

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Lucie Bíšková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

In vitro kožní penetrace – vývoj testovací metody

Lucie Bíšková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Bíšková**
Osobní číslo: **C18506**
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**
Téma práce: **In vitro kožní penetrace – vývoj testovací metody**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte krátkou literární rešerši na téma in vitro test kožní penetrace se zaměřením na parametry ovlivňující vlastní testování. Pozornost zaměřte na modely kůže, použité cely, způsoby aplikace testované látky a míchání akceptorové kapaliny.
2. Proveďte validaci analytické metody pro stanovení kyseliny benzoové v akceptorové kapalině. Ověřte provedením testu absorpce na prasečí kůži a umělé membráně Strat-M průnik kyseliny benzoové do akceptorové kapaliny za různých podmínek testu (jako je např. různá rychlost míchání, použitá cela, způsob aplikace, vliv teploty).
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, proveďte jejich diskusi a porovnejte výhody a nevýhody obou modelů (prasečí kůže, Strat-M membrána).
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 „Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu“ v platném znění

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant diplomové práce: **Dr. Ing. Zora Nývltová**
VÚOS
Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 5. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.5.2020

Bc. Lucie Bíšková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Zoře Nývltové, Dr. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při zpracování diplomové práce ve VUOS. Těž děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. za rady a věcné připomínky. Děkuji MUDr. Lence Kotingové, Ph.D. za cenné rady do začátku práce s *in vitro* metodikou.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá vývojem metody *in vitro* kožní penetrace a sledováním kvantitativní absorpce kyseliny benzoové přes syntetickou membránu Strat-M a prasečí kůže. Testování probíhalo na vertikálních difuzních celách s upevněním kožního modelu pomocí kovových klem a na celách se šroubením. Byla sledována absorpce kyseliny benzoové za různých podmínek testování. Testována byla např. rychlost míchání, vliv teploty, vliv použitých cel a způsob aplikace. V práci bylo provedeno srovnání obou použitých kožních modelů. Odebrané vzorky kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detektorem diodového pole (DAD). Součástí práce byla i validace použité HPLC metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

penetrace, kůže, vývoj metody, kyselina benzoová, prasečí kůže, Strat-M

TITLE

In vitro skin penetration – development of testing method

ANNOTATION

The diploma thesis deals with development of an *in vitro* skin penetration method and the monitoring of quantitative absorption of benzoic acid through the Strat-M synthetic membrane and a pig skin. Testing was performed on vertical diffusion cells using skin model and metal clamps and/or cells with screwing. The absorption of benzoic acid was monitored under various experimental conditions as, for example, the stirring rate, the effect of temperature, the effect of the cells used and the method of application. A comparison of both skin models used was performed in the work. Samples of benzoic acid in saline were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). Validation of the HPLC method applied also involved.

KEYWORDS

penetration, skin, development of method, benzoic acid, porcine skin, Strat-M

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	12
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM GRAFŮ.....	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	15
ÚVOD	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Princip <i>in vitro</i> metodiky.....	17
1.2 Difuzní cely a jejich použití	17
1.3 Kožní modely	18
1.3.1 Lidská a prasečí kůže	19
1.3.2 Membrána Strat-M.....	20
1.3.3 Rekonstruované modely kůže	21
1.4 Volba důležitých parametrů při pokusu	21
1.4.1 Teplota.....	21
1.4.2 Míchání	22
1.4.3 Způsoby aplikace testované látky	22
1.4.4 Odběr vzorku a frekvence vzorkování	24
1.4.5 Receptorové médium	24
1.4.6 Donorové médium a akceleranty	24
1.4.7 Okluze	25
1.5 Referenční chemikálie	25
1.6 Validace HPLC metod.....	26
1.6.1 Linearita	26
1.6.2 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).....	27
1.6.3 Správnost metody.....	27
1.6.4 Opakovatelnost nástřiku.....	27

1.6.5	Robustnost.....	27
1.6.6	Stabilita	27
1.6.7	Přesnost	27
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
2.1	Přístroje a zařízení	28
2.1.1	Kapalinový chromatograf.....	28
2.1.2	Vyhřívaný blok	28
2.1.3	Vertikální difuzní cely.....	29
2.1.4	Další zařízení a pomůcky	31
2.2	Použité kožní modely	33
2.2.1	Membrána Strat-M	33
2.2.2	Prasečí kůže.....	33
2.3	Použité chemikálie	34
2.4	Použité výpočetní vzorce.....	34
2.5	Validace analytické metody HPLC – kyselina benzoová.....	34
2.5.1	Podmínky chromatografické metody	34
2.5.2	Příprava roztoků	35
2.5.3	Parametry validace	37
2.6	Zkouška penetrace kůže	38
2.6.1	Příprava roztoků	38
2.6.2	Příprava difuzních cel před testováním.....	38
2.6.3	Průběh pokusů.....	39
2.6.4	Ověření vhodné rychlosti míchání	39
2.6.5	Vliv máčení Strat-M před pokusem na protékání cel.....	40
2.6.6	Vliv teploty doplňovaného receptorového média po odběru vzorku	40
2.6.7	Opakovatelnost metody.....	41
2.6.8	Pokus penetrace přes prasečí kůži na celách se šroubením.....	41

2.6.9	Porovnání způsobů aplikace testované látky.....	41
2.6.10	Stanovení přesnosti odběru vzorků injekční stříkačkou.....	41
2.6.11	Stanovení rozpustnosti kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku	42
3	VÝSLEDKY	44
3.1	Vyhodnocení validace analytické metody HPLC – kyselina benzoová.....	44
3.1.1	Chromatografický záznam	44
3.1.2	Linearita	44
3.1.3	Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ)	45
3.1.4	Opakovatelnost nástřiku.....	47
3.1.5	Přesnost a správnost metody	47
3.1.6	Robustnost.....	48
3.1.7	Stabilita	49
3.1.8	Souhrn výsledků validace analytické metody	50
3.2	Zkouška penetrace kyseliny benzoové	51
3.2.1	Ověření vhodné rychlosti míchání	51
3.2.2	Vliv máčení Strat-M před pokusem	52
3.2.3	Vliv teploty doplňovaného receptorového média po odběru vzorku	52
3.2.4	Opakovatelnost metody penetrace přes membránu Strat-M	53
3.2.5	Penetrace přes prasečí kůži na celách se šroubením	54
3.2.6	Penetrace přes Strat-M na celách se šroubením.....	56
3.2.7	Vliv skladování prasečí kůže na penetraci kyseliny benzoové	56
3.2.8	Porovnání způsobů aplikace testované látky na Strat-M	57
3.2.9	Porovnání membrány Strat-M a prasečí kůže	57
3.2.10	Stanovení přesnosti odběru vzorků injekční stříkačkou.....	57
3.2.11	Stanovení rozpustnosti kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku	58
4	DISKUZE.....	61
5	ZÁVĚR	64

6	POUŽITÁ LITERATURA.....	66
7	PŘÍLOHY	71

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Statická vertikální difuzní cela temperovaná cirkulací ohřáté vody [8].....	18
Obrázek 2 – Prostup látky kůží [10]	19
Obrázek 3 – Struktura membrány Strat-M [15]	21
Obrázek 4 – Absorpční profil – nekonečná dávka [22]	23
Obrázek 5 – Absorpční profil – konečná dávka [22]	24
Obrázek 6 – Kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2.....	28
Obrázek 7 – Vyhřívavý blok s vertikálními difuzními celami.....	28
Obrázek 8 – Vertikální difuzní cela s kovovou klemou (Copley Scientific).....	29
Obrázek 9 – Vertikální difuzní cela se šroubením (Copley Scientific)	30
Obrázek 10 – Rozměry cely (Copley Scientific)	31
Obrázek 11 – Raznice	31
Obrázek 12 – Injekční stříkačka s jehlou	32
Obrázek 13 – Teploměr s povrchovou sondou	32
Obrázek 14 – Prasečí kůže z břicha	33
Obrázek 15 – Chromatogram – kyselina benzoová 10 mg/l (RT 1,78 min).....	44
Obrázek 16 – Kožní preparáty z prasečího břicha upnuté do donorové šroubovací části cely (po pokusu č.8).....	55
Obrázek 17 – Kožní preparáty z prasečího břicha po pokusu č.8.....	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Rozdělovací koeficienty K_{ow} [28]	26
Tabulka 2 - Parametry použitých VDC.....	30
Tabulka 3 - Podmínky chromatografické metody – stanovení kyseliny benzoové	35
Tabulka 4 - Příprava roztoků pro linearitu (kyselina benzoová) – 0,5 – 50 mg/l	36
Tabulka 5 - Příprava roztoků pro linearitu (kyselina benzoová) – 0,01 – 10 mg/l	36
Tabulka 6 - Příprava roztoků pro validaci.....	36
Tabulka 7 - Podmínky při ověřování vhodné rychlosti míchání.....	40
Tabulka 8 - Konečná a nekonečná dávka.....	41
Tabulka 9 - Vyhodnocení linearity kyseliny benzoové ve FR.....	45
Tabulka 10 – Vyhodnocení šumu fyziologického roztoku z HPLC	46
Tabulka 11 – Výška píku roztoku standardu kyseliny benzoové pro vyhodnocení LOD, LOQ	46
Tabulka 12 - Výsledné hodnoty LOD, LOQ – stanovení kyseliny benzoové	47
Tabulka 13 - Opakovatelnost nástřiku – kyselina benzoová.....	47
Tabulka 14 - Přesnost a správnost – kyselina benzoová ve FR 10 mg/l.....	48
Tabulka 15 - Přesnost a správnost – kyselina benzoová 1 mg/l.....	48
Tabulka 16 - Parametry – stanovení robustnosti (kyselina benzoová)	49
Tabulka 17 - Kombinační tabulka pro stanovení robustnosti (kyselina benzoová).....	49
Tabulka 18 - Vyhodnocení robustnosti s pomocí softwaru EffiValidation	49
Tabulka 19 – Závislost plochy píku kys. benzoové ve FR na čase pro 10 mg/l.....	50
Tabulka 20 - Závislost plochy píku kys. benzoové ve FR na čase pro 0,1 mg/l.....	50
Tabulka 21 - Výsledky validace kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku.....	51
Tabulka 22 - Vliv rychlosti míchání na lag time a flux	52
Tabulka 23 - Opakovatelnost metody penetrace přes membránu Strat-M.....	53
Tabulka 24 – Závislost lag time a flux na stáří prasečí kůže	56
Tabulka 25 – Závislost hmotnosti odběrů na použité injekční stříkačce	58
Tabulka 26 - Schéma předběžného testu.....	58
Tabulka 27 - Analýza odběrů při předběžné zkoušce – pokus 1.....	59
Tabulka 28 - Schéma baňkové metody	59
Tabulka 29 - Výsledky rozpustnosti kyseliny benzoové ve FR.....	60
Tabulka 30 - Porovnání výsledků s publikací	62

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Lineární závislost – kyselina benzoová ve FR 0,5 – 50 mg/l.....	44
Graf 2 - Lineární závislost – kyselina benzoová ve FR 0,01 – 10 mg/l.....	45
Graf 3 - Porovnání vlivu rychlosti míchání.....	52
Graf 4 - Opakovatelnost metody penetrace přes Strat-M.....	54
Graf 5 – Absorpční profil kys. benzoové pro prasečí kůži v závislosti na stáří kůže	56
Graf 6 - Porovnání konečné a nekonečné dávky	57

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CS	Calibration solution (kalibrační roztok)
DAD	Diod array detector (detektor diodového pole)
FR	Fyziologický roztok
HPLC	High performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
LOD	Limit of detection (mez detekce)
LOQ	Limit of quantification (mez stanovitelnosti)
MF	Mobilní fáze
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
RPM	Revolutions per minute (otáčky za minutu)
RT	Retention time (retenční čas)
S	Solution (roztok)
SS	Stock solution (zásobní roztok)
UPW	Ultrapure water (ultračistá voda)
USP	United States Pharmacopeia (Lékopis Spojených států amerických)
VDC	Vertikální difuzní cela

ÚVOD

In vitro kožní penetrace je alternativní test toxicity hodnotící transdermální přenos chemických látek. Při testování je sledována kvantitativní absorpce s použitím různých modelů kůže.

Metoda *in vitro* nachází využití při testování kosmetických produktů a farmaceutických přípravků. Testování transdermálního přenosu chemických látek je využíváno také při analýzách expozice chemickým látkám v pracovním prostředí [1][2].

Vývoj a validace *in vitro* metod kožní penetrace je v posledních letech na vzestupu. Snahou je regulovat testování chemických látek na zvířatech a nahrazovat *in vivo* metody alternativními testy toxicity *in vitro*. Příkladem je Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích z roku 2009. Nařízení ukládá zákaz testování kosmetických přípravků na zvířatech. Testování na zvířatech musí být nahrazeno validovanou alternativní metodou *in vitro* [3].

Pro prokázání spolehlivosti metody *in vitro* kožní penetrace jsou dle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) [4] doporučovány referenční látky s různou polaritou. Výhodou použití těchto látek je možnost porovnání vlastních výsledků s publikacemi. V této práci byla jako referenční látka použita kyselina benzoová. Výsledky pokusů byly porovnávány s výsledky mezilaboratorního testu evropských laboratoří, které byly publikovány v publikaci van de Sandt [5].

Cílem diplomové práce bylo provést validaci analytické metody pro stanovení kyseliny benzoové. Tato metoda byla využívána pro analýzu vzorků kyseliny benzoové v receptorovém médiu, které byly odebírány při pokusech *in vitro* kožní absorpce. Pokusy absorpce kyseliny benzoové byly provedeny na prasečí kůži a umělé membráně Strat-M za různých podmínek testu a na základě výsledků těchto experimentů byly zvoleny vhodné podmínky testu a byly porovnány výhody a nevýhody použitých kožních modelů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Princip *in vitro* metodiky

In vitro kožní penetrace je alternativní test toxicity, při kterém se sleduje prostup testované látky přes lidskou kůži, zvířecí kůži nebo syntetickou membránu do receptorového média. V praxi je testovaná látka aplikována na povrch kožního modelu, který je umístěn mezi donorovou a receptorovou část difuzní cely. Testovaná látka proniká za daných podmínek skrz kožní model do receptorového média. Receptorové médium je během pokusu průběžně v přesných časech vzorkováno a analyzováno na obsah testované látky. Výsledkem je absorpční křivka, tj. množství difundované testované látky přes kožní model v závislosti na čase. Po testu lze provést i extrakci testované látky z kůže a na základě těchto výsledků získat celkovou bilanci množství testované látky, která byla na kůži aplikována [4][6].

1.2 Difuzní cely a jejich použití

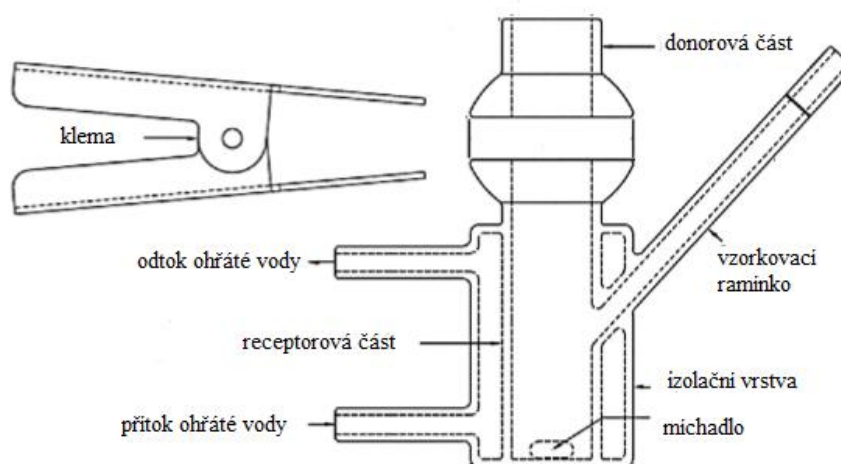
Pro testování *in vitro* kožní penetrace jsou používány difuzní cely, které se skládají z donorové a receptorové části, mezi které je upevněn kožní model. Kožní model může být upevněn klemou nebo může být použita cela se šroubením. Cely jsou nejčastěji vyráběny z borosilikátového skla. K výrobě může být použit i jiný materiál, ale je důležité, aby nereagoval s testovanou látkou nebo nedocházelo k její absorpci či adsorpci na použitý materiál. Důležitá je teplota cel na konstantní teplotu a míchání v průběhu celého pokusu. Teplotu a míchání zajišťuje termoblok nebo vodní lázeň, umístěna na magnetickém míchadle. Teplota může být také zajištěna cirkulací ohřáté vody v izolační vrstvě okolo cely. Cely mohou být statické nebo průtočné [4][7].

Průtočné cely

Na průtočné cely je napojeno čerpadlo, díky kterému receptorové médium celou protéká danou rychlostí a je neustále nahrazováno čerstvým. To je výhodné pro látky s nízkou rozpustností v receptorovém médiu, protože neustále se obnovující receptorové médium maximálně zajišťuje tzv. *sink conditions*, kdy v receptorovém médiu nesmí vzniknout nasycený roztok difundované látky, který by zastavil další difuzi. Průtočné cely napodobují chování v systému *in vivo*, kde krev v krevním oběhu také neustále cirkuluje a odplavuje s sebou absorbované látky. Odebrané médium je vzorkováno do odběrných nádobek a analyzováno [7][8].

Statické difuzní cely

Statické vertikální difuzní cely (Obrázek 1), nazývány také jako Franzovy cely podle svého vynálezce, se skládají z donorové a receptorové části, které musí být temperovány a receptorové médium musí být mícháno na magnetickém míchadle. Odběr vzorků probíhá manuálně v předem definovaných časových intervalech přes vzorkovací ramínko. Po odběru je do cely doplňován stejný objem čerstvého receptorového média. Objem a časové rozložení odběrů je důležité navrhnout tak, aby byly po celou dobu pokusu zajištěny tzv. *sink conditions* [7][8].

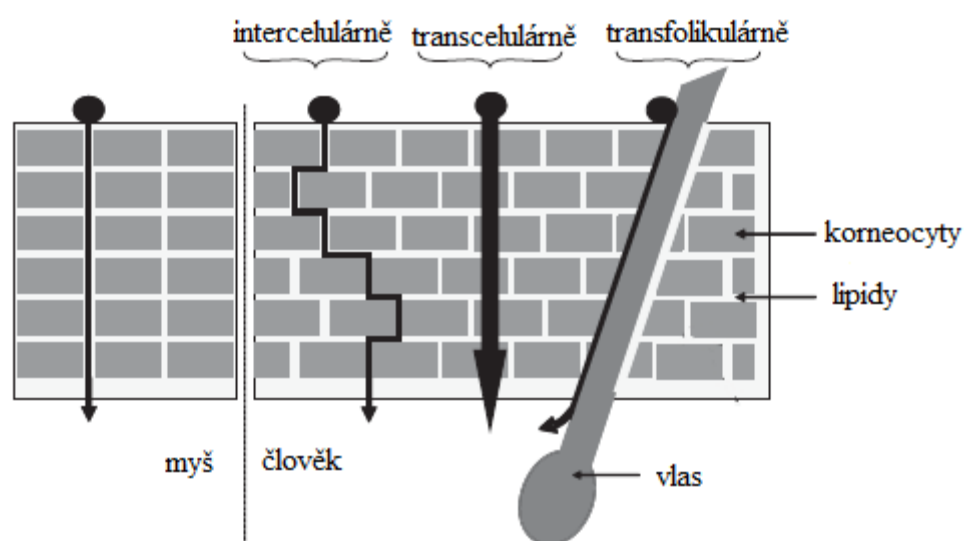


Obrázek 1 – Statická vertikální difuzní cely temperovaná cirkulací ohřáté vody [7]

1.3 Kožní modely

Kožní model používaný pro *in vitro* metody může být lidská kůže, zvířecí kůže nebo syntetická membrána. Cílem většiny studií je zjistit absorpci látek u lidí, proto je lidská kůže preferována. Vzhledem k obtížné dostupnosti lidské kůže lze využívat i zvířecí kožní modely. Jako nejvhodnější alternativa lidské kůže se doporučuje kůže prasečí, která má podobnou morfologii a propustnost. Kůže z dalších dostupných druhů zvířat (například z myši nebo potkana) je obecně propustnější než kůže lidská a tento fakt může zkreslovat výsledky testování. Vyšší propustnost je způsobena rozdílným uspořádáním korneocytů ve *stratum corneum* do vrstev. Myš má korneocyty uspořádány do sloupců, které umožňují testované látky difuzi kratší cestou. U kůže lidské jsou korneocyty uspořádány v systému, který připomíná zeď z cihel a korneocyty jsou obklopeny lipidy. Kvůli tomuto systému testovaná látka difunduje složitější delší cestou. Tento způsob prostupu látky difuzí je

nazýván jako intercelulární (mezibuněčnými prostory). Další možností je i transcelulární vstup látky skrz korneocyty i lipidy. Většina látek prochází intercelulární cestou v kombinaci s transfolikulárním vstupem, tj. vlasovými folikuly, mazovými žlázami nebo potními kanály (Obrázek 2). Lipofilní látky penetrují do kůže snadněji než látky hydrofilní. Hydrofilní látky mají větší tendenci pronikat do kůže transfolikulárním vstupem. Tzv. *Daltonovo pravidlo* říká, že kožní absorpce jsou schopny pouze látky s molekulovou hmotností menší než 500 Da. Látky s většími molekulami absorbují do zdravé kůže velmi obtížně. Výjimkou z Daltonova pravidla jsou kůže s atopickou dermatitidou nebo sliznice, kam mohou snadno penetrovat i větší molekuly [9][10].



Obrázek 2 – Prostup látky kůží [9]

Alternativou kůže mohou být syntetické membrány. Membrána Strat-M má simulovat lidskou kůži. Další alternativou mohou být rekonstruované modely kůže připravené z lidských buněk v kombinaci se syntetickou maticí. Tyto modely jsou běžně využívány pro testování např. kožní dráždivosti. Pro testování kožní absorpce nejsou doporučovány z důvodu nedostatečné ochranné funkce, jakou má kůže [1][2][11].

1.3.1 Lidská a prasečí kůže

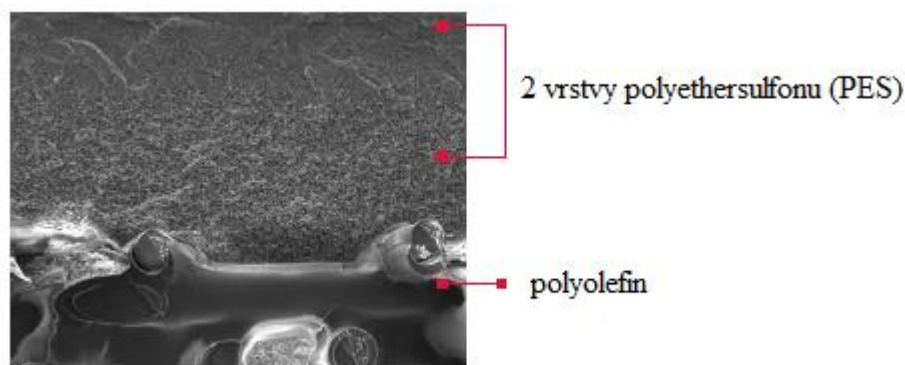
Kůže může být použita jako tzv. plná kůže, kde je z kůže odstraněn pouze podkožní tuk, nebo může být před testováním dále upravována. Kůže může být dermatomována (obvykle na tloušťku 200-400 μm) nebo může být použita pouze epidermální membrána, která je od zbytku kůže oddělena enzymaticky, tepelně nebo chemicky. Manipulace s kůží musí být opatrná, aby nedošlo k jejímu poškození. Jestli nedošlo k většímu poškození kůže můžeme

zjistit vizuální kontrolou. Pro kontrolu integrity kůže se využívají techniky TEWL (transepidermální ztráta vody), TEER (transepidermální elektrická rezistence) nebo TWF (tok tritiové vody). Měřením těchto hodnot můžeme zjistit, zda nebyla porušena ochranná funkce kůže. Čerstvou kůži je doporučeno použít do 24 hodin od odběru. Kožní preparáty lze i mrazit při -20 °C, doporučuje se však nejdéle po dobu 1 roku. Při skladování v této teplotě kůže vykazuje obdobné výsledky jako kůže čerstvá. Při pokusech zmrazení kůže na -80 °C bylo pozorováno její poškození mrazem. Kůži skladovanou v mrazu není vhodné používat pro studium metabolismu [1][4][12][13].

Zdrojem lidské kůže mohou být dárci, kteří podstupují plastickou operaci. Prasečí kůže mohou být získávány z jatek. Preparáty z lidské i prasečí kůže jsou i komerčně dostupné např. u firmy Essence Line, ale cena těchto preparátů je vysoká.

1.3.2 Membrána Strat-M

Membrána Strat-M (Merck, EMD Millipore) je syntetická membrána (Obrázek 3) vyvinutá tak, aby co nejpřesněji simulovala lidskou kůži a mohla tak nahradit lidské kožní preparáty při *in vitro* testování kožní penetrace. Tloušťka membrány je 300 µm. Tenká svrchní vrstva napodobující *stratum corneum* (rohová vrstva – svrchní vrstva pokožky) je nesena dvěma vrstvami porézního polyethersulfonu (PES). PES napodobuje *dermis* (škáru) v lidské kůži. Tyto vrstvy jsou nanášeny na vrstvě polyolefinu, jehož nosičem je netkaná textilie. Tato vrstva má porézní strukturu se sklonem k vyšší propustnosti. Póry jsou impregnovány směsí lipidů (ceramidy, cholesterol, volné mastné kyseliny a další) ve specifickém poměru tak, aby se vlastnosti membrány přibližovaly vlastnostem lidské kůže. Díky tomu, že je membrána vyrobena synteticky, zajišťuje vyšší reprodukovatelnost testování. Vylučuje se tak vysoká variabilita u kůže způsobená např. různou tloušťkou kůže, různou hustotou ochlupení, podmínkami skladování nebo poškozením kůže [14][15]. Nízké variability a vysoké reprodukovatelnosti při použití Strat-M je výhodné využívat i při kontrole kvality pro porovnávání jednotlivých šarží léčivých přípravků ve farmaceutickém průmyslu [16]. Výrobce uvádí, že membránu není nutno před použitím namáčet. Na rozdíl od ostatních membrán, které by měly být před použitím kondicionovány nejméně 30 minut v receptorovém médiu [7].



Obrázek 3 – Struktura membrány Strat-M [14]

1.3.3 Rekonstruované modely kůže

Základem těchto modelů je polymerní matrice, na kterou jsou nanášeny vrstvy lidských buněk. Na matrici mohou být nanášeny různé typy buněk podle požadovaného složení kožního modelu. Většina těchto modelů je konstruována tak, aby napodobovala lidskou epidermis nebo plnou lidskou kůži. Komerčně dostupné produkty napodobující lidskou epidermis jsou např. EpiSkin a SkinEthnic. Z produktů napodobujících plnou lidskou kůži to jsou např. T-Skin Full Thickness Skin model [17][18].

V roce 2013 začala OECD tolerovat rekonstruované kožní modely pro testování akutní kožní dráždivosti, kožní leptavosti a fototoxicity. Tyto modely zatím nebyly od OECD schváleny pro testování kožní absorpce [18].

1.4 Volba důležitých parametrů při pokusu

Metodu *in vitro* kožní absorpce ovlivňuje mnoho faktorů, kterými jsou např. teplota, rychlost míchání u statické difuzní cely, popřípadě rychlost průtoku u cely průtočné, frekvence odebírání vzorků, volba donorového a receptorového média i rozpustnost testované látky v médiích. Testování vyžaduje trénink a zkušenosti obsluhy, které mohou zajistit výrazně lepší reprodukovatelnost metody. Důležitá je také volba kožního modelu. Syntetické membrány eliminují variabilitu kůže způsobenou např. různou tloušťkou kůže, věkem dárce, pohlavím nebo skladováním kůže [19].

1.4.1 Teplota

Teplota je důležitý parametr, který ovlivňuje pasivní difuzi chemických látek přes kožní model. Proto je důležité udržovat konstantní teplotu během celého pokusu. Metodika OECD i USP doporučují udržovat běžnou teplotu lidské kůže 32 ± 1 °C. V případě testování vaginálních léčivých přípravků by měla být použita teplota lidského těla 37 ± 1 °C. Teplota

je u většiny systémů udržována vyhřívanou vodní lázní nebo termoblokem. Teplota kůže nebo receptorového média by měla být ověřována vhodným teploměrem [4][7][20].

1.4.2 Míchání

Optimální rychlost míchání receptorového média je stěžejní parametr při validaci statických difuzních cel. Míchání ovlivňuje distribuci difundované látky v receptorovém médiu. Pokud je zvolena nízká rychlost míchání, difundovaná látka se mezi odběry nestihne dostatečně rozptýlit v receptorovém médiu a při odběru mohou být stanoveny falešně pozitivní nebo negativní výsledky koncentrace difundované látky. Rychlost míchání nesmí být natolik vysoká, aby způsobovala vír receptorového média v cele. Vír je nežádoucí, protože rozrušuje hladinu receptorového média, která musí být při difuzi v kontaktu s membránou. Jako optimální je volena nejvyšší rychlost míchání, při které ještě není tvořen vír. Rychlost míchání je důležitý parametr, který je třeba před testováním ověřit. U každého typu cely se může rychlost míchání lišit v závislosti na jejím tvaru a rozměrech cely i na rozměrech míchadla [19]. Lékopis Spojených států amerických (USP) <1724> doporučuje 600 rpm [7].

1.4.3 Způsoby aplikace testované látky

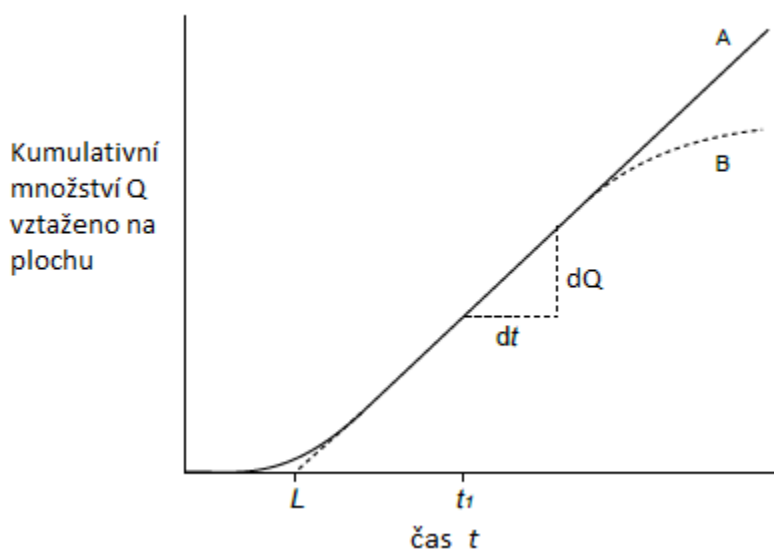
Testovaná látka může být na kožní preparát aplikována jako tzv. dávka konečná nebo dávka nekonečná. Typ dávkování je volen tak, aby co nejpřesněji simuloval reálné podmínky při možné expozici látky nebo přípravku.

Nekonečná dávka (infinite dose) obsahuje takové množství látky, aby po dosažení maximální rychlosti absorpce tato rychlost dále do konce pokusu setrvala. Maximální absorpční rychlost (flux nebo tok) udává množství látky, které projde jednotkou plochy za čas.

Látka je aplikována v nadbytku a množství látky není do konce pokusu z donoru vyčerpáno. Doporučená aplikace testované látky je více než 10 mg/cm² nebo 100 µl/cm² pro kapalnou látku [20].

Nekonečná dávka může simulovat expozici chemickým látkám, které jsou přidávány do bazénů nebo do koupelí. Nekonečné dávky těchto látek je pak vystaven celý povrch těla [1]. Na Obrázku 4 je uveden absorpční profil – závislost kumulativního množství látky vztaženého na plochu v závislosti na čase. Bod L, zjištěný na základě zpětné extrapolace lineární části křivky, udává hodnotu lag time. Lag time (doba zpoždění) je hodnota času a udává, kdy začne v receptorovém médiu (u živého organismu v krevním oběhu nebo v lymfatickém systému) exponenciálně růst koncentrace látky prošlé skrz preparát (kůži).

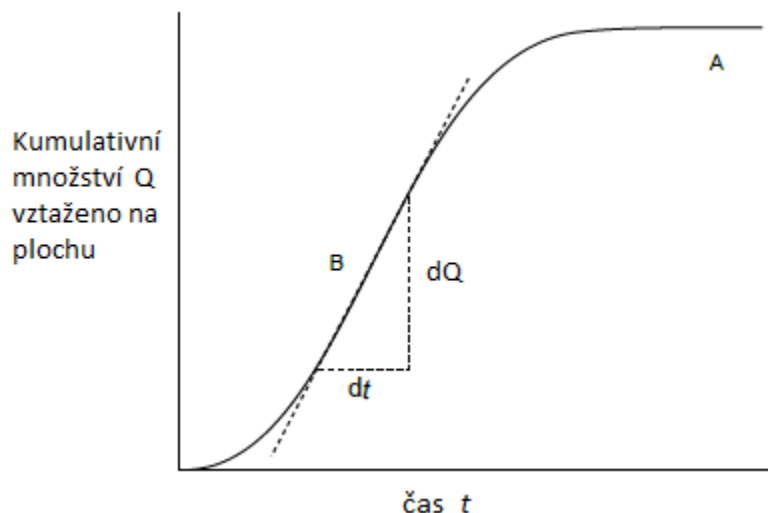
Lineární část grafu představuje ustálený tok, tzv. steady-state flux. Křivka B v grafu ukazuje odchylku od maximální rychlosti absorpce na konci pokusu. Tato situace může nastat vlivem deplece látky v donoru při dlouhodobém pokusu, kdy je vyčerpána látka i z tzv. nekonečné dávky. Tato situace může vzniknout i při nedodržení tzv. *sink conditions*, kdy v receptorovém médiu vznikne nasycený roztok látky a difuze se zastaví. Proto by měla být rozpustnost látky v receptorovém médiu co nejvyšší. Koncentrace testované látky by měla být v receptorovém médiu během pokusu udržována co nejnižší. Doporučení je dosáhnout při pokusu v receptorovém médiu maximální koncentrace odpovídající 10% rozpustnosti testované látky v receptorovém médiu [19]. Pro zachování tzv. *sink conditions* je tedy důležitá rozpustnost látky v receptorovém médiu, objem receptorové části cely, objem a frekvence vzorkování u statické difuzní cely a rychlost průtoku receptorového média u průtočné cely [7][21][22][23].



Obrázek 4 – Absorpční profil – nekonečná dávka [21]

U konečné dávky (finite dose) je na preparát aplikováno menší množství látky. Během pokusu s konečnou dávkou je dosaženo maximální rychlosti absorpce v určitém časovém intervalu. Následně dochází k depleci testované látky v donoru vlivem prostupu látky do kůže a receptorového média (Obrázek 5). Částečně může docházet také k odpaření látky při pokusu bez okluze. U pokusu s konečnou dávkou lze kromě fluxu z výsledných dat vyhodnotit i celkovou absorpci látky na konci pokusu v procentech. Doporučuje se aplikovat množství do 1-5 mg/cm² nebo 10 µl/cm² látky na preparát [1][2][24].

Konečná dávka bez okluze nejlépe simuluje většinu běžných expozičních scénářů, které se vyskytují v praxi.



Obrázek 5 – Absorpční profil – konečná dávka [21]

1.4.4 Odběr vzorku a frekvence vzorkování

Vzorky by měly být z cely odebírány v přesně definovaných časech s tolerancí ± 2 minuty. Po odběru vzorku se cela doplňuje stejným objemem čerstvého receptorového média. Při doplňování receptorového média je nutné se ujistit, zda v cele nejsou vzduchové bubliny, které by narušovaly difuzi látky do receptorového média [7].

Vhodně zvolená frekvence vzorkování je důležitá kvůli zachování tzv. *sink conditions* během celého pokusu. Běžně se vzorkuje po dobu 24 hodin. Pro látky, které difundují pomaleji je možno expoziční čas prodloužit. Naopak pro látky rychle difundující je možno ho zkrátit. Frekvence vzorkování by měla poskytnout absorpční profil v průběhu celého expozičního času [4][7].

1.4.5 Receptorové médium

Receptorové médium musí mít vždy přesně definované složení a testovaná látka v něm musí mít dostatečnou rozpustnost. Malá rozpustnost v médiu by mohla zabraňovat absorpci látky z donoru. Receptorové médium by nemělo narušovat integritu použitého kožního modelu. Pro hydrofilní látky se využívá fyziologický roztok chloridu sodného pH 7. Při testování lipofilních látek je nutno do roztoku přidávat látky, které zvýší jejich prostup do receptorového média. Příkladem je využití 50% ethanolu, < 6% polyoxyethylene (20) oleyl etheru, 20% polyetheru nebo přídavku 5% hovězího sérového albuminu (BSA) [4][21][24].

1.4.6 Donorové médium a akceleranty

Testovaná látka nebo přípravek mohou být nanášeny na kožní model v čisté formě nebo jako zředěné. Forma aplikace by ale měla být stejná nebo co nejvíce obdobná reálnému scénáři,

jakému mohou být vystaveni cílové skupiny (lidé používající kosmetický nebo léčivý přípravek, pracovníci v jejich pracovním prostředí atd.). Donorové médium se používá na rozpouštění pevných testovaných látek a na ředění testovaných látek či přípravků [4].

Léčivé přípravky aplikované na kůži mohou cíleně obsahovat látky, které penetrují do kůže a dočasně narušují ochrannou strukturu kůže. Tím urychlují difuzi účinné látky z přípravku do tělního oběhu. Tyto látky jsou nazývány jako akceleranty penetrace nebo také urychlovače kožní absorpce. Důležité je, aby tyto látky nebyly toxické a dráždivé. Neměly by mít schopnost se vázat na receptory v těle nebo mít jiný farmakologický účinek. Měly by se vyplavovat z kůže, aby se ochranná bariéra kůže vrátila zcela a co nejrychleji do původního stavu [25].

Některé akceleranty rozrušují lipidovou strukturu kožní vrstvy *stratum corneum*. Tyto látky vytváří mikrodutiny v lipidové dvojvrstvě a urychlují prostup molekul skrz kůži. Základem molekul těchto akceleraantů je polární skupina, na kterou je navázán dlouhý alkylový řetězec. Tyto akceleranty jsou efektivní hlavně pro prostup hydrofilních látek, ale urychlují prostup i látek lipofilních. Do této skupiny patří např. laurocapram, mastné kyseliny a terpeny. Rozrušovat lipidy mohou i některá rozpouštědla, jako dimethylsulfoxid (DMSO) nebo alkoholy. Ty rozrušují lipidy ve *stratum corneum*, vytváří vodné kanály a tím urychlují prostup látek. Některé akceleranty mohou interagovat a vázat se na keratin obsažený v korneocytech. Tento jev, který může také zvyšovat propustnost kůže, způsobují povrchově aktivní látky, močovina, decylmethylsulfoxid i DMSO [26].

1.4.7 Okluze

Rozhodnutí o testování s okluzí nebo bez okluze závisí na vlastnostech testované látky (např. na těkavosti) a na expozičním scénáři. U většiny případů expozičních (např. pesticidům nebo u expozičních v chemickém průmyslu) je aplikována konečná dávka a okluze není vyžadována. Testování s okluzí je vyžadováno u aplikace nekonečné dávky a ve specifických případech, jako je kontaminace kůže pod rukavicemi nebo potřísněné oblečení např. pesticidy u pracovníka na poli [4][24].

1.5 Referenční chemikálie

Aby byla prokázána spolehlivost metody penetrace kůže *in vitro*, doporučuje OECD otestovat konkrétní systém na referenčních chemikáliích. Jako referenční chemikálie OECD doporučuje kofein, kyselinu benzoovou a testosteron. Výhodou těchto chemikálií je, že data o jejich penetraci kůží jsou již publikována a je možnost vlastní výsledky s těmi

publikovanými porovnat. Zároveň jsou to látky s různou polaritou, která je zde vyjádřena tzv. *rozdělovacím koeficientem* K_{ow} definovaným jako podíl koncentrace látky v n-oktanolu a ve vodě v rovnovážném stavu (Tabulka 1). Logaritmus K_{ow} je nepřímo úměrný rozpustnosti ve vodě. Nejvíce lipofilní je testosteron. U testování lipofilních látek jako je testosteron se do receptorového média přidávají látky, které zvýší rozpustnost lipofilní látky v receptorovém médiu (např. BSA do fyziologického roztoku). Výhodné je otestovat systém na referenční látce, která je polaritou nejbližší testovanému vzorku [4][5][27].

Tabulka 1 - Rozdělovací koeficienty K_{ow} [27]

látka	kofein	kyselina benzoová	testosteron
log K_{ow}	-0,07	1,88	3,32

Jako referenční chemikálie byla v této práci použita kyselina benzoová. Kyselina benzoová je bílá krystalická látka. Jedná se o aromatickou karboxylovou kyselinu. Její molekulová hmotnost je 122,1 g/mol. Rozpustnost kyseliny benzoové ve vodě při 25 °C je 3,5 g/l. Hydrofilní povaha kyseliny benzoové by měla omezovat zadržování kyseliny benzoové v kůži, která je lipofilní povahy. Kyselina benzoová se používá jako konzervační prostředek v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. V potravinářství má označení E210. Kyselina benzoová a její estery jsou velmi rozšířené v mnoha rostlinách [29][30][31].

1.6 Validace HPLC metod

Validace metody je postup, při kterém se ověřuje, zda je metoda vhodná pro zamýšlené použití. Vhodnost je ověřována na základě splnění předem vybraných validačních parametrů [32].

1.6.1 Linearita

Linearita je vyhodnocována z grafu lineární závislosti mezi analytickým signálem (u HPLC plocha píku) a koncentrací analytu [33]. Linearitu přímky popisuje rovnice regrese. Rovnice regrese je používána pro vyhodnocení koncentrace vzorku metodou kalibrační přímky. K hodnocení linearity je používán koeficient determinace R^2 , který nabývá hodnot od nuly do jedné. Pokud se R^2 blíží k jedné, lze dle rovnice regrese určit z hodnoty analytického signálu hodnotu koncentrace.

1.6.2 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez detekce LOD (Limit of Detection) je nejnižší možná koncentrace analytu, která ještě může být použitou analytickou metodou detekována. Mez detekce je vyjadřována jako trojnásobek poměru signálu analytu a šumu základní linie (S/N).

Mez stanovitelnosti LOQ (Limit of Quantification) je nejnižší možná koncentrace analytu, která může být použitou analytickou metodou stanovena. Mez stanovitelnosti je vyjadřována jako desetinásobek poměru signálu analytu a šumu základní linie (S/N) [34].

1.6.3 Správnost metody

Správnost je definována jako stupeň shody mezi hodnotou naměřenou a hodnotou skutečnou. Je vyhodnocována z naměřených koncentrací analytu ve vzorku danou metodou a ze známých koncentrací analytu ve vzorku, který byl do vzorku přidán. Správnost je vyjadřována procentuálně jako výtěžnost [34].

1.6.4 Opakovatelnost nástřiku

Opakovatelnost nástřiku charakterizuje přesnost systému. Vyjadřuje schopnost za stejných podmínek v krátkém časovém úseku poskytnout opakovatelnou odezvu u několikanásobně nástříknutého vzorku [35]. Je vyhodnocována jako směrodatná odchylka mezi odezvami.

1.6.5 Robustnost

Robustnost vyjadřuje stabilitu systému při malých odchylkách v parametrech metody, které se mohou vyskytnout v reálných podmínkách [35].

1.6.6 Stabilita

Stabilita je parametr, u kterého je sledováno, po jakou dobu zůstává obsah analytu ve vzorku nezměněn. Stabilita je vyhodnocována jako procentuální změna odezvy v daném čase od počáteční odezvy při zahájení stabilitního testu [35].

1.6.7 Přesnost

Přesnost je definována jako stupeň shody mezi naměřenými kvantitativními hodnotami několika jednotlivě připravených vzorků stejným způsobem. Přesnost prokazuje míru opakovatelnosti a reprodukovatelnosti validované metody. Parametr přesnosti zahrnuje vliv náhodných chyb a míru rozptylu mezi naměřenými hodnotami. Je vyhodnocována jako směrodatná odchylka mezi naměřenými hodnotami [35][36].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Kapalinový chromatograf

Pro analýzy vzorků receptorové kapaliny byl použit vysokotlaký kapalinový chromatograf (Obrázek 6).



Obrázek 6 – Kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2

2.1.2 Vyhřívavý blok

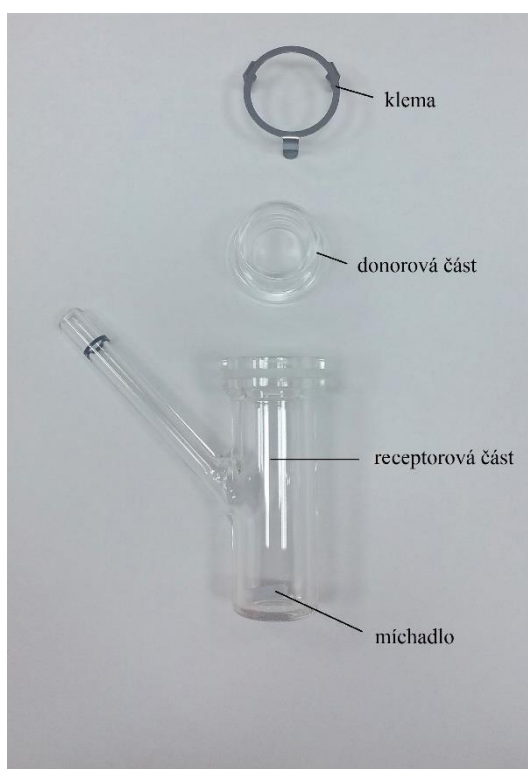
Pro provedení zkoušek penetrace byl použit vyhřívavý blok od firmy Copley Scientific, který zajišťoval udržování teploty a míchání v difuzních celách během testu kožní penetrace (Obrázek 7).



Obrázek 7 – Vyhřívavý blok s vertikálními difuzními celami

2.1.3 Vertikální difuzní cely

Vertikální difuzní cely (VDC) nebo také Francovy difuzní cely se skládají ze dvou částí – donorová část a receptorová část. Do donorové části je aplikována testovaná látka. Do receptorové části difuzní cely se vkládá míchadlo a poté se doplňuje receptorové médium po rysku, která je označena na ramínku. Ramínkem jsou odebírány vzorky receptorového média. Po odběru vzorku je doplněno receptorové médium po rysku. Donorová a receptorová část jsou od sebe odděleny kůží nebo membránou, přes kterou probíhá difuze. Receptorová a donorová část jsou k sobě uchyceny kovovou klemou (Obrázek 8) nebo šroubením (Obrázek 9), dle typu cely. Test může probíhat s otevřenou donorovou částí (bez okluze) nebo s uzavřenou donorovou částí (s okluzí).



Obrázek 8 – Vertikální difuzní cely s kovovou klemou (Copley Scientific)

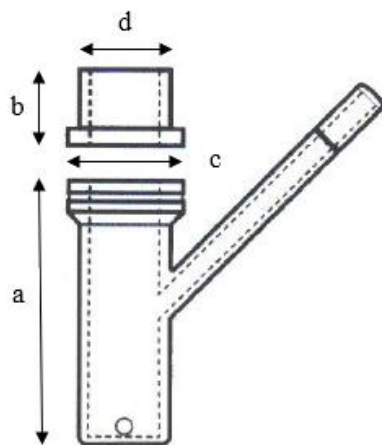
Všechny pokusy v této práci byly prováděny na celách od Copley Scientific. Část pokusů byla provedena na celách s kovovou klemou a část pokusů na celách se šroubením. Cely se šroubením jsou navrženy hlavně pro použití s kůží, která je silnější než používané membrány. Tyto cely jsou variabilnější, protože do nich lze upnout různé tloušťky kůže. Na rozdíl od cel s kovovou klemou, kde musí kovové úchyty klemy přesně zapadnout do zábrusu na donoru cely. A proto je problém silnější kůži do cely kovovou klemou uchytit. Cely mají standardizované rozměry (Tabulka 2, Obrázek 10).



Obrázek 9 – Vertikální difuzní cela se šroubením (Copley Scientific)

Tabulka 2 - Parametry použitých VDC

Označení na Obrázku 10	Parametr	VDC s kovovou klemou [mm]	VDC se šroubením [mm]
a	Výška receptoru	57	57
b	Výška donoru	18	27
c	Vnější průměr (průměr membrány)	25	24
d	Vnitřní průměr (styčná plocha vzorku a membrány)	15	15
-	Styčná plocha cely [cm ²]	1,77	1,77
-	Objem cely (receptoru) [ml]	11	12
-	Míchadlo	13 x 3	13 x 3



Obrázek 10 – Rozměry cely (Copley Scientific)

2.1.4 Další zařízení a pomůcky

Raznice

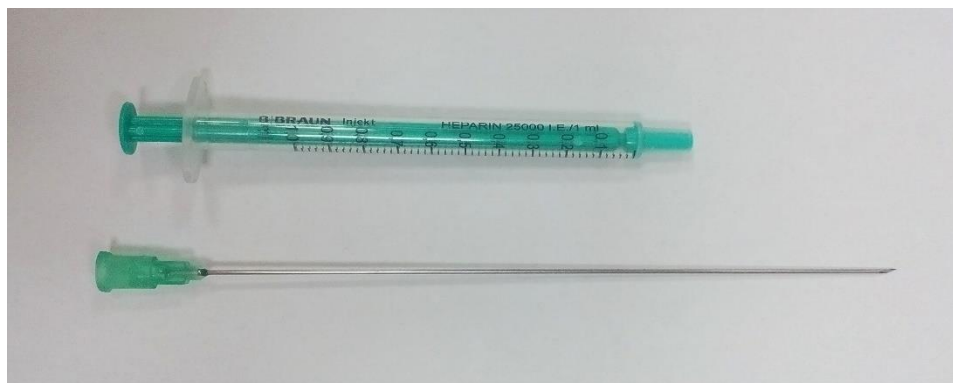
Raznicí byly raženy terče kůže o průměru 25 mm, které byly použité pro testování (Obrázek 11).



Obrázek 11 – Raznice

Injekční stříkačky

K odběrům vzorků byly použity injekční stříkačky B. Braun INJEKT-H 1 ml, heparin 25000 I. E s jehlou B. Braun, Sterican 21 g x 4 3/4", 0,80 x 120 mm (Obrázek 12). Odběr byl prováděn jehlou vždy ze středu receptoru v prostoru nad míchadlem.



Obrázek 12 – Injekční stříkačka s jehlou

Teploměr

Ke kontrole teploty kůže před začátkem pokusu byl využíván kalibrovaný teploměr TESTO 925 s povrchovou sondou (Obrázek 13).



Obrázek 13 – Teploměr s povrchovou sondou

Přístroj na přípravu ultračisté vody (UPW)

Ultračistá voda použitá na přípravu všech roztoků byla upravena pomocí zařízení Select Neptune Ultimate-Purite.

Analytické váhy

Byly použity analytické váhy Mettler-Tolledo XS205DU.

Ultrazvuk

K odplynění médií a mobilních fází byl použit ultrazvuk Bandelin Sonorex RK540.

2.2 Použité kožní modely

2.2.1 Membrána Strat-M

V některých pokusech v této práci byla využita membrána Strat-M. Membrána nemusí být dle pokynů výrobce před použitím hydratována.

2.2.2 Prasečí kůže

V některých pokusech byly využity kožní preparáty připravené z kůže odebrané v oblasti břicha. Kůže byly odebrány třem prasatům v rámci pokusu ve Viváriu FVZ UO HK (projekt MUDr. Pařízka, Ph.D. – prasata byla použita k testování nového způsobu resuscitace). Kůže byla po odběru omyta vodou od zaschlé krve, pomocí skalpelu a pinzety byla zbavena podkožního tuku a poté byly pláty kůže z břicha zabaleny do hliníkové fólie, zamraženy a skladovány při teplotě -20 °C (Obrázek 14). Před pokusem byla kůže pozvolna rozmrazena při laboratorní teplotě cca 60 minut. Poté z ní byly raznicí vyraženy a skalpelem doříznuty kožní preparáty (terče), které byly následně použity pro testování.



Obrázek 14 – Prasečí kůže z břicha

2.3 Použité chemikálie

Chlorid sodný (Lach:ner)

Kyselina trifluoroctová (Sigma Aldrich)

Acetonitril (Fisher-Chemical)

Kyselina benzoová (Sigma Aldrich)

Ethanol (Lach:ner)

Ultračistá voda

2.4 Použité výpočetní vzorce

Vyhodnocení parametrů kožní absorpce (lag time a flux) bylo provedeno pomocí veřejně dostupného softwaru SAMPA [37]. Tento software byl vyvinut na pracovištích Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Do softwaru SAMPA jsou zadávány hodnoty kumulativního množství Q vztaženého na plochu v daném čase odběru x . Parametr kumulativní množství vyjadřuje celkové prošlé množství látky v daném čase a počítá s korekcí úbytku látky v cele při odběrech.

Kumulativní množství v daném čase bylo spočteno dle rovnice (1)

$$Q_x = \frac{1}{S} \{ (V_{\text{cela}} \cdot c_x) + V_{\text{odb}} \sum_{i=1}^{x-1} c_i \} \quad (1)$$

kde Q_x [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] je kumulativní množství v daném odběru x , V_{cela} [l] je objem difuzní cely, V_{odb} [l] je objem jednoho odběru receptorového média z difuzní cely, c_x [$\mu\text{g}/\text{l}$] je koncentrace látky v daném odběru (vypočtena z rovnice regrese kalibrační přímky), c_i [$\mu\text{g}/\text{l}$] je koncentrace látky v prvním odběru receptorového média a S [cm^2] je styčná plocha preparátu a donoru (plocha otvoru donorové části cely).

2.5 Validace analytické metody HPLC – kyselina benzoová

Byla provedena validace metody pro stanovení kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku. Analýza kyseliny benzoové byla prováděna pomocí HPLC s DAD detekcí.

2.5.1 Podmínky chromatografické metody

Podmínky, při kterým byla analyzována kyselina benzoová pomocí HPLC jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 - Podmínky chromatografické metody – stanovení kyseliny benzoové

Parametr	Hodnota
Přístroj	Shimadzu Nexera
HPLC kolona	InertClone 5 µm ODS (2) 150 Å; 150 x 4.6 mm
Průtok MF [ml/min]	1,5
MFA	10 mM TFA / UPW
MFB	10 mM TFA / Acetonitril
Poměr MF A:B	50:50 (isokratika)
Objem nástřiku [µl]	20
Vlnová délka λ [nm]	240
Autosampler [°C]	8
Temperace kolony [°C]	30
Čas analýzy [min]	4
RT (kyselina benzoová) [min]	1,78

2.5.2 Příprava roztoků

Fyziologický roztok (FR)

Do 1 000 ml odměrné baňky bylo naváženo 9 g chloridu sodného, ke kterému bylo přidáno cca 300 ml ultračisté vody. Odměrná baňka byla vložena do ultrazvukové lázně a chlorid sodný byl rozpuštěn. Po rozpuštění byla baňka doplněna ultračistou vodou po rysku.

Mobilní fáze A (MF A)

Jako MF A byl použit roztok 10 mM TFA (kyselina trifluoroctová) v UPW. Odměrným válcem byl do lahve odměřen 1 litr UPW. Do UPW bylo napipetováno 0,77 ml TFA. Roztok byl promíchán a poté odplyněn po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze B (MF B)

Jako MF B byl použit roztok 10 mM TFA v ACN (acetonitril). Odměrným válcem byl do lahve odměřen 1 litr ACN. Do ACN bylo napipetováno 0,77 ml TFA. Roztok byl promíchán a poté odplyněn po dobu 30 minut v ultrazvukové lázni.

Roztoky pro ověření linearity

Roztoky pro ověření linearity byly rozředěny ze zásobního roztoku (stock solution, SS). Roztok SS byl připraven navážením 10 mg kyseliny benzoové do 100 ml odměrné baňky. Do baňky bylo přidáno cca 30 ml FR a kyselina byla rozpuštěna pomocí ultrazvukové lázně.

Poté byla baňka doplněna FR po rysku. Ředění roztoků z SS je uvedeno v následujících tabulkách (Tabulka 4 a Tabulka 5).

Tabulka 4 - Příprava roztoků pro linearitu (kyselina benzoová) – 0,5 – 50 mg/l

Roztok	Příprava	Koncentrace [mg/l]
SS	10,70 mg / 100 ml FR	107,0
CS6	5 ml SS / 10 ml FR	53,5
CS5	2 ml SS / 10 ml FR	21,4
CS4	1 ml SS / 10 mL FR	10,7
CS3	0,5 ml SS / 10 ml FR	5,35
CS2	2 ml CS4 / 10 ml FR	1,07
CS1	1 ml CS4 / 10 ml FR	0,535

Tabulka 5 - Příprava roztoků pro linearitu (kyselina benzoová) – 0,01 – 10 mg/l

Roztok	Příprava	Koncentrace [mg/l]
SS	10,41 mg / 100 ml FR	104,1
CS4	1 ml SS / 10 ml FR	10,41
CS3	1 ml CS4 / 10 ml FR	1,04
CS2	1 ml CS3 / 10 ml FR	0,104
CS1	1 ml CS2 / 10 ml FR	0,0104

Roztoky pro ověření opakovatelnosti nástřiku, opakovatelnosti metody, stability a robustnosti

Roztok SS byl připraven navážením 10 mg kyseliny benzoové do 100 ml odměrné baňky. Do baňky bylo přidáno cca 30 ml FR a kyselina byla rozpuštěna pomocí ultrazvukové lázně. Poté byla baňka doplněna FR po rysku. Ředění roztoků z SS je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6 - Příprava roztoků pro validaci

Roztok	Příprava	Koncentrace [mg/l]
SS	10 mg / 100 ml FR	100
S3	1 ml SS / 10 ml FR	10
S2	1 ml S3 / 10 ml FR	1
S1	1 ml S2 / 10 ml FR	0,1

2.5.3 Parametry validace

Linearita

Pro ověření linearity byly použity roztoky standardů, jejichž příprava byla popsána v předešlé kapitole (2.5.2). Linearita byla ověřena v rozsahu koncentrací 0,5 – 50 mg/l a v rozsahu 0,01 – 10 mg/l. Každý kalibrační roztok byl do HPLC nastříknut dvakrát. Do grafu byla vynesena vždy plocha píku jednoho nástřiku roztoku kyseliny benzoové v závislosti na koncentraci. U vynesených křivek byla vyjádřena rovnice regrese a koeficient spolehlivosti R^2 .

Mez detekce a mez stanovitelnosti (LOD a LOQ)

Pro vyhodnocení parametrů LOD a LOQ byl analyzován samotný fyziologický roztok (slepý vzorek), který byl do HPLC nastříknut šestkrát za sebou. Ze slepého vzorku byl vyhodnocen šum v rozmezí retenčních časů 1,5 – 2,5 minuty. Retenční čas kyseliny benzoové ve FR je cca 1,8 min. Jako standard byl pro vyhodnocení použit roztok naředěný z roztoku pro ověření linearity v koncentračním rozmezí 0,5 – 50 mg/l. Bylo napipetováno 0,2 ml roztoku CS3 (Tabulka 4) do 10 ml FR.

Opakovatelnost nástřiku

Pro vyhodnocení opakovatelnosti nástřiku byly použity roztoky kyseliny benzoové ve FR o koncentraci 0,1 mg/l, 1 mg/l a 10 mg/l. Každý roztok byl nastříknut šestkrát za sebou.

Přesnost a správnost metody

Pro vyhodnocení bylo zanalyzováno šest roztoků o koncentraci 10 mg/l a šest roztoků o koncentraci 1 mg/l. Koncentrace roztoků byla vyhodnocena na křivku použitou pro vyhodnocení linearity (0,5 - 50 mg/l). Přesnost metody byla vyhodnocena jako relativní směrodatná odchylka hodnot koncentrací šesti roztoků o dané koncentraci v procentech. Správnost metody byla vyhodnocena jako průměrná výtěžnost šesti roztoků o dané koncentraci.

Stabilita

Pro ověření stabilit byly použity roztoky o koncentraci 10 mg/l a 0,1 mg/l. Roztoky byly po dobu 96 hodin vystaveny laboratorní teplotě. Během této doby byly proměřovány, každý roztok vždy dvakrát. Stabilita byla vyhodnocena z ploch vzorku a byla vyjádřena procentuální změnou průměru oproti hodnotě v bodě nula.

Robustnost

Bylo prověřováno, zda je metoda robustní. Pro ověření robustnosti metody byl použit roztok o koncentraci 10 mg/l.

2.6 Zkouška penetrace kůže

2.6.1 Příprava roztoků

Fyziologický roztok – receptorové médium

Do 1 000 ml odměrné baňky bylo naváženo 9 g chloridu sodného, ke kterému bylo přidáno cca 300 ml ultračisté vody. Odměrná baňka byla vložena do ultrazvukové lázně a chlorid sodný byl rozpuštěn. Po rozpuštění byla baňka doplněna ultračistou vodou po rysku.

Ethanol 50 % – donorové médium

Bylo smícháno 130 ml ethanolu (96 %) a 120 ml ultračisté vody.

Kyselina benzoová 4 g/l

Na analytických vahách bylo naváženo 100 mg kyseliny benzoové do 25 ml odměrné baňky. Kyselina benzoová byla rozpuštěna v menším množství 50% ethanolu v ultrazvuku a po rozpuštění byla baňka doplněna roztokem ethanolu po rysku.

2.6.2 Příprava difuzních cel před testováním

Před pokusem byly umístěny kožní preparáty nebo kožní náhrady do difuzních cel. Ty byly umístěny mezi donorovou a receptorovou část difuzní cely, svrchní částí směrem k donoru. Donorová a receptorová část s preparátem byly potaženy vrstvou parafilmu. Poté byl preparát do cely upevněn kovovou klemou nebo šroubením na donoru. Klema byla pevně nasazena, aby nedošlo k protékání médií okolo preparátu – mezi donorovou a receptorovou částí. Když byly preparáty umístěny do cel, byly cely naplněny receptorovým médiem. Při plnění cel bylo již v receptorové části vloženo míchadlo. Receptorové médium bylo doplňováno do cely injekční stříkačkou s jehlou tak, aby byla minimalizována tvorba bublin v receptoru. Médium pomalu stéká po ramínku do těla cely. Médium musí být dostatečně odplyněno a při plnění cely je nutno dávat pozor na vznik vzduchových bublin v prostoru cely. Médium bylo doplněno po rysku, která je vyznačena na ramínku cely. Ramínko cely bylo uzavřeno gumovou zátkou kvůli možnému odpařování média. Naplněné cely byly umístěny do vyhřívaného bloku, kde byly temperovány na 32 °C. Na vyhřívaném bloku byla

nastavena i rychlost míchání. Po vytemperování preparátu a receptorového média na požadovanou teplotu byl započat test.

2.6.3 Průběh pokusů

Na začátku pokusu bylo nutno do donorové části cely aplikovat roztok s testovanou látkou ve vhodném donorovém médiu. Zvolený objem testovaného roztoku byl aplikován přímo na preparát. Pokud se jednalo o konečnou dávku, byl nadávkovaný objem (kapka roztoku) rozprostřen po celém preparátu krouživým pohybem cely. Roztok s testovanou látkou byl do každé cely aplikován v časovém rozmezí dvou minut. Toto časové rozmezí bylo dodržováno i při odběrech vzorků. Při odběru vzorku byla do cely zavedena ramínkem jehla nasazena na injekční stříkačku. Jehla byla zavedena vždy do přibližně stejného místa, do prostoru nad míchadlem ve středu cely. Aby byl pokaždé zajištěn odběr z přibližně stejného místa v cele, byla na každou jehlu vyznačena fixem ryska ve vzdálenosti přibližně 8 cm od hrotu jehly. Po tuto rysku byla jehla ponořena při odběru do ramínka. Injekční stříkačkou byl do vialky odebrán požadovaný objem vzorku. Ihned po odběru vzorku bylo do cely doplněno receptorové médium po vyznačenou rysku na ramínku. Receptorové médium bylo doplňováno ramínkem cely pomocí injekční stříkačky s jehlou. Při odběru vzorku a doplňování receptorového média bylo nutné dávat pozor na vznik vzduchových bublin v médiu v cele. I malé vzduchové bubliny se mohou během míchání přesunout v médiu, a pokud se vyskytnou pod membránou, mohou mít vliv na difuzi testované látky. Pokud se pod membránou vyskytla během testování bublina, bylo nutné ji co nejdříve odstranit nakloněním cely tak, aby mohla být bublina vyloučena skrz ramínko. A poté doplnit receptorové médium po rysku. Po ukončení pokusu byly cely čištěny v ultrazvuku ponořené do směsi vody a ethanolu. Poté byly umyty vodou s detergentem, ethanolem, ultračistou vodou a usušeny v horkovzdušné sušárně.

2.6.4 Ověření vhodné rychlosti míchání

Byly provedeny dva pokusy pro ověření vlivu rychlosti míchání na výsledek testu. Jeden z pokusů byl proveden při nejnižších otáčkách, které lze na použitém vyhřívaném bloku nastavit, při 400 rpm. Druhý pokus byl proveden při otáčkách 600 rpm. Tyto otáčky jsou doporučovány USP 37 <1724>. Podmínky, při kterých byla testování prováděna jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 - Podmínky při ověřování vhodné rychlosti míchání

Cela	Upínání	Kovová klema	Kovová klema
	Počet ks	10	10
Membrána	Typ	Strat M	Strat M
	Předem máčena [min]	NE	NE
Aplikovaná látka	Název	Kyselina benzoová	Kyselina benzoová
	Aplikovaný objem [μl]	45	45
	Koncentrace látky [g/l]	4	4
	Rozpouštědlo (donor)	50% EtOH	50% EtOH
Receptorové médium	Typ	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok
	Teplota média v cele [°C]	32	32
	Teplota doplň. média	laboratorní teplota	laboratorní teplota
Rychlost míchání [rpm]		400	600
Objem odběrů [ml]		0,5	0,5
Okluze		NE	NE

2.6.5 Vliv máčení Strat-M před pokusem na protékání cel

Během prvních pokusů penetrace s použitím membrány Strat-M na celách s kovovou klemou byl zpozorován problém s netěsností cel. Na konci pokusu bylo u některých cel pozorováno zasolení cel v okolí membrány umístěné mezi donorem a receptorem. Zasolení bylo způsobeno protékáním fyziologického roztoku okolo membrány, která byla klemou nedostatečně upnuta do cely. Z tohoto důvodu byl proveden pokus, před kterým byly membrány Strat-M 30 minut máčeny ve fyziologickém roztoku a až poté byly upnuty kovovou klemou mezi donor a receptor s předpokladem, že navlhčená membrána dokonaleji přilne k oběma částem cely a zabrání protékání.

2.6.6 Vliv teploty doplňovaného receptorového média po odběru vzorku

V předešlých pokusech byla teplota doplňovaného receptorového média (fyziologický roztok), které je do cely doplňováno po odběru vzorku, shodná s teplotou laboratorní. Byl proveden pokus za stejných podmínek při 600 rpm. Ale doplňované receptorové médium bylo přehřáto na 32 °C.

2.6.7 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody vyjadřuje stupeň shody mezi získanými hodnotami z jednotlivých pokusů, které byly provedeny stejným způsobem a je vyhodnocována jako směrodatná odchylka mezi naměřenými hodnotami a zahrnuje vliv náhodných chyb. Opakovatelnost metody byla vyhodnocena ze šesti stejně provedených pokusů (pokus č. 2 až 7 – Příloha A, naměřené hodnoty – Příloha D až Příloha O).

2.6.8 Pokus penetrace přes prasečí kůži na celách se šroubením

Byl proveden pokus penetrace kyseliny benzoové přes prasečí kůži na VDC se šroubením. V pokusu byly použity tři kožní preparáty z prasete č. 1 (cela č. 1-3), tři preparáty z prasete č. 2 (cela č. 4-6) a čtyři preparáty z prasete č. 3 (cela č. 6-10). Plát prasečí kůže byl pozvolna rozmrazen při laboratorní teplotě cca 1 hodinu. Kožní preparát byl z plátu prasečího břicha vyražen raznicí a doříznut skalpelem. Po vyříznutí byl preparát umístěn mezi dva těsnící kroužky, vložen a našroubován do šroubovací donorové části. Podmínky pokusu jsou uvedeny v Příloze A (pokus č. 8 a 10).

2.6.9 Porovnání způsobů aplikace testované látky

Byly provedeny pokusy s aplikací konečné a nekonečné dávky kyseliny benzoové na membránu Strat-M. Kyselina benzoová o koncentraci 4 g/l byla aplikována v donorovém médiu (50% ethanol). V konečné dávce bylo aplikováno 45 μ l, v nekonečné dávce 450 μ l (Tabulka 8). Oba pokusy byly provedeny na celách se šroubením.

Tabulka 8 - Konečná a nekonečná dávka

	Konečná dávka	Nekonečná dávka
Objem donorového média [μ l]	45	450
Koncentrace kyseliny benzoové v donorovém médiu [g/l]	4	4
Množství kyseliny benzoové [mg/cm^2]	0,1	1,0

2.6.10 Stanovení přesnosti odběru vzorků injekční stříkačkou

Přesnost odběru byla testována z difuzní cely naplněné ultračistou vodou za míchání 600 rpm. Jehla nasazená na injekční stříkačce byla zanořena ramínkem do cely vždy zhruba 8 cm od hrotu jehly. Bylo odebíráno 0,5 ml ultračisté vody. Objem stříkačky byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytických vahách. Přesnost odběrů byla testována na třech injekčních stříkačkách Heparin (B. Braun).

2.6.11 Stanovení rozpustnosti kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku

Pro dodržení tzv. *sink conditions* je nutno zjistit rozpustnost testované látky v receptorovém médiu. Rozpustnost kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl v ultračisté vodě) byla stanovována nejprve předběžnými testy, z kterých bylo zjištěno, že rozpustnost je větší než 0,01 g/l. Na základě tohoto zjištění byla pro hlavní test zvolena baňková metoda pro stanovení rozpustnosti. Testování rozpustnosti bylo provedeno podle předpisu OECD Guideline 105 [38].

Předběžný test – pokus 1

Navážka 10,5 mg kyseliny benzoové byla převedena do 10 ml fyziologického roztoku ve skleněné Erlenmeyerově baňce s míchadlem. Baňka byla umístěna na míchadlo (otáčky 250 rpm). Po každém přidavku objemu FR byla suspenze míchána 10 minut. Po deseti minutách byla suspenze vždy vizuálně zkontrolována. Pokud byly v baňce zpozorovány nerozpuštěné částice kyseliny benzoové, byl do baňky přidán další objem FR. Pokus byl prováděn při laboratorní teplotě. Podle předběžného testu byla zjištěna rozpustnost podle vizuální kontroly. Pokud je tato rozpustnost větší než 0,01 g/l, volí se v hlavním testu baňková metoda. Pokud je koncentrace nižší, používá se metoda eluční sloupcová [38].

Předběžný test – pokus 2

Vzhledem k nízkému odhadu rozpustnosti v prvním pokusu byl proveden pokus 2. V druhém pokusu nebyly do baňky doplňovány další přísady fyziologického roztoku, protože doba potřebná k rozpuštění může být delší.

Navážka 10,7 mg kyseliny benzoové byla převedena do 10 ml fyziologického roztoku ve skleněné Erlenmeyerově baňce s vloženým míchadlem (koncentrace cca 1 g/l). Baňka byla umístěna na míchadlo a suspenze byla míchána rychlostí 250 rpm. Suspenze v baňce byla průběžně vizuálně kontrolována, jestli jsou v baňce pozorovány nerozpuštěné částice kyseliny benzoové. Pokus byl prováděn při laboratorní teplotě.

Hlavní test - baňková metoda

Kyselina benzoová byla navážena do tří Erlenmeyerových baněk (250 ml) se skleněnými zátkami. Do každé baňky bylo naváženo množství kyseliny odpovídající pětinasobku odhadnutého množství z předběžného testu a navážka byla zředěna odpovídajícím množstvím fyziologického roztoku. Baňky byly uzavřeny a obsah byl míchán na

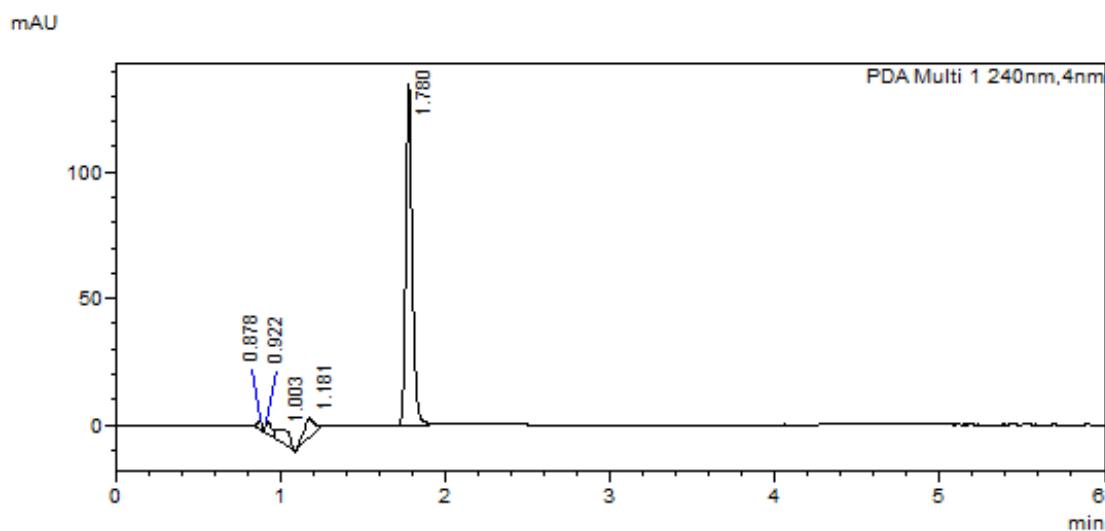
termostatickém míchadle (250 rpm, 30 °C) po dobu 24 h (B1), 48 h (B2) a 72 h (B3). Poté byly baňky odstraněny z míchadla a nechaly se stát za občasného zamíchání při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Poté byl z baňky odebrán vzorek, který byl zfiltrován přes stříkačkový filtr (0,2 µm). Vzorky byly zředěny stokrát (0,1 ml / 10 ml FR) a byly zanalyzovány validovanou metodou na HPLC, vzorek z každé baňky byl do HPLC injektován dvakrát. Při odběru byla v baňkách změřena teplota roztoku a pH. Výsledek testu lze považovat za vyhovující, pokud je rozptyl výsledných koncentrací alespoň u baňky 2 (48 h) a baňky 3 (72 h) menší než 15 %. Jestliže mají koncentrace z baněk 1, 2 a 3 stoupající tendenci, je nutno test opakovat s delší dobou pro ustanovení rovnováhy při laboratorní teplotě [38].

3 VÝSLEDKY

3.1 Vyhodnocení validace analytické metody HPLC – kyselina benzoová

3.1.1 Chromatografický záznam

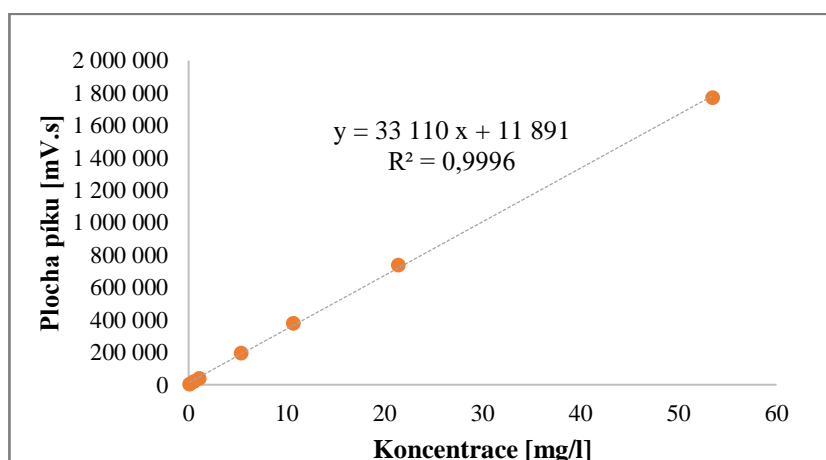
Na Obrázku 15 je uveden chromatografický záznam kyseliny benzoové při vlnové délce 240 nm o koncentraci 10 mg/l v retenčním čase 1,78 min.



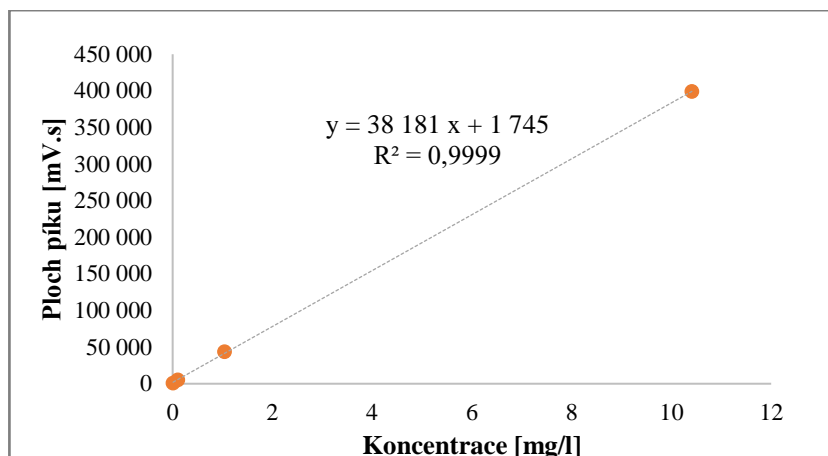
Obrázek 15 – Chromatogram – kyselina benzoová 10 mg/l (RT 1,78 min)

3.1.2 Linearita

V Grafech 1 a 2 jsou vyneseny lineární závislosti plochy píku na koncentraci kyseliny benzoové. V práci jsou pro ilustraci uvedeny grafy pouze z jednoho nástřiku roztoku. Plochy píků ze dvou nástřiků se téměř nelišily.



Graf 1 - Lineární závislost – kyselina benzoová ve FR 0,5 – 50 mg/l



Graf 2 - Lineární závislost – kyselina benzoová ve FR 0,01 – 10 mg/l

Rovnice regrese a koeficienty spolehlivosti R^2 jsou uvedeny v Tabulce 9. Z koeficientů spolehlivosti lze vyhodnotit průběh křivek jako lineární.

Tabulka 9 - Vyhodnocení linearity kyseliny benzoové ve FR

Rozsah koncentrací [mg/l]	Rovnice regrese	R^2
0,5 - 50	$y = 33\,110 x + 11\,891$	0,9996
	$y = 33\,048 x + 10\,899$	0,9997
0,01 - 10	$y = 38\,181 x + 1\,745$	0,9999
	$y = 38\,589 x + 1\,593$	0,9999

3.1.3 Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ)

Vyhodnocené hodnoty šumu jsou uvedeny v Tabulce 10. Pro výpočet LOD a LOQ je nutno spočítat faktor F, tj. poměr koncentrace roztoku standardu ku jeho výšce píku (Tabulka 11).

Tabulka 10 – Vyhodnocení šumu fyziologického roztoku z HPLC

Nástřík FR č.	Šum (ASTM) [mV]
1	10,7
2	7,6
3	14,6
4	11,6
5	12,8
6	15,0
Průměr	12
SD	3
RSD %	23

Tabulka 11 – Výška píku roztoku standardu kyseliny benzoové pro vyhodnocení LOD, LOQ

Koncentrace [mg/l]	0,107
Výška píku 1 [mV]	1 491
Výška píku 2 [mV]	1 498
Průměr výšky píku [mV]	1 495
Faktor	0,0000716

Faktor F byl spočten z rovnice (2):

$$F = \frac{c}{\bar{H}} \quad (2)$$

kde c [mg/l] je koncentrace standardu a \bar{H} je průměrná výška píku standardu ze dvou nástříků.

Limit detekce (LOD) byl spočten z rovnice (3):

$$LOD = 3 \times \bar{H} \times F \quad (3)$$

Limit kvantifikace (LOQ) byl spočten z rovnice (4):

$$LOQ = 10 \times \bar{H} \times F \quad (4)$$

Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12 - Výsledné hodnoty LOD, LOQ – stanovení kyseliny benzoové

LOD [mg/l]	0,003
LOQ [mg/l]	0,009

3.1.4 Opakovatelnost nástřiku

Opakovatelnost nástřiku byla vyhodnocena jako relativní směrodatná odchylka šesti hodnot v procentech. Naměřené hodnoty uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13 - Opakovatelnost nástřiku – kyselina benzoová

Nástřik č.	Plocha píku [mV.s]		
	0,1 mg/l	1 mg/l	10 mg/l
1	4 301	39 267	379 273
2	4 250	40 056	379 402
3	4 284	39 172	380 515
4	4 245	39 057	379 858
5	4 277	39 404	380 196
6	4 160	39 383	380 336
Průměr	4 250	39 400	380 000
SD	50	400	500
RSD %	1	1	0,1

Opakovatelnost nástřiku byla vyhodnocena u koncentrace 0,1 mg/l na 1 %, u 1 mg/l na 1 % a u 10 mg/l na 0,1 %.

3.1.5 Přesnost a správnost metody

Výsledné hodnoty pro koncentraci 10 mg/l a 1 mg/l jsou uvedeny v Tabulce 14 a 15.

Tabulka 14 - Přesnost a správnost – kyselina benzoová ve FR 10 mg/l

Roztok č.	Navážka [mg]	Teoretická konc. [mg/l]	Experimentální konc. [mg/l]	Správnost [%]
1	10,4	10,4	11,1	107
2	10,8	10,8	11,8	109
3	10,3	10,3	11,4	111
4	10,8	10,8	12,1	112
5	10,2	10,2	11,3	111
6	10,8	10,8	11,9	110
Průměr	10,5	10,5	11,6	110
SD	0,3	0,3	0,3	1,7
RSD %	2	2	3	2

Tabulka 15 - Přesnost a správnost – kyselina benzoová 1 mg/l

Roztok č.	Navážka [mg]	Teoretická konc. [mg/l]	Experimentální konc. [mg/l]	Správnost [%]
1	10,4	1,04	0,85	82
2	10,8	1,08	0,89	83
3	10,3	1,03	0,87	84
4	10,8	1,08	0,94	87
5	10,2	1,02	0,88	87
6	10,8	1,08	0,91	84
Průměr	10,5	1,05	0,89	84
SD	0,3	0,03	0,03	2
RSD %	2	2	3	3

Pro koncentraci 10 mg/l byla vyhodnocena přesnost na 3 % a správnost na 110 %. Pro koncentraci 1 mg/l byla přesnost vyhodnocena na 3 % a správnost na 84 %.

3.1.6 Robustnost

Pro stanovení robustnosti bylo stanoveno osm různých kombinací parametrů (Tabulka 17). Jednotlivé parametry jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 16). Standardní parametry metody jsou značeny velkými písmeny, upravené parametry malými písmeny. Vyhodnocení robustnosti je uvedeno v tabulce (Tabulka 18).

Tabulka 16 - Parametry – stanovení robustnosti (kyselina benzoová)

Parametr (faktor)	Podmínky			
	Standardní		Upravené	
Dávkované množství [μ l]	A	20	a	19
Průtok [ml/min]	B	1,5	b	1,47
Teplota na koloně [$^{\circ}$ C]	C	30	c	35
Vlnová délka λ [nm]	D	240	d	249

Tabulka 17 - Kombinační tabulka pro stanovení robustnosti (kyselina benzoová)

Kombinace č.							
1	2	3	4	5	6	7	8
a	A	a	A	a	A	a	A
b	b	B	B	B	B	b	b
C	C	C	c	c	C	c	c
D	D	D	D	d	d	d	d

Tabulka 18 - Vyhodnocení robustnosti s pomocí softwaru EffiValidation

Faktor	Efekt faktoru	Kritický efekt	Hypotéza
A/a	14 681	166 636	Přijata
B/b	38 223	166 636	Přijata
C/c	-4 347	166 636	Přijata
D/d	-112 773	166 636	Přijata

Analytická metoda je robustní vůči všem testovaným faktorům.

3.1.7 Stabilita

Naměřené plochy roztoků kyseliny benzoové jsou uvedeny v Tabulce 19 a 20. Oba roztoky byly vyhodnoceny jako stabilní během 96 hodin při laboratorní teplotě.

Tabulka 19 – Závislost plochy píku kys. benzoové ve FR na čase pro 10 mg/l

Odběr [h]	Plocha píku [mV.s]	% změna
0	380 096	0
	379 611	0
72	378 640	-0,4
	378 321	-0,3
96	373 201	-2
	373 913	-2

Tabulka 20 - Závislost plochy píku kys. benzoové ve FR na čase pro 0,1 mg/l

Odběr [h]	Plocha píku [mV.s]	% změna
0	4 214	0,0
	4 266	0,0
24	4 228	0,3
	4 259	-0,2
48	4 297	2
	4 259	-0,2
72	4 367	4
	4 221	-1
96	4 262	1
	4 237	-0,7

3.1.8 Souhrn výsledků validace analytické metody

V Tabulce 21 jsou uvedeny výsledky validace kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku.

Tabulka 21 - Výsledky validace kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku

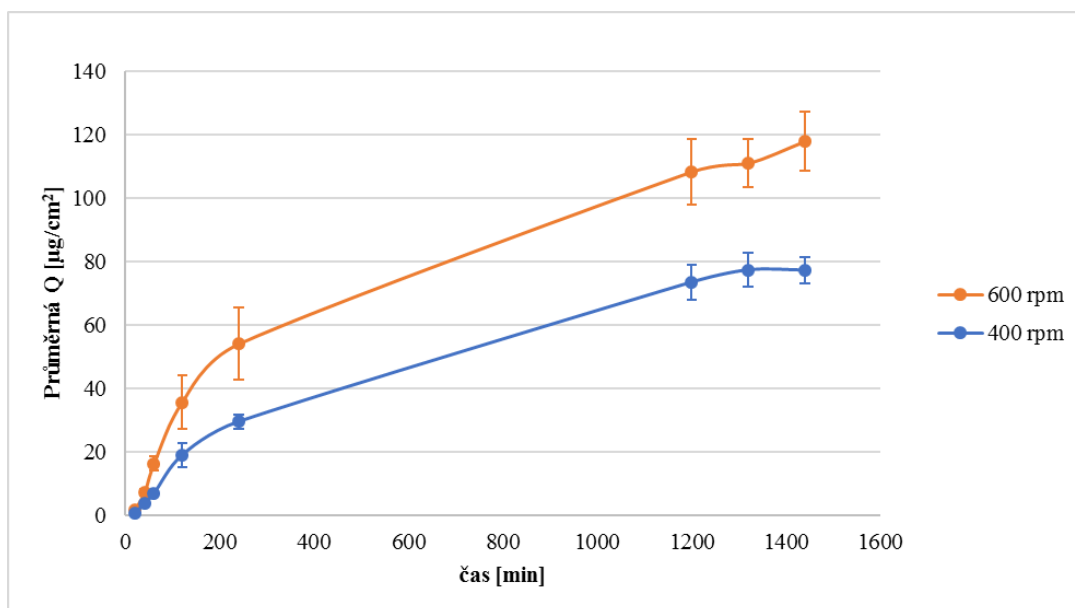
Parametr	Přijatelné kritérium	Výsledek validace	Vyhovuje	
Linearita	$(R^2) \geq 0,99$ (0,5 - 50 mg/l)	0,9996 0,9997	ANO	
	$(R^2) \geq 0,99$ (0,01 - 10 mg/l)	0,9999 0,9999	ANO	
Opakovatelnost nástřiku	RSD < 5 %	1 % pro 0,1 mg/l	ANO	
		1 % pro 1 mg/l	ANO	
		0,1 % pro 10 mg/l	ANO	
Přesnost	RSD < 10 %	3 % pro 1 mg/l	ANO	
		3 % pro 10 mg/l	ANO	
Správnost	80 - 120 %	84 % pro 1 mg/l	ANO	
		110 % pro 10 mg/l	ANO	
LOD	-	0,003 mg/l	-	
LOQ	< 0,1 mg/l	0,009 mg/l	ANO	
Robustnost	Metoda je robustní.	Metoda je robustní.	ANO	
Stabilita roztoku	min. 96 h \pm 5 %	1 % -0,7 %	po 96 h pro 0,1 mg/l	ANO
		-2 % -2 %	po 96 h pro 10 mg/l	ANO

3.2 Zkouška penetrace kyseliny benzoové

3.2.1 Ověření vhodné rychlosti míchání

Z provedených pokusů (pokus č. 1 a 2 – Příloha A) byla vyhodnocena průměrná kumulativní množství kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku v závislosti na čase (Graf 3, Příloha B, Příloha C, Příloha D, Příloha E). Hodnoty fluxu v pokusu s 600 rpm byly vyšší než u pokusu se 400 rpm. Hodnota lag time byla u 600 rpm nižší (Tabulka 22). Z tohoto zjištění vyplývá, že při rychlosti 600 rpm nebyl v difuzních celách tvořen vír, který by zabraňoval difuzi do receptorového média. Rychlejší otáčky zároveň zajišťují rychlejší a

dokonalejší promísení absorbované látky v celém objemu receptorového média. Na základě tohoto zjištění byla v dalších pokusech použita rychlost míchání 600 rpm.



Graf 3 - Porovnání vlivu rychlosti míchání

Tabulka 22 - Vliv rychlosti míchání na lag time a flux

Rychlost míchání [rpm]	Lag time [h]	Flux [µg/cm ² /h]
400	0,08	8,64
600	0,07	17,6

3.2.2 Vliv máčení Strat-M před pokusem

Po provedení pokusu (pokus č. 3 – Příloha A, Příloha D) bylo zjištěno, že jedna z deseti cel, i přes máčení membrány před pokusem, protékala. Bylo vyhodnoceno, že máčení membrán Strat-M před pokusem nemá zásadní vliv na těsnost cel s kovovou klemou.

3.2.3 Vliv teploty doplňovaného receptorového média po odběru vzorku

Byl proveden pokus s teplotou doplňovaného média ohřátého na 32 °C (pokus č. 4 – Příloha A, Příloha F). Difuze je závislá na teplotě a čím je vyšší teplota, tím rychleji difuze probíhá. Cílem pokusu bylo zjistit, zda má teplota doplňovaného média (0,5 ml) do cely (celkový objem 11 ml) po odběru vzorku vliv na rychlost difuze kyseliny benzoové přes membránu. Předpokladem tedy bylo zvýšení fluxu oproti pokusům, kde bylo doplňováno médium o laboratorní teplotě, která je nižší než 32 °C. Výsledná hodnota fluxu

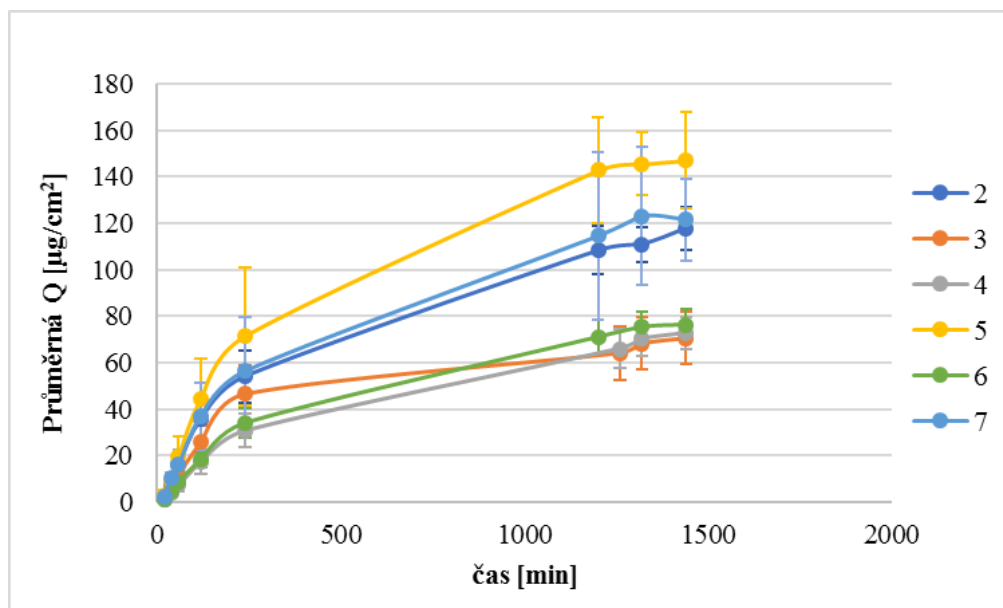
v provedeném pokusu nebyla vyšší než u pokusů s doplňovanou laboratorní teplotou. Naopak byl flux nižší než průměr ze stejných pokusů s doplňovaným médiem o laboratorní teplotě a lag time byl s průměrem z těchto pokusů srovnatelný (Tabulka 23). Bylo vyhodnoceno, že doplňované médium o laboratorní teplotě, která je nižší než 32 °C nemá zásadní vliv na difuzi testované látky přes membránu.

3.2.4 Opakovatelnost metody penetrace přes membránu Strat-M

Do šesti provedených pokusů byl zahrnut i pokus č. 3, v kterém byl zjišťován vliv máčení Strat-M před pokusem a pokus č. 4 s doplňováním přehřátého média, jelikož se u těchto pokusů nepotvrdil vliv změněných parametrů. Hodnota RSD fluxu je 40 %, hodnota RSD lag time je 41 % (Tabulka 23). Tyto hodnoty byly softwarem SAMPA spočteny z průměrů ze všech šesti pokusů. Do průměrů byly započteny pouze cely, které viditelně neprotékaly. Grafické znázornění závislosti průměrného kumulativního množství z použitých cel v pokusu na čase je zobrazeno v Grafu 4.

Tabulka 23 - Opakovatelnost metody penetrace přes membránu Strat-M

Pokus č.	Počet vyhodnocených cel	Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
2	6	17,6	0,07
3	9	15,4	0,25
4	8	8,62	0,11
5	8	25,7	0,13
6	8	9,79	0,11
7	8	21,5	0,19
Medián	-	16,5	0,12
Průměr	-	16,4	0,14
SD	-	6,0	0,06
RSD %	-	40	41



Graf 4 - Opakovatelnost metody penetrace přes Strat-M

3.2.5 Penetrace přes prasečí kůži na celách se šroubením

Pokus č. 8:

Po aplikaci konečné dávky kyseliny benzoové na kůži byl zahájen pokus. Ihned po zahájení pokusu bylo u cely č. 10 pozorováno protékání receptorového média. Médium zřejmě protékalo z důvodu použití pouze jednoho těsnění (kroužku) pod kůží. Kroužek nad kůží chyběl z důvodu nekompletní dodávky příslušenství k celám a bude dodán dodatečně. Kůže zřejmě nebyla dostatečně utěsněna v donorové části. Dalším důvodem byl špatně vložený preparát do donoru. Část kůže přesahovala pod těsněním do šroubení a mohla způsobit nedokonalé utěsnění kožního preparátu v cele. U cely č. 9 byl také pozorován přesah kožního preparátu do šroubení a od začátku pokusu celou protékalo receptorové médium. U cely č. 6 bylo také pozorováno protékání, ale v menší míře než u cely č. 9 a 10. Zároveň u cely č. 6 nebyl pozorován přesah kůže jako u cel č. 9 a 10 (Obrázek 16). Cela zřejmě protékala z důvodu nedokonalého umístění kožního preparátu do cely. Z cel byly i přes protékání odebírány vzorky a doplňováno receptorové médium. U cely č. 9 a 10 začalo po doplnění média po rysku médium okamžitě vytékat ze spodu donorové části. Mezi odběry klesla hladina receptorového média až na spodní konec ramínka. Cela č. 6 protékala jen pozvolna. Mezi odběry klesla hladina receptorového média jen málo pod rysku na ramínku. Po pokusu byly kožní preparáty odstraněny z donoru cely. Preparát č. 1 byl výrazně pigmentovaný oproti ostatním. U preparátu č. 9 a 10 bylo pozorováno nepřesné umístění plochy účastnící se penetrace na střed (Obrázek 17). Výsledky pokusu jsou uvedeny v Příloze P a Q.



Obrázek 16 – Kožní preparáty z prasečího břicha upnuté do donorové šroubovací části cely (po pokusu č.8)



Obrázek 17 – Kožní preparáty z prasečího břicha po pokusu č.8

Pokus č. 10:

Pokus č. 10 byl proveden za stejných podmínek jako pokus č. 8. (Příloha A). I přes snahu umístit kůži do cely tak, aby nezasahovala do šroubení, bylo po 20 hodinách pokusu pozorováno protékání cely č. 3 a 6. Do receptorové části cely byl doplněn fyziologický roztok. Po doplnění již cely do konce pokusu neprotekly. Výsledky pokusu jsou uvedeny v Příloze T a U.

3.2.6 Penetrace přes Strat-M na celách se šroubením

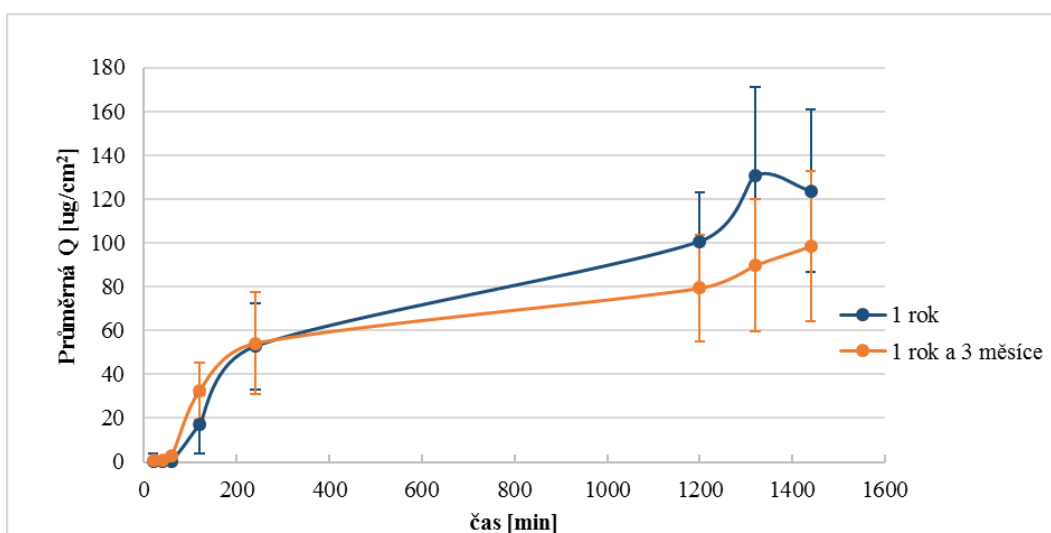
Při použití Strat-M v pokusu s celami se šroubením nebyla pozorována cela, která by protékala. Ale u jedné z cel (cela č. 1) došlo k difuzi většiny látky již po 2 hodinách pokusu (na rozdíl od ostatních cel, kde k difuzi tohoto množství došlo až po 20 až 22 h). Rychlá difuze byla pravděpodobně způsobena poškozením membrány nebo špatným upnutím membrány do cely a protékáním donoru do receptoru, protékání nebylo okem viditelné. Tato cela byla z výsledného hodnocení vyřazena. Výsledky z jednotlivých cel jsou uvedeny v Příloze V.

3.2.7 Vliv skladování prasečí kůže na penetraci kyseliny benzoové

Pro ověření vlivu skladování prasečí kůže na penetraci kyseliny benzoové byly provedeny pokusy č. 8 a 10. V pokusu č. 8 byla použita kůže skladována 1 rok při teplotě -20 °C. V pokusu č. 10 byla použita kůže ze stejných dárců po 1 roce a 3 měsících od odběru skladována při -20 °C. U pokusu s kůží starší než 1 rok byl pozorován kratší lag time a rychlejší flux (Tabulka 24). Na základě uvedených pokusů lze usuzovat, že u kůže starší než jeden rok, může být průchod látky přes kůži rychlejší. Absorpční profily kyseliny benzoové jsou uvedeny v Grafu 5.

Tabulka 24 – Závislost lag time a flux na stáří prasečí kůže

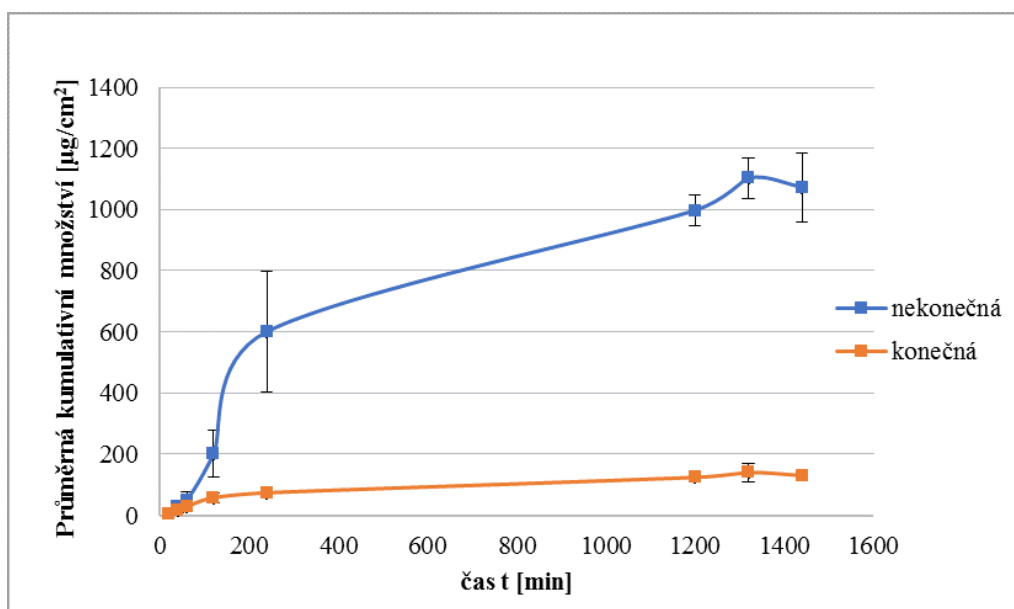
Stáří kůže	1 rok	1 rok a 3 měsíce
Lag time [hod]	0,88	0,64
Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hod}$]	21,3	29,5



Graf 5 – Absorpční profil kys. benzoové pro prasečí kůži v závislosti na stáří kůže

3.2.8 Porovnání způsobů aplikace testované látky na Strat-M

Byly provedeny pokusy penetrace kyseliny benzoové přes membránu Strat-M z konečné dávky (pokus č. 11) a nekonečné dávky (pokus č. 9). Na membránu byl aplikován rozdílný objem roztoku o stejné koncentraci. V Grafu 6 jsou porovnány křivky závislosti kumulativního množství kyseliny benzoové v receptorovém médiu v závislosti na čase u pokusu s konečnou a nekonečnou dávkou. U křivky s konečnou dávkou můžeme před koncem pokusu (po 22 hod) pozorovat depleci kyseliny benzoové v donoru. Křivka na konci pokusu stagnuje. U křivky s nekonečnou dávkou můžeme pozorovat strmý růst kumulativního množství kyseliny benzoové v receptorovém médiu. Na konci pokusu byl růst křivky zastaven. Další difuze kyseliny benzoové byla omezena její deplecí i při aplikaci nekonečné dávky donorového média.



Graf 6 - Porovnání konečné a nekonečné dávky

3.2.9 Porovnání membrány Strat-M a prasečí kůže

Při použití membrány Strat-M byl průměr fluxu z šesti pokusů $16,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ (RSD pokusů 40 %) a lag time $0,14 \text{ h}$ (RSD pokusů 41 %). Při použití prasečí kůže byl flux z jednoho pokusu $21,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a lag time $0,88 \text{ h}$. U membrány Strat-M byl lag time cca 6x nižší než u prasečí kůže.

3.2.10 Stanovení přesnosti odběru vzorků injekční stříkačkou

Hmotnosti jednotlivých odběrů jsou uvedeny v Tabulce 25. RSD jednotlivých odběrů se třemi injekčními stříkačkami jsou 3 %, 4 % a 4 %.

Tabulka 25 – Závislost hmotnosti odběrů na použité injekční stříkačce

Odběr č.	[mg]		
	Injekční stříkačka č.		
	1	2	3
1	528	503	526
2	519	503	505
3	514	499	502
4	490	459	499
5	511	512	518
6	483	462	504
7	500	500	449
8	497	508	478
9	506	482	504
10	517	498	515
Medián	509	499	504
Průměr	510	500	500
SD	10	20	20
RSD %	3	4	4

3.2.11 Stanovení rozpustnosti kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku

Předběžný test – pokus 1:

Předběžný test rozpustnosti byl proveden podle schématu uvedeného v Tabulce 26.

Tabulka 26 - Schéma předběžného testu

Objem FR pro rozpuštění 10,5 mg kys, benzoové	10	20	40	60
Koncentrace [mg/l]	1 050	525	263	175
Rozpustnost (ANO/NE)	NE	NE	NE	ANO

Pokus byl proveden při laboratorní teplotě (19 °C). Po 40 minutách míchání od začátku pokusu – v 60 ml FR nebyly v roztoku okem viditelné nerozpuštěné částice kyseliny benzoové. Roztok byl odebrán do vialky (odběr 1) a analyzován pomocí HPLC. Zbytek roztoku byl dále míchán na míchadle dalších 60 minut. Poté byl odebrán a analyzován další vzorek (odběr 2). Z plošného vyhodnocení kyseliny benzoové u obou odběrů nebyla zjištěna změna obsahu kyseliny benzoové v roztoku po 100 minutách míchání (Tabulka 27).

Tabulka 27 - Analýza odběrů při předběžné zkoušce – pokus 1

	Plocha 1	Plocha 2
odběr 1	5 512 267	5 491 329
odběr 2	5 506 644	5 501 384

Odhad rozpustnosti kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku z předběžného testu je okolo 175 mg/l. Vzhledem k nízkému odhadu rozpustnosti může být doba potřebná k rozpuštění delší. Proto byl v předběžném testu proveden další pokus.

Předběžný test – pokus 2:

Pokus byl prováděn při laboratorní teplotě (20,5 °C). Po 3,5 hodinách od začátku pokusu nebyly v roztoku okem viditelné nerozpuštěné částice kyseliny benzoové. Odhad rozpustnosti kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku z předběžného testu je okolo 1 g/l. Vzhledem k tomu, že tento odhad je vyšší než 0,1 g/l, byla v hlavním testu použita baňková metoda.

Hlavní test – baňková metoda:

Při odběru byla v baňkách změřena teplota roztoku a pH. Průměrná teplota ve třech baňkách byla 20,3 °C s rozptylem 0,6 %, průměrná hodnota pH byla 3,0 s rozptylem 1 % (Tabulka 28).

Tabulka 28 - Schéma baňkové metody

Roztok	Navážka kyseliny benzoové [g]	Datum přípravy	Datum odběru	pH	Teplota měření pH [°C]
B1	5,014	09.03.2020	11.03.2020	3,0	20,2
B2	5,082	09.03.2020	12.03.2020	3,0	20,3
B3	5,076	06.03.2020	10.03.2020	3,1	20,5
Průměr				3,0	20,3
RSD [%]				1	0,6

V Tabulce 29 jsou uvedeny výsledné koncentrace. Rozptyl výsledků ze tří baněk jsou 4 %. Rozptyl je menší než 15 % a výsledné koncentrace baněk 1, 2 a 3 nemají stoupající tendenci. Výsledek lze považovat za vyhovující.

Tabulka 29 - Výsledky rozpustnosti kyseliny benzoové ve FR

Roztok	Koncