). Osud metforminu ve vodním prostředí je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Osud metforminu ve vodním prostředí (MET – metformin; GUA – guanylurea), upraveno dle Briones et al., 2016.

Maximální naměřené koncentrace metforminu v přítoku do ČOV byly naměřeny v USA (702 µg/l) a Portugalsku (325 µg/l). Další vysoká koncentrace byla naměřena v Německu v odtoku z ČOV (142,3 µg/l) (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

V Číně byla provedena studie povrchových vod, kde ve 20 vzorkovacích místech bylo detekováno celkem 227 sloučenin. U více než 90 % vzorků byl detekován metformin s nejvyššími koncentracemi 20 µg/l, 2,9 µg/l a 2,4 µg/l (Kong et al., 2015). Elliott et al. (2017) ve své studii uvádí maximální naměřenou hodnotu koncentrace metforminu naměřenou v USA 33,6 µg/l (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

Zvyšující se koncentrace metforminu v povrchových vodách zvyšuje riziko kontaminace podzemních vod. V severní Číně byly naměřené maximální koncentrace metforminu v domácích studních 0,045 µg/l a ve vrtech v údolí Mezquital (Mexiko) byla maximální koncentrace 0,029 µg/l (Elizalde-Velázquez et al., 2020). V Nigerii koncentrace metforminu nalezené v podzemní vodě dosahovala rozmezí 0,5 – 349 ng/l (Ebele, 2020).

Pitné vody se nejčastěji upravují pomocí chlorace. Runshuai Zhang et al. (2021) zkoumali výskyt metforminu a jeho transformačních produktů (Y a C) vzniklých po úpravě pitné vody chlorací. Koncentrace metforminu v pitné vodě se pohybovala v rozmezí 5,1 – 1203,5 ng/l a vedlejší produkt chlorace C byl v koncentraci od 1,3 do 9,7 ng/l (Runshuai Zhang et al., 2021). Houtman et al. (2014) ve své práci zkoumali přítomnost 42 léčiv v pitné vodě. Vzorky pro analýzu odebrali ze 3 vodáren v Nizozemsku. Většinovou zátěž analyzovaných léčiv tvořil metformin (cca ½ zátěže) (Houtman et al., 2014). Podle výsledků studie Kot-Wasik et al. (2016) dosáhl v Polsku v upravené vodě metformin maximální koncentraci 0,008 µg/l (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

Velká pozornost by měla být věnována i degradačním produktům, u kterých hrozí zvýšení mobility a toxicity než u původní sloučeniny (Tisler & Zwiener, 2018). Metformin je v čističkách odpadních vod efektivně z velké části bakteriálně transformován na guanylureu, proto lze očekávat, že koncentrace guanylurey budou v přírodních vodách vyšší než koncentrace metforminu (Jacob et al., 2019). Maximální koncentrace guanylurey nalezené v povrchové vodě v Německu (řeka Erpe) byla 222 µg/l (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

1.1.4 Možnosti fotochemické degradace metforminu

Informace o degradaci metforminu ve vodných roztocích jsou nedostatečné. Část metforminu vstupující do ČOV se biologicky odbourává v aktivovaném kalu za vzniku guanylurey. Jen málo studií pojednává o degradaci metforminu a vzniku jeho degradačních produktů během čištění odpadních vod. K degradaci metforminu může docházet při chloraci, ozonizaci, přímé fotolýze nebo fotokatalýze (Quintão et al., 2016).

Quintão et al. (2016) zkoumali degradaci metforminu ve vodném prostředí během přímé fotolýzy a fotokatalýzy. Přímou fotolýzou za použití UV-C záření se metformin odboural s 9,2% účinností po 30 minutách expozice. Účinnost odstranění metforminu za použití heterogenní fotokatalýzy byla 31 % po 30minutové expozici. Pro heterogenní katalýzu byl použit systém TiO_2/UV-C. Možnou degradaci za použití katalyzátoru můžeme přičíst vzniku hydroxylovému radikálu. Vzhledem k nízké účinnosti mineralizace metforminu se dá předpokládat výskyt vzdorujících vedlejších produktů v roztoku (Quintão et al., 2016).

Neamţu et al. (2014) se v rámci jejich srovnávací studie zabývali porovnáním míry degradace 8 mikropolutantů v přítomnosti H_2O_2 a Fe(II) v ultračisté vodě, vodě z Ženevského jezera a v odpadních vodách z ČOV. Vzorky byly vystaveny UV záření o vlnové délce 254 nm a také byly ozařovány ze solárního simulátoru. Metformin vykazoval ve všech případech značnou stabilitu. Rychlostní konstanta reakce 1. řádu pro degradaci metforminu při ozařování UV_{254} byla 0,0037 min^{-1}, po přidání H_2O_2 (300 μM) se zvýšila 4× na hodnotu 0,0152 min^{-1}. Při ozařování metforminu za stejných podmínek s přidaným Fe(II) (30 μM) bylo odstraněno méně než 15 % metforminu. Po ozařování metforminu simulovaným slunečním zářením došlo k odbourání z méně než 20 % (Neamţu et al., 2014).

Ve studii Maćerak et al. (2018) byla účinnost odbourávání metforminu za použití UV záření o vlnové délce 254 nm 50 % po 3hodinové expozici. Poté, co byl přidán do fotoreaktoru peroxid vodíku, proces degradace proběhl ze 100 %. Peroxid vodíku vedl k rychlejší degradaci metforminu, ale zároveň také k tvorbě toxičtějších meziproduktů (Maćerak et al., 2018).

Fotokatalytickými procesy se také zabývali Estrada-Arriaga et al. (2020). Nejvyšší účinnosti odstranění metforminu (97 %) bylo dosaženo použitím fotokatalyzátoru TiO_2 s kinetikou 0. řádu a rychlostní konstantou 2,36 mg/l.min. Použitím foto-Fentonovy reakce se metformin odboural z 66 % s kinetikou 0. řádu rychlostní konstantou 1,95 mg/l.min. K 41%

degradaci došlo při ferrioxalátové reakci s kinetikou 0. řádu a rychlostní konstantou 1,92 mg/l.min (Estrada-Arriaga et al., 2020).

Nezar et al. (2018) prováděli eliminaci metforminu z odpadních vod pomocí heterogenní katalýzy za použití různých typů katalyzátoru TiO_2 (P25, DT51, PC105, T42, EL10, PC500). Nejlepší účinnost degradace metforminu (62 % po 4 hod ozařování) vykazoval P25. V další části studie byla porovnávána eliminace metforminu (5 mg/l) za použití adsorpce, fotolýzy a fotokatalýzy po dobu 4 hodin. Pro fotolýzu a fotokatalýzu bylo použito sluneční záření. Adsorpce na TiO_2 vykazovala nejnižší míru degradace, a to 15 %. Proces fotolýzy dosáhl 67 % a fotokatalýzy 83 % degradace metforminu. Na závěr bylo dokázáno, že použitím akceptorů elektronů ve fotokatalýze, dochází k výraznému zvýšení reakční rychlosti: použitím $K_2S_2O_8$ (1000 mg/l) proběhla degradace z 91,6 % (4 hodiny ozařování), $Na_2S_2O_8$ (1000 mg/l) z 99 % (4 hodiny ozařování) a pro molární poměr $[H_2O_2]$/metformin roven 2000 byl metformin odbourán z 91 % (3,5 hodiny ozařování) (Nezar et al., 2018).

1.1.5 Toxické účinky metforminu na vodní organismy

Z důvodu výskytu vysokých koncentrací metforminu a jeho degradačního produktu ve vodním prostředí je vhodný výzkum jejich toxicity u necílových organismů (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

Ve sladkovodních systémech po celém světě byly nalezeny intersexuální ryby, kde samčí reprodukční tkáně vykazují známky feminizace. Jako pravděpodobná příčina významného endokrinního narušení byly uváděny estrogeny z antikoncepčních léků v odpadních vodách. Výzkum ukázal, že endokrinní narušení nemůže být předvídáno na základě interakce hormonálních receptorů. V odpadních vodách, v koncentracích řádově vyšších než u estrogenů, se nachází mnoho dalších nehormonálních léčiv, a přesto existuje jen málo údajů naznačujících dopady těchto léků. Výsledky práce Niemuth & Klaper (2015) ukazují, že vystavení jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) koncentraci metforminu nalezeného v odpadních vodách způsobuje rozvoj intersexuálních gonád u samců, zmenšení velikosti samců ryb a snížení plodnosti (Niemuth & Klaper, 2015). O tři roky později zkoumali mechanismus účinku metforminu jako endokrinního disruptoru. Prováděli měření exprese četných endokrinních genů u samců střevlí, vystavenou metforminu v nízké dávce, která se vyskytuje v odpadních vodách a v životním prostředí (40 μg/l) po celý rok. Výsledkem bylo objevení významné up regulace genů v exponovaných mužských gonádách (Niemuth & Klaper, 2018).

U medaky japonské (*Oryzias latipes*) dosáhla embrya vystavená působení metforminu LC50 383,3 mg/l. Samci vykazovali estrogenní účinky v důsledku up regulace transkripce genu VTG. Také bylo zjištěno významné snížení délky ryb a hmotnosti mokrých larev. Podobné účinky na růst ryb byly pozorovány i u ryb vystavených působení guanylurey (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

Působením guanylurey na hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) byla hodnota LC50 40 mg/l (akutní toxicita). Po 48 hodinách působení metforminu na embrya hrotnatky dosáhla LC50 81,4 mg/l. Pro hrotnatku papouščí (Daphnia similis) byly hodnoty LC50 pro metformin 14,3 mg/l (akutní toxicita) a 4,4 mg/l (chronická toxicita) (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

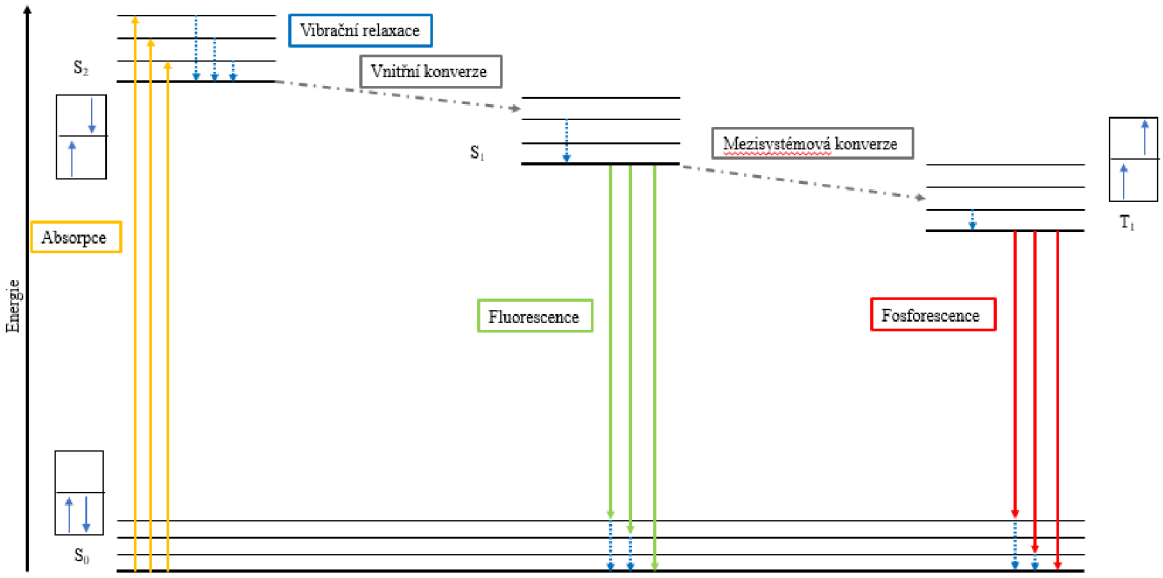
Okřehek menší byl vystaven působení vícenásobným koncentracím metforminu. Naměřená hodnota LC50 byla 53,7 mg/l (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

Ze zástupců řas byla pro test toxicity vybrána *Chlorella vulgaris*, neboť se jedná o kosmopolitní sladkovodní taxon a také pro jeho podobnost ve fotosyntetickém aparátu se suchozemskými rostlinami (Cummings et al., 2018). Působením metforminu došlo ke snížení schopnosti využívat světelnou energii a také k možné inhibici komplexu I elektronového transportního řetězce v mitochondriích řas, což by vedlo k potlačení fotosyntézy (Elizalde-Velázquez et al., 2020).

1.2 Fotochemická reakce

Fotochemická reakce je reakce, která je iniciována absorpcí elektromagnetického záření alespoň jednou složkou reakční směsi. U fotochemických reakcí rozlišujeme primární a sekundární procesy. Pokud produkty vznikají přímo z výchozí látky v excitovaném stavu, jedná se o primární procesy. Při vzniku produktů z meziproduktů, jež se tvoří z výchozí látky v excitovaném stavu, se jedná o procesy sekundární (Atkins & de Paula, 2013).

Organické molekuly mají v molekulách sudý počet elektronů, jejich elektrony jsou spárovány. Ve spektroskopii a kvantové mechanice se takový stav označuje jako singletový. Naopak například molekula kyslíku vykazuje paramagnetické vlastnosti, což svědčí o tom, že v ní jsou dva elektrony v nejvyšším elektronovém stavu nespárovány, mají shodný spin (LibreTexts, 2022). Jablonského diagram, znázorněn na Obr. 4, zobrazuje relativní energie molekuly v základním (S_0) a v excitovaných stavech (S_1, S_2 a T_1).



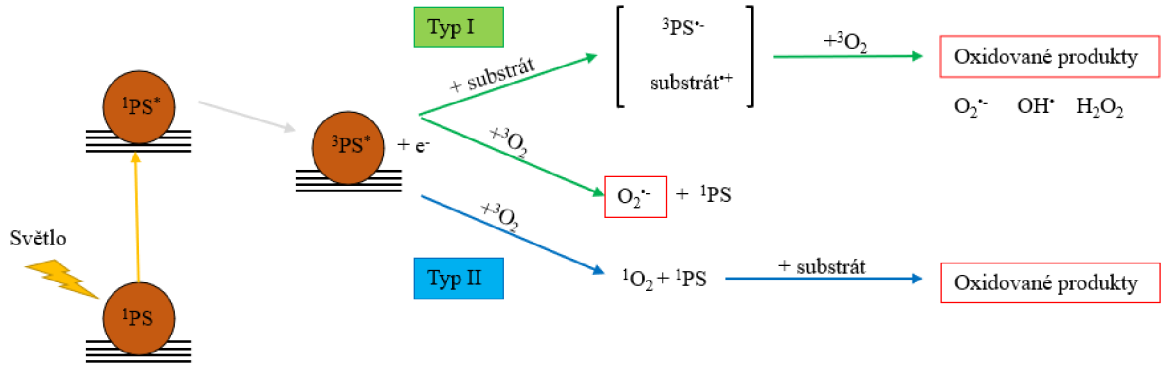
Obr. 4: Jablonského diagram.

Je známo, že přes vysoký oxidační potenciál molekulárního kyslíku nedochází k jeho reakci s organickými látkami. Toto se vysvětluje tzv. spinovým zákazem, tj. zákazem reakcí, při nichž by došlo ke změně spinu tripletového kyslíku na singletový oxidovaný produkt (Lang et al., 2005).

Tento zákaz lze obejít přítomností katalyzátorů nebo tzv. sensitizátorů. Sensitizátory jsou látky schopny svou excitační energii předat jiné molekule a tím ji převést do excitovaného stavu. Fotosensitizace je tedy proces, při němž k fotochemické či fotofyzikální změně jedné molekuly dojde v důsledku absorpce záření jinou molekulou, sensitizátorem, který není v reakci spotřebován (IUPAC, 2009).

Sensitizátor ve fotochemické reakci je látka obsahující chromofory silně absorbující fotony ve viditelné oblasti, případě UV oblasti světelného spektra, a následně přenášející absorbovanou energii na kyslík či jiné substráty. Sensitizátory jsou obecně aromatické nebo heterocyklické sloučeniny (Rychtáriková & Kuncová, 2009).

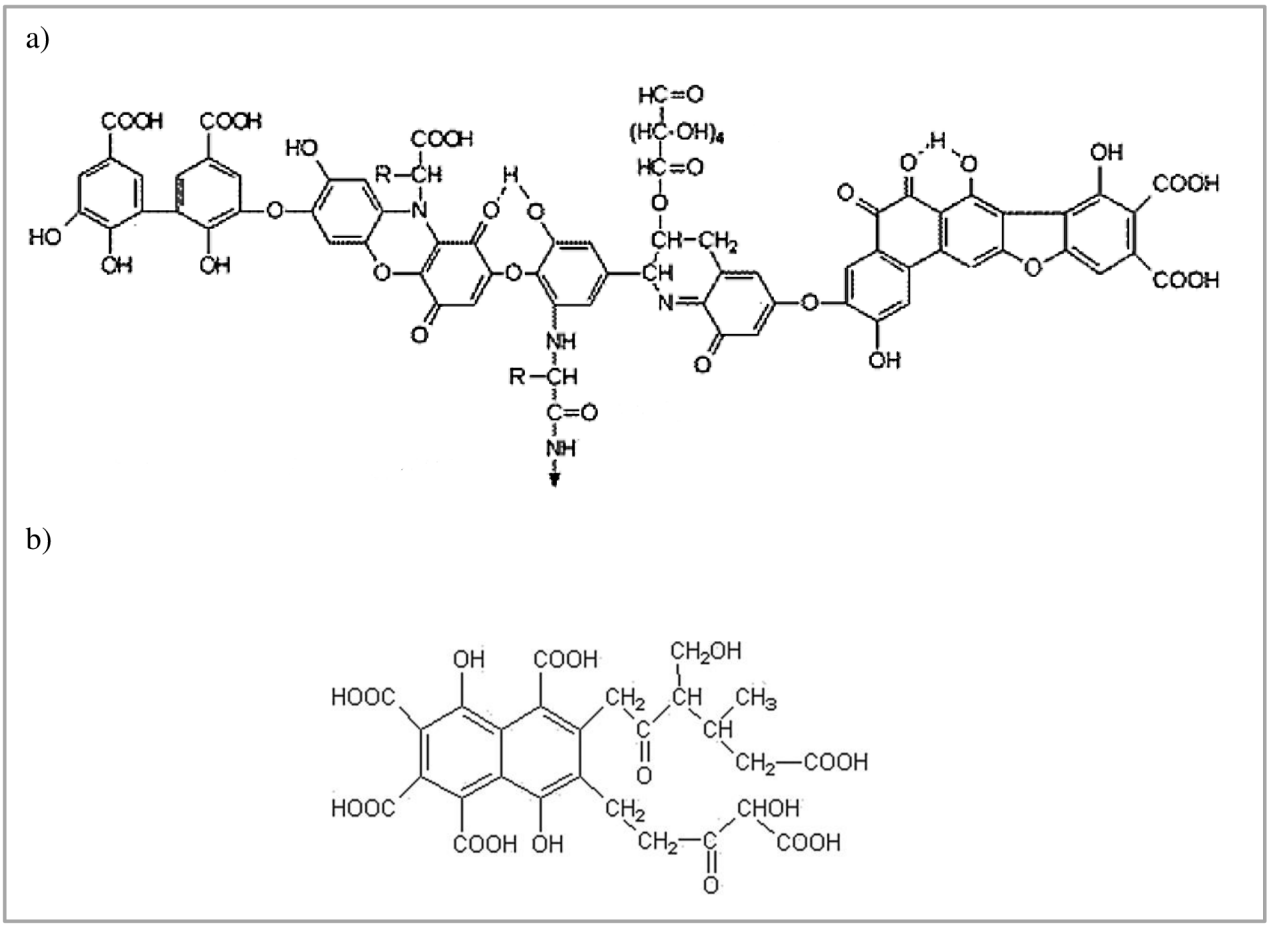
Na Obr. 5 je schéma průběhu fotosensitizované reakce. Při fotosensitizované reakci dochází absorpcí fotonu k excitaci sensitizátoru (PS) v základním singletovém stavu do vyšších energetických hladin (oranžová šipka). Fotosensitizátor v singletovém excitovaném stavu přechází vnitřní konverzí (šedá šipka) do stavu tripletového. Při reakci I typu dochází k přenosu elektronu mezi sensitizátorem v excitovaném tripletovém stavu a substrátem za vzniku radikálu nebo radikálového iontu. Přenos elektronu může probíhat v obou směrech. Častější je přenos elektronu ze substrátu na sensitizátor. Tyto radikály dále reagují v přítomnosti kyslíku a vznikají okysličené produkty ($O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, H_2O_2). Může také dojít k reakci sensitizátoru, který má nadbytečný elektron, s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálového aniontu. Dochází zde k regeneraci původního sensitizátoru. U reakce II typu dochází k přenosu energie z excitovaného tripletového stavu sensitizátoru na kyslík, který přechází z tripletového stavu na singletový. Fotosensitizátor se regeneruje a reaktivní kyslík v singletovém stavu reaguje se substrátem za vzniku oxidovaných produktů (Oleinick, 2011).



Obr. 5: Fotosensitizovaná reakce I a II typu (^1PS – sensitizátor v základním singletovém stavu, $^1PS^*$ – sensitizátor v excitovaném singletovém stavu, $^3PS^*$ – sensitizátor v excitovaném tripletovém stavu), upraveno dle Sai, 2021 a Oleinick, 2011.

Huminové látky jsou látky s fotosensitizačními vlastnostmi vyskytující se v přírodních vodách. Jsou to složité vysokomolekulární polycyklické sloučeniny s vysokou relativní molekulovou hmotností, obsahující fenolové a karboxylové funkční skupiny. Strukturně obsahují zejména aromatická jádra spojena alifatickými (často cyklickými) řetězci. Huminové látky vznikají degradací odumřelého rostlinného materiálu následnou transformací, obvykle oxidačními reakcemi (Pivokonský et al., 2010).

Většina autorů tyto látky dělí podle rozpustnosti ve zředěných alkalických roztocích na tři frakce: huminové kyseliny, fulvonové kyseliny a huminy (Pivokonský et al., 2010; Šmídová, 2010). V závislosti na změnách hodnot pH a iontové síle se mohou měnit vlastnosti, vzhled a chování huminových sloučenin (Šmídová, 2010). Na Obr. 6a je znázorněna Stevensonova modelová struktura huminových kyselin a na Obr. 6b je znázorněn Weberův model fulvonových kyselin.



Obr. 6: Struktura: a) huminových kyselin, upraveno dle Weber, 2002, b) fulvinové kyseliny, převzato z Weber, 2002.

Důležitou vlastností huminových látek je schopnost tvořit komplexy v závislosti na pH, nasycenosti reakčních míst, koncentracích iontů a přítomnosti dalších ligandů. Huminové sloučeniny se mohou vázat s biomolekulami (enzymy, toxiny, priony, DNA a feromony) a také reagují s celou škálou xenobiotik (Pivokonský et al., 2010; Vlachová, 2007).

Huminové látky vykazují fotosensitizační vlastnosti, mohou sloužit k produkci tzv. singletového kyslíku (dvou excitovaných forem kyslíku se spárovanými elektrony), a tím k oxidaci mnoha polutantů v přírodních vodách (Aguer et al., 1999).

Mezi účinné sensitizátory se počítají látky jako antrachinon-2-sulfonát, který produkuje radikály (Ning Liu & Granr Sun, 2011), methylenová modř, produkující singletový kyslík (Ye et al., 2017), eosin, který má dlouhožijící excitovaný stav s oxidačními vlastnostmi, přičemž redukovaná forma po oxidaci molekulárním kyslíkem poskytuje základní stav eosinu a anionradikálu $O_2^{-\bullet}$ (Dong-Mei Yan et al., 2018) či riboflavin, který produkuje reaktivní částice kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species), jak uvádí např. Khaydukov a kol. 2016.

2 Materiál a metody

Metformin hydrochlorid byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich v čistotě Pharmaceutical Secondary Standard. Chlorid železitý a hydroxid sodný byly zakoupeny od firmy Penta. Použitými senzitizátory byly riboflavin s čistotou ≥ 98 %, eosin s čistotou 99 %, methylenová modř (MM) s čistotou ≥ 97 %, sodná sůl kyseliny anthrachinon-2-sulofnové (AQS) v čistotě 97 % a sodná sůl huminové kyseliny (HA) v technické čistotě. Dihydrogenfosforečnan sodný byl zakoupen od firmy Fluka v čistotě p.a. Kyselina fosforečná (85%) byla zakoupena od firmy Merck. Methanol pro HPLC byl zakoupen od firmy Merck. Při přípravě všech roztoků byla použita Milli-Q® voda.

Zásobní roztoky metforminu (50 mg/l), guanylurey (54 mg/l) a sensitizátorů v případě AQS (1,5 g/l), MM (1,5 g/l), riboflavinu (70 mg/l) a HA (50 mg/l) byly připraveny rozpuštěním v ultra čisté vodě, v případě eosinu (3 g/l) bylo 15 mg rozpuštěno v 5 ml methanolu a dále ředěno ultračistou vodou. Roztoky byly uchovávány ve tmě při laboratorní teplotě.

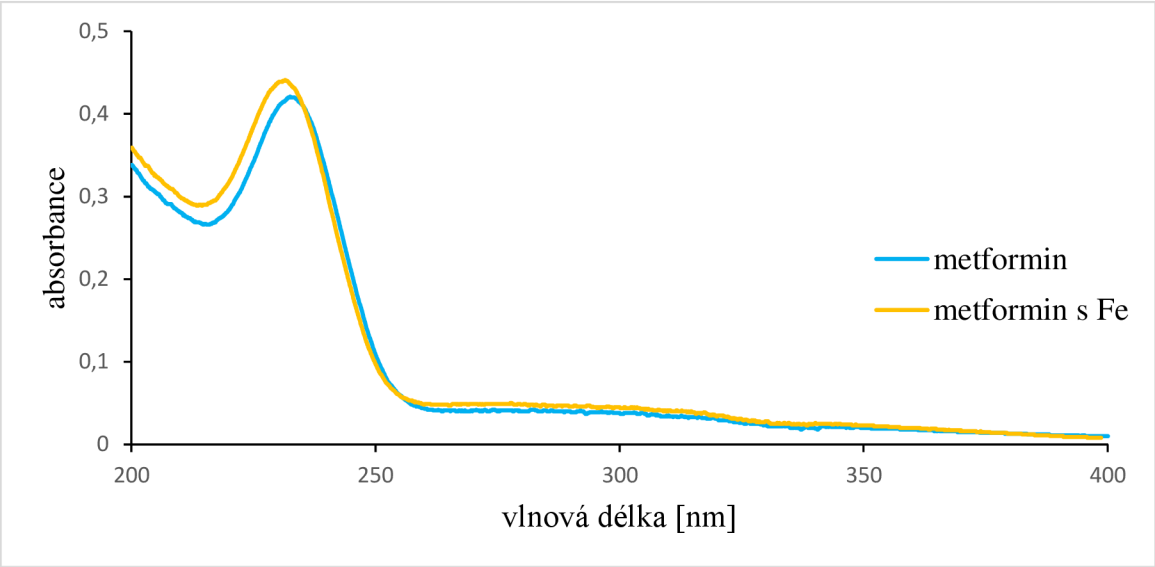
Spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru Shimadzu UV-1601 se softwarem UV-Probe.

Ozařování bylo provedeno ve fotochemickém reaktoru Rayonet R100 osazeném lampami RPR 3000Å, které emitují záření 250-350 nm. Záření o vlnových délkách kratších než 300 nm bylo odfiltrováno optickým sklem (ozařování bylo prováděno ve skleněných kyvetách opatřených víčkem). Zářivý tok (energie všech vlnových délek v detekčním rozmezí přístroje vyzářená za jednotku času) byl měřen přístrojem Lutron UV A, po přepočtení na ozařovanou plochu jeho hodnota činila 4,5 W.

Pro chromatografické stanovení metodou HPLC byla použita metoda zavedená Křížovou M. (2022). Stanovení bylo prováděno na přístroji Thermo Scientific Dionex Ultimate system 3000 (USA) se spektrofotometrickou detekcí na koloně Luna SCX (150 ×3,0 mm; 5 µm). Mobilní fáze byla složena z 0,15 mol/l fosfátového pufru (pH 2,75). Použitý průtok byl 1,5 ml/min a nástřik vzorku byl 20 µl. Teplota kolonového prostoru byla 25 °C. Detekce byla prováděna spektrofotometrickým detektorem PDA 3000RS při vlnové délce 200 nm. Pro zpracování chromatografických dat byl použit program Chromeleon.

3 Výsledky

Na Obr. 7 je znázorněno absorpční spektrum roztoku metforminu a roztoku metforminu s Fe(III) (5 mg/l) v oblasti vlnových délek od 200 nm do 400 nm.



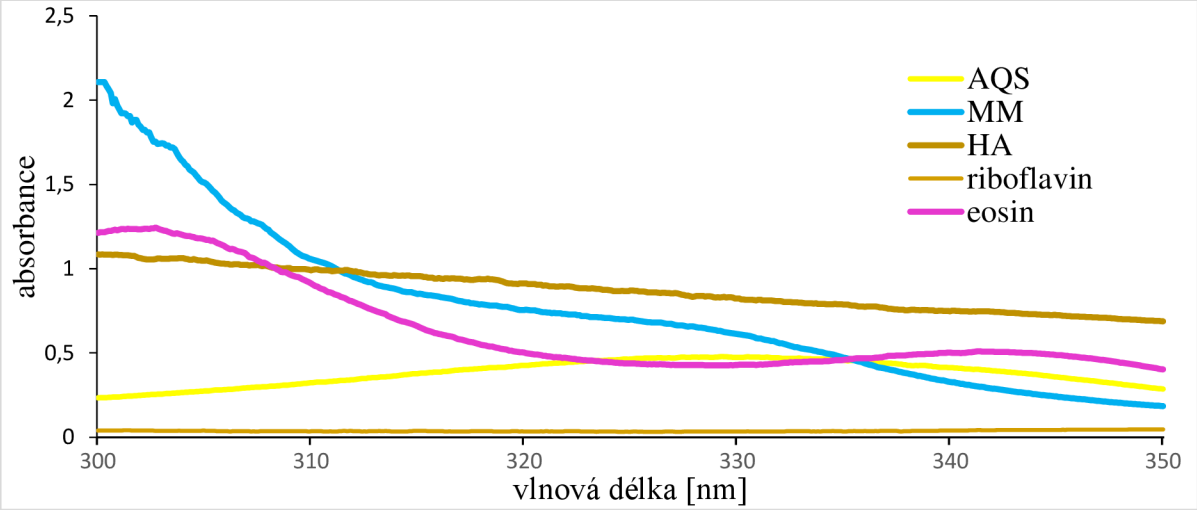
Obr. 7: Absorpční spektrum roztoku metforminu a metforminu s Fe(III).

Z Obr. 7 je vidět, že absorpční maximum metforminu bylo při vlnové délce 233 nm, v oblasti nad 300 nm je absorbance velmi nízká. Roztok metforminu v přítomnosti železitých iontů vykazoval vyšší absorbanci než roztok metforminu.

Po 60 minutách ozařování roztoku metforminu byl úbytek koncentrace metforminu cca 5 %. U roztoku metforminu s Fe(III) byl úbytek koncentrace metforminu 21 %.

Při změně pH na hodnotu 9,9 u roztoku metforminu a metforminu s Fe(III), nebyl ani v jednom případě pozorován úbytek metforminu při 60minutovém ozáření.

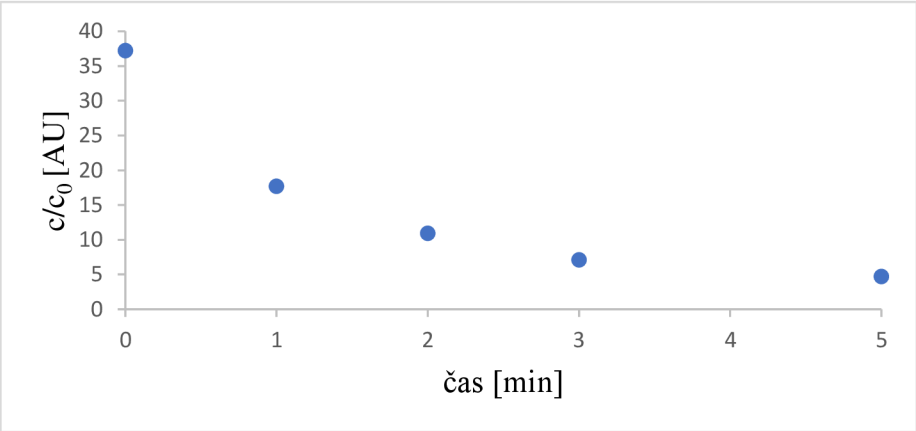
Na Obr. 8 jsou znázorněny UV-VIS spektra vybraných sensitizátorů, mezi které patří AQS, MM, HA, riboflavin a eosin.



Obr. 8: UV-VIS spektra vybraných sensitizátorů: AQS (1×10^{-4} mol/l), MM (1×10^{-4} mol/l), HA (4 mg/l), riboflavin (1×10^{-5} mol/l) a eosin (0,15 g/l).

Z Obr. 8 je patrné, že v oblasti vlnových délek emitovaných fotochemickým reaktorem vůbec neabsorbuje riboflavin, nebyl tedy dále testován. Ostatní sensitizátory byly testovány jako potenciální sensitizátory pro degradaci metforminu.

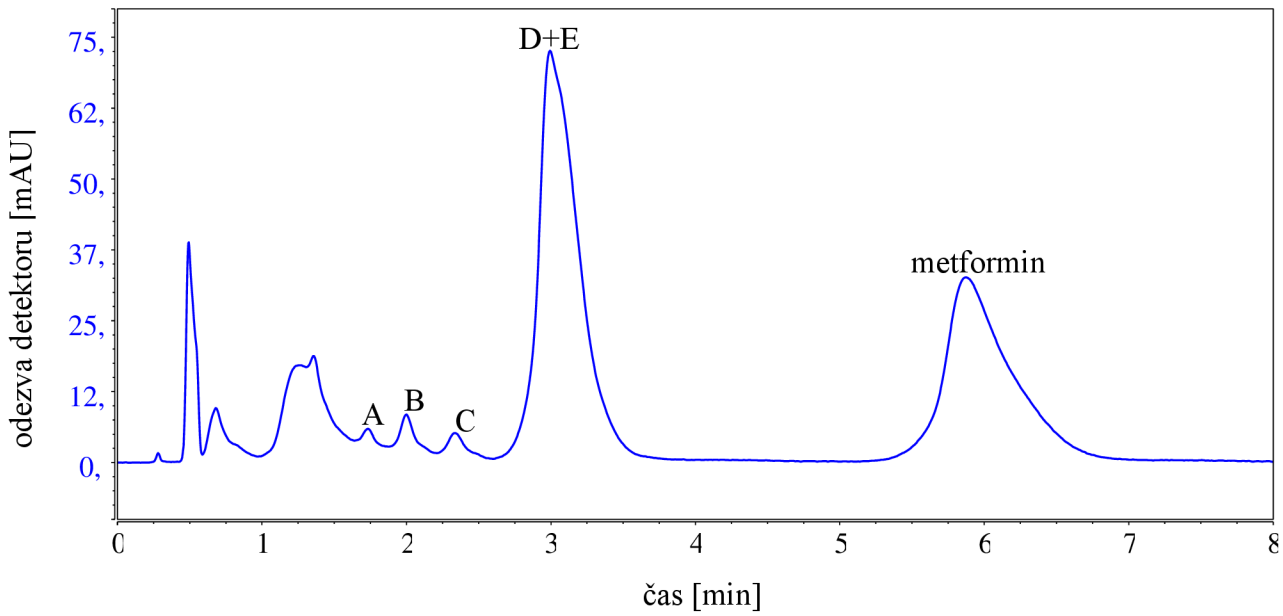
Na rozpad metforminu neměly vliv sensitizátory MM, HA, riboflavin a eosin. Použitím sensitizátoru AQS (1×10^{-4} mol/l) po 25 minutách ozařování došlo k vymizení veškerého metforminu. AQS byl proto naředěn na koncentraci 5×10^{-5} mol/l. Závislost koncentrace metforminu s AQS na čase je znázorněn na Obr. 9.



Obr. 9: Závislost koncentrace metforminu s AQS (5×10^{-5} mol/l) na čase.

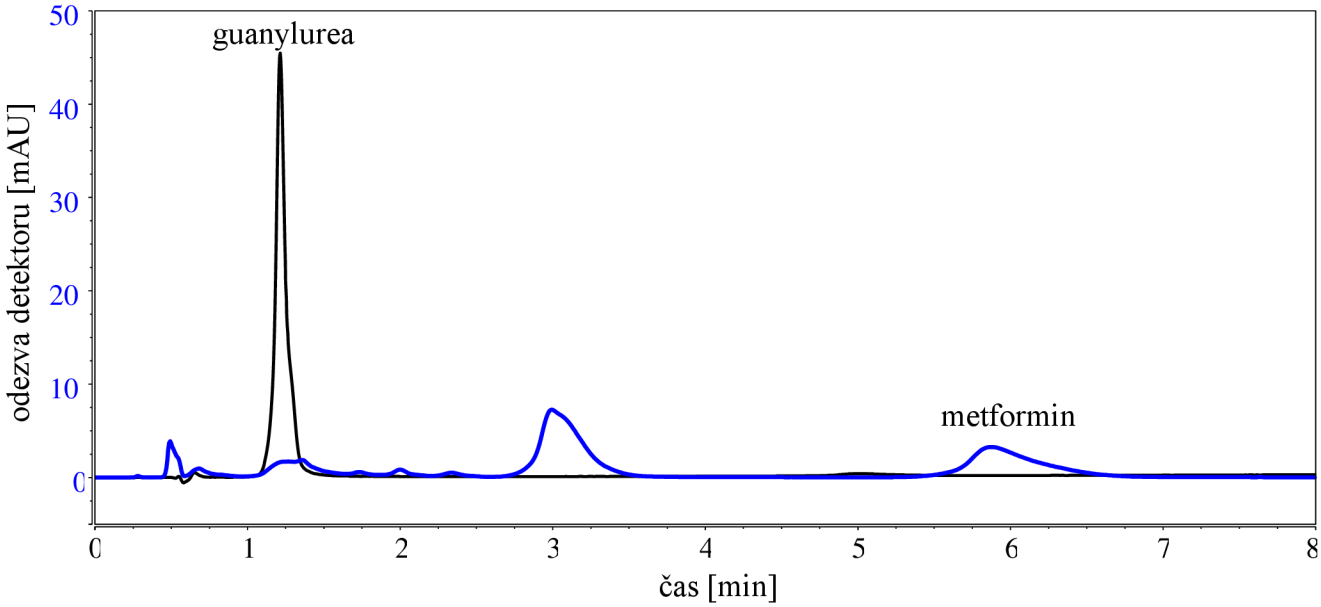
Z grafu je vidět, že po 5 minutách ozařování došlo k úbytku metforminu z 87 %. Degradace metforminu nesledovala v celém rozsahu ozařovacích časů exponenciální pokles, pouze v prvních dvou minutách bylo možno odbourávání popsat kinetikou 1. řádu. Rychlostní konstanta spočtená pro tuto počáteční fázi reakce byla 0,614 min^{-1}.

Na obr. 10 je znázorněn chromatogram po ozařování směsi metforminu v přítomnosti AQS. Všechny vznikající produkty měly retenční čas kratší než metformin.



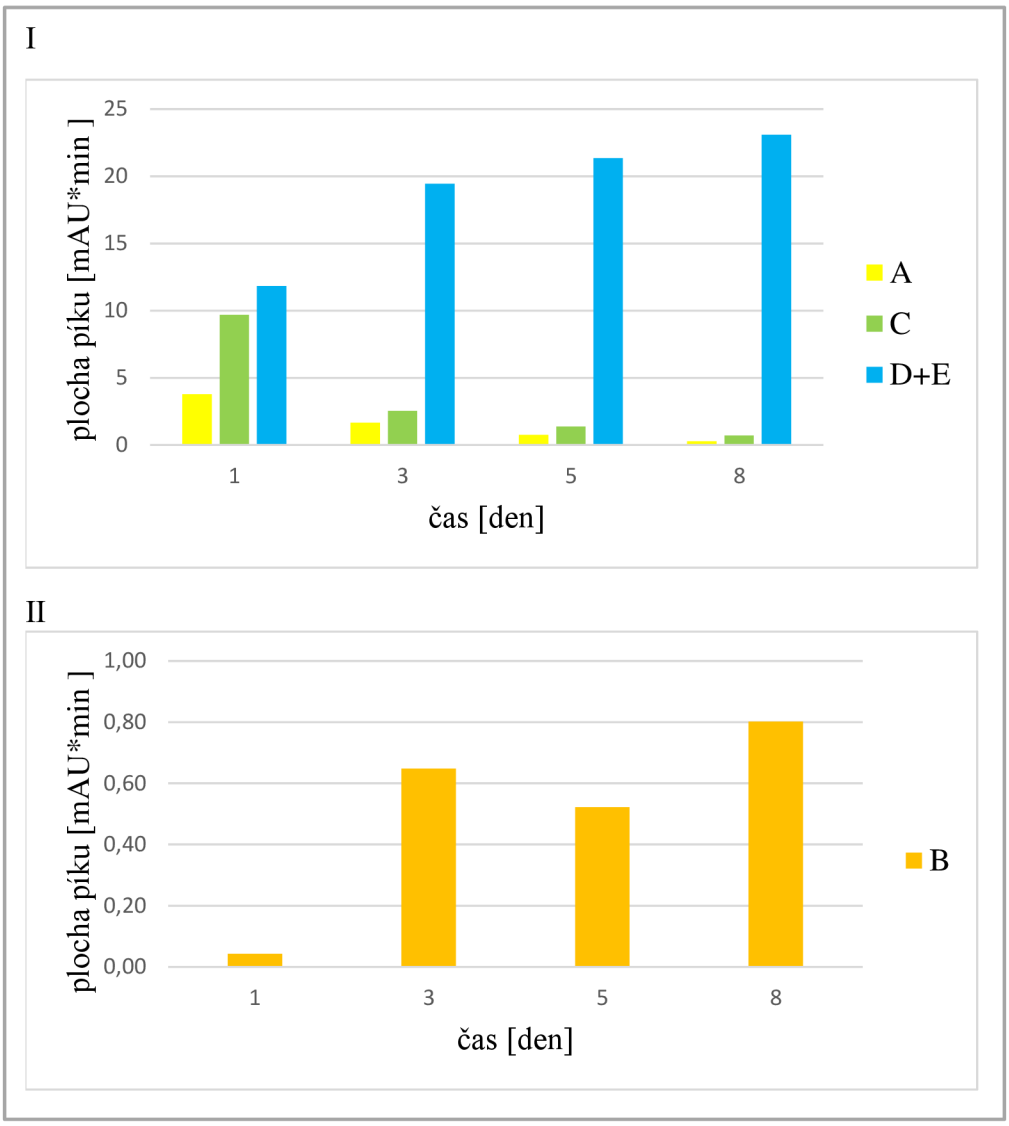
Obr. 10: Chromatogram reakční směsi metforminu s AQS a jeho degradačních produktů: A – 1,74 min; B – 2,02 min; C – 2,35 min; D+E – 3,01 min, guanylurea – 1,21 min; metformin – 5,91 min.

Byl proveden test, zda při fotosensitizované degradaci metforminu v přítomnosti AQS vzniká guanylurea. Guanylurea v roztoku standardu měla za daných chromatografických podmínek velmi krátký retenční čas, 1,21 min. (Obr. 11). V reakční směsi metforminu ozářeného v přítomnosti AQS se vyskytuje v uvedeném retenčním čase náznak píku (splývající ovšem s dalším píkem při nepatrně delším retenčním čase, cca 1,35 min.) Nelze tedy vyloučit, že v nepatrném množství quanylurea vzniká, ale pokud ano, tak jen jako zcela minoritní produkt. Na Obr. 11 je chromatogram guanylurey a metforminu s jeho degradačními produkty, které vznikly po ozařování roztoku metforminu s AQS.



Obr. 11: Chromatogram standardu guanylurey a reakční směsi metforminu s AQS po ozáření 3 min.

Stabilita degradačních produktů a metforminu byla měřena během 8 dnů. Během těchto dní byl metformin stabilní. Obr. 12 I znázorňuje velikost hodnoty plochy píku pro degradační produkty A, C, D+E. Z důvodu menší intenzity píku degradačního produktu B, je tento degradační produkt v samostatném grafu (Obr. 12 II).



Obr. 12: Závislost plochy píků na čase: I – píky A, C, D+E; II – pík B.

Z Obr. 12 je vidět, že degradační produkty metforminu jsou nestabilní látky. Během 8 dnů pozorování stability došlo k úbytku množství degradačního produktu A a C. Opačný trend byl pozorován u degradačních produktů D a B. Od třetího dne začal vznikat další degradační produkt E. Degradační produkt E měl retenční čas blízký retenčnímu času degradačního produktu D, proto byla plocha píku vyhodnocena jako suma.

4 Diskuse

Metformin samotný se s použitím záření o vlnových délkách nad 300 nm neodbourával, po 60 minutách ozařování ubylo jen cca 5 %. S přídavkem železitých iontů došlo k odbourání cca 20 % za 60 minut ozařování. To je v zásadě v souladu s prací autorů Neamţu et al. (2014), kteří pozorovali při ozáření roztoku metforminu simulovaným slunečním zářením úbytek menší než 20 %.

Několik prací, např. Quintao et al. (2016), Neamţu et al. (2014), se zabývalo ozařováním metforminu krátkovlnným zářením (o vlnové délce 254 nm). Záření této vlnové délky má schopnost fotolýzy, tedy přímého rozštěpení vazeb (Klementová, 2018). Jiní autoři, např. Nezar et al. (2018) a Estrada-Arriaga et al. (2020) studovali odbourávání za použití heterogenní fotokatalýzy s TiO_2 jako katalyzátorem. Tyto práce mají význam pro možné aplikace v čističkách odpadních vod, stejně jako foto-Fentonova reakce, ale nejsou relevantní k systémům, jakými jsou přírodní povrchové vody.

V přírodních povrchových vodách jsou ovšem přítomny látky, které mají sensitizační účinky. K fotosensitizátorům v přírodních vodách patří hlavně rozpuštěné organické látky (Silverman et al., 2013), ale i např. dusičnany a dusitany (Calza et al., 2012).

V předložené práci bylo vybráno několik sloučenin, o nichž je známo, že vykazují sensitizační účinky (i když v přírodních vodách se nevyskytují, nebo jen ve velmi nízkých koncentracích) – riboflavin (Possetto et al., 2021), methylenová modř (Tanielian et al., 1992), eosin (Donghua Pei & Jingfei Luan, 2012), huminová kyselina (Si Li & Jiangyong Hu, 2016). Riboflavin nakonec nebyl ani testován, protože v koncentraci, v níž je jej možné připravit, neabsorbuje prakticky vůbec v oblasti vlnových délek emitovaných zdrojem použitého záření, které imituje krátkovlnnou oblast slunečního záření dopadajícího na zemský povrch. Eosin, methylenová modř a huminová kyselina nevykazovaly žádný sensitizační efekt, v jejich přítomnosti nedocházelo k odbourávání ani v tom rozsahu, v jakém fotochemická degradace probíhala v roztoku samotného metforminu. Tento výsledek může být způsoben stínicím efektem, tedy že většinu světla pohltí sensitizátor, který ale v daném prostředí má účinek pouze absorbující látky a nikoli fotochemicky účinného sensitizátoru (Yong Chen et al., 2017). Účinným se ukázal pouze anthrachinon-2-sulfonan (AQS). Tento senzitizátor se vyznačuje vysokou energií tripletového stavu (Herkstroeter et al., 1965), jeho hodnota činí 251 kJ/mol.

Tato skutečnost je pravděpodobně zodpovědná za významné zvýšení reaktivity v přítomnosti AQS, kdy rychlostní konstanta má hodnotu 0,614 min^{-1}.

Literatura udává, že hlavním produktem biotransformace metforminu v čističkách odpadních vod je guanylurea (Jacob et al., 2019). V předložené práci byl proveden test, zda i v AQS sensitizované fotodegradaci vzniká tento produkt. Výsledek nelze interpretovat jednoznačné, protože v místě píku guanylurey je náznak píku v ozářené směsi, ale tento pík splývá s píkem o nepatrně delším retenčním čase. Je tedy možné, že guanylurea vzniká i při fotosensitizované reakci, ale jen jako minoritní produkt.

5 Závěr

Metformin se ve vodném roztoku fotochemicky odbourává velmi pomalu (za 60 minut jen 5,5 % odbouráno). V přítomnosti železitých iontů je odbourávání cca čtyřikrát rychlejší. V přítomnosti sensitizátorů MM, eosinu a HA k odbourávání nedochází ani v rozsahu, v jakém probíhá u samotného metforminu. Sensitizátor AQS způsobí velmi rychlé odbourání metforminu, rychlostní konstanta počáteční fáze odbourávání je 0,614 min^{-1}. Při fotosensitizované reakci v přítomnosti AQS vzniká několik produktů, tyto produkty podléhají následným nefotochemickým přeměnám. Guanylurea nebyla jednoznačně prokázána mezi produkty této reakce, pokud vzniká, pak jako zcela minoritní produkt.

6 Seznam použité literatury

Aguer J. P., Richard C., Andreux F. (1999): Effect of light on humic substances: production of reactive species. Analusis, 27, 387-389.
Staženo (listopad 2022) z: http://dx.doi.org/10.1051/analusis:1999270387

Allgot B., Gan D., King H., Lefèbvre P., Mbanya J., Silink M., Siminerio L., Williams R., Zimmet P. (2003): Executive summary. Diabetes atlas, 2. vydání, str. 12. ISBN 2-930220-27-6.
Staženo (září 2022) z: https://suckhoenoitiet.vn/download/Atla-benh-dai-thao-duong-21511669800.pdf

Ambrosio-Albuquerque E. P., Cusioli L. F., Bergamasco R., Gigliolli A. A. S., Lupepsa L., Paupitz B. R., Barbieri P. A., Borin-Carvalho L. A., de Brito Portela-Castro A. L. (2021): Metformin environmental exposure: A systematic review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 83, 103588.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103588

Atkins P. & de Paula J. (2013): Fyzikální chemie. Vydavatelství VŠCHT v Praze. ISBN 978-80-7080-830-6. Str. 771-772. Citováno (září 2022)

Bailey C. J. (2004): Metformin: its botanical background. Practical Diabetes International, 21, 115-117.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1002/pdi.606

Bailey C. J. (2017): Metformin: historical overview. Diabetologia, 60, 1566-1576.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z

Briones R. M., Sarmah A. K., Padhye L. P. (2016): A global perspective on the use, occurrence, fate and effects of antidiabetic drug metformin in natural and engineered ecosystems. Environmental Pollution, 219, 1007-1020.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.040

Calza P., Vione D., Novelli A., Pelizzetti E., Minnero C. (2012): The role of nitrite and nitrate ions as photosensitizers in the phototransformation of phenolic compounds in seawater. Science of The Total Environment, 439, 67-75.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.009

Cummings B. M., Needoba J. A., Peterson T. D. (2018): Effect of metformin exposure on growth and photosynthetic performance in the unicellular freshwater chlorophyte, *Chlorella vulgaris*.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207041

Dong-Mei Yan, Quan-Qing Zhao, Li Rao, Jia-Rong Chen, Wen-Jing Xiao (2018): Eosin Y as a redox catalyst and photosensitizer for sequential benzylic C-H amination and oxidation. Chemistry a European Journal, 24, 16895-16901.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1002/chem.201804229

Donghua Pei & Jingfei Luan (2012): Development of visible light-responsive sensitized photocatalysts. International Journal of Photoenergy, 2012, 262831.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1155/2012/262831

Ebele A. J., Oluseyi T., Drage D. S., Harrad S., Abdallah M. A. (Abou-Alwafa) (2020): Occurrence, seasonal variation and human exposure to pharmaceuticals and personal care products in surface water, groundwater and drinking water in Lagos State, Nigeria. Emerging Contaminants, 6, 124-132.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.02.004

Elizalde-Velázquez G. A., Gómez-Oliván L. M. (2020): Occurrence, toxic effects and removal of metfromin in the aquatic environments in the world: Recent trends and perspective. Science of The Total Environment, 702, 134924.
Staženo (květen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134924

Estrada-Arriaga E. B., García-Sánchez L., Falcón-Rojas A. (2020): Experimental design approach for the removal of the antidiabetic drug, metformin at a high concentration by photocatalytic processes. Water and Environment Journal, 35, 759-771.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1111/wej.12668

Galicia-Garcia U., Benito-Vicente A., Jebari S., Larrea-Sebal A., Siddiqi H., Uribe K. B., Ostolaza H., Martín C. (2020): Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Int. J. Mol. Sci., 21(17), 6275.
Staženo (září 2022) z: https://doi.org/10.3390/ijms21176275

Goyal R., Jialal I. (2018): Diabetes mellitus type 2. Europe PMC. PMID:30020625.
Staženo (září 2022) z: https://europepmc.org/article/nbk/nbk513253#__NBK513253_dtls

Herkstroeter W. G., Lamola A. A., Hammond G. S. (1964): Mechaisms of photochemical reactions in solution. XXVIII. Values of triplet excitation energies of selected sensitizers. J. Am. Chem. Soc., 86, 21, 4537-4540.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1021/ja01075a005

Houtman C. J., Kroesbergen J., Lekkerkerker-Teunissen K., van der Hoek J. P. (2014): Human health risk assessment of the mixture of pharmaceuticals in Dutch drinking water and its sources based on frequent monitoring data. Science of The Total Environment, 496, 54-62.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.022

Iupac "Photosensitization". IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2009. ISBN 978-0-9678550-9-7.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1351/goldbook.P04652

Jacob S., Knoll S., Huhn C., Köhler H., Tisler S., Zwiener Ch., Triebskorn R. (2019): Effects of guanylurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, on the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*). Peer J., 7, e7289.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.7717%2Fpeerj.7289

Khaydukov E. V., Mironova K. E., Semchishen V. A., Generalova A. N., Nechaev A. V., Khochenkov D. A., Stepanova E. V., Lebedev O. I., Zvyagin A. V., Deyev S. M., Panchenko V. Ya. (2016): Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment. Scientific Reports, 6, 35103.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1038/srep35103

Klementová S. (2018): Photochemical Degradation of Organic Xenobiotics in Natural Waters. In: Photochemistry and Photophysics – Fundamentals to Applications. Eds: Satyen Saha & Sankalan Mondal, IntechOpen. ISBN 978-1-78923-784-9.
Staženo (prosinec 2022) z:
https://www.intechopen.com/chapters/60284#:~:text=10.5772/intechopen.74756

Kong L., Kadokami K., Wang S., Duong H. T., Chau H. T. C. (2015): Monitoring of 1300 organic micropollutants in surface waters from Tianjin, North China. Chemosphere, 122, 125-130.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.025

Křížová M. (2022): Použití kapalinové chromatografie v analýze vzorků životního prostředí. Bakalářská práce, PřF JU. Citováno (listopad 2022)

Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M. (2005): Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku. Chemické listy, 99, 211-221.
Staženo (září 2022) z: https://www.researchgate.net/profile/Kamil-Lang-2/publication/242659731_POKROKY_VE_FOTOCHEMII_SINGLETOVEHO_KYSLIKU/links/546085310cf27487b450e5af/POKROKY-VE-FOTOCHEMII-SINGLETOVEHO-KYSLIKU.pdf

LibreTexts, Chemistry (2022): Molecular orbital theory predicts that molecular oxygen is paramagnetic.
Staženo (září 2022) z:
https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Physical_Chemistry_(LibreTexts)/09%3A_Chemical_Bonding_in_Diatomic_Molecules/9.10%3A_Molecular_Orbital_Theory_Predicts_that_Molecular_Oxygen_is_Paramagnetic

Luengo A., Sullivan L. B., Vander Heiden M. G. (2014): Understanding the complex-I-ty of metformin action: limiting mitochondrial respiration to improve cancer therapy. BMC Biology, 12, 82.
Staženo (listopad 2022) z: https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-014-0082-4

Lüllmann H., Mohr K., Hein L. (2012): Diabetes mellitus. Barevný atlas farmakologie. GRADA. ISBN: 978-80-247-3908-3. 4. vydání, str. 240. (říjen 2022)

Maćerak A. L., Kerkez Đ., Bečelić-Tomin M., Tomašević Pilipović D., Kulić A., Jokić J., Dalmacija B. (2018): Removal of diclofenac and metformin from water in laboratory photo reactor. Proceedings, 2(20), 1288.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.3390/proceedings2201288

Neamţu M., Grandjean D., Sienkiewicz A., Le Faucheur S., Slaveykova V., Velez Colmenares J. J., Pulgarín C., de Alencastro L. F. (2014): Degradation of eight relevant micropollutants in different water matrices by neutral photo-Fenton process under UV_{254} and simulated solar light irradiation – A comparative study. Applied Catalysis B: Environmental, 158-159, 30-37.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.04.001

Nezar S., Laoufi N. A. (2018): Electron acceptors effect on photocatalytic degradation of metformin under sunlight irradiation. Solar Energy, 164, 267-275.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.solener.2018.02.065

Niemuth N. J., Klaper R. D. (2015): Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. Chemosphere, 135, 38-45.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.060

Niemuth N. J., Klaper R. D. (2018): Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. Aquatic Toxicology, 195, 33-40.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.003

Ning Liu & Gang Sun (2011): Photoinduced decolorization of 2,6-dichloroindophenol by 2-anthraquinone sulfonate treated nylon. ACS Appl. Mater. Interfaces, 3, 4, 1221-1227.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1021/am200047a

Oleinick N. L (2011).: Basic Photosensitization. Department of Radiation Oncology, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio.
Staženo (listopad 2022) z: http://photobiology.info/Oleinick.html

Perušičová J., (2010): Proč je metformin lékem první volby pro nemocné s diabetes mellitus 2. typu? Interní Med, 12(7 a 8), 385-386.
Staženo (září 2022) z: https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/07/12.pdf

Pivokonský M., Pivokonská L., Bubáková P., Janda V. (2010): Úprava vody s obsahem huminových látek. Chem. listy, 104, 1015-1022.
Staženo (září 2022) z: https://docplayer.cz/18945575-Uprava-vody-s-obsahem-huminovych-latek-martin.html

Possetto D., Reynoso A., Natera J., Massad W. A. (2021): Kinetics of the riboflavin-senssitized degradation of pyrethroid insecticides. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 418, 113416.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113416

Pryor R., Cabreiro F. (2015): Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. Biochem. J., 471(3), 307-322.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1042%2FBJ20150497

PubChem. (2022): Metformin.
Staženo (září 2022) z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin

Quintão F. J. O., Freitas J. R. L., de Fátima Machado C., Aquino S. F., de Queiroz Silva S., de Cássia Franco Afonso R. J. (2016): Characterization of metformin by-products under photolysis, photocatalysis, ozonation and chlorination by high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spektrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 30, 2360-2368.
Staženo (květen 2022) z: https://doi.org/10.1002/rcm.7724

Rani P. R., Begum J. (2016): Screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus, where do we stand. Journal of Clinical & Diagnostic Research, 10, QE01-QE04.
Staženo (září 2022) z: https://doi.org/10.7860%2FJCDR%2F2016%2F17588.7689

Runshuai Zhang, Yuanzhen He, Luxia Yao, Jie Chen, Shihao Zhu, Xinxin Rao, Peiyun Tang, Jia You, Guoqiang Hua, Lu Zhang, Feng Ju, Lianfeng Wu (2021): Metformin chlorination byproducts in drinking water exhibit marked toxicities of a potential health concern. Environment International, 146, 106244.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106244

Rychtáriková R., Kuncová G. (2009): Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy. Chem. Listy, 103, 800-813.
Staženo (září 2022) z: http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1449/1449

Sai D. L., Lee J., Nguyen D. L., Kim Y. P. (2021): Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. Experimental & Molecular Medicine, 53, 495-504.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1038/s12276-021-00599-7

Scheen A. J. (1996): Clinical pharmacokinetics of metformin. Clinical Pharmcokinetics, 30, 359-371.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.2165/00003088-199630050-00003
Si Li & Jiangyong Hu (2016): Photolytic and photocatalytic degradation of tetracycline: Effect of humic acid on degradation kinetics and mechanisms. Journal of Hazardous Materials, 318, 134-144.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.100

Silverman A. I., Peterson B. M., Boehm A. B., McNeill K., Nelson K. L. (2013): Sunlight inactivation of human viruses and bacteriophages in coastal waters containing natural photosensitizers. Environ. Sci. Technol., 47, 1870-1878.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1021/es3036913

SÚKL (2022): Databáze léků.
Staženo (říjen 2022) z:
https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=metformin&data%5Bcode%5D=&data%5Batc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bchbox%5D%5B0%5D=braill-yes&data%5Bchbox%5D%5B1%5D=braill-

no&data%5Bchbox%5D%5B2%5D=braill-def&data%5Bwith_adv%5D=0&data%5Blisting%5D=100&search=Vyhledat&page=1

Šmídová H. (2010): Průzkum aplikací huminových kyselin v medicíně a kosmetice. Bakalářská práce, Chemická fakulta VUT Brno.
Staženo (září 2022) z: https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/13035/final-thesis.pdf?sequence=-1&isAllowed=y

Tanielian Ch., Mechin R., Shakirullah M. (1992): Origin of dye bleaching and polymer degradation in the methylene blue-sensitized photo-oxygenation of polybutandiene. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 64, 191-199.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1016/1010-6030(92)85106-5

Tisler S., Zwiener Ch. (2018): Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. Science of The Total Environment, 628-629, 1121-1129.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.105

Trautwein Ch., Berset J., Wolschke H., Kümmerer K. (2014): Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. Environment International, 70, 203-212.
Staženo (říjen 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.008

Velký lékařský slovník: biguanidy.
Staženo (září 2022) z: https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/biguanidy-4
Viollet B., Guigas B., Snaz Garcia N., Leclerc J., Foretz M., Andreelli F. (2012): Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin. Sci. (Lond), 122(6), 253-270.
Staženo (listopad 2022) z: https://doi.org/10.1042%2FCS20110386

Vlachová K. (2007): Vliv huminových látek na toxicitu komplexních vzorků ze životního prostředí. Bakalářská práce. PřF MU.
Staženy (září 2022) z: https://is.muni.cz/th/qtad1/Vliv_huminovych_latek.pdf

Weber J. (2002): Definition of soil organic matter.
Staženo (září 2022) z: https://www.humintech.com/fileadmin/content_images/agriculture/information/articles_pdf/DEFINITION_OF_SOIL_ORGANIC_MATTER.pdf

Ye Y., Bruning H., Yntema D., Mayer M., Rijnaarts H. (2017): Homogenous photosensitized degradation of pharmaceuticals by using red light LED as light source and methylene blue as photosensitizer. Chemical Engineering Journal, 316, 872-881.
Staženo (září 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.053

Yong Chen, Lu Liu, Jing Su, Jianfeng Liang, Bo Wu, Jiaolan Zuo, Yuegang Zuo (2017): Role of humic substances in the photodegradation of naproxen under simulated sunlight. Chemosphere, 187, 261-267.
Staženo (prosinec 2022) z: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.110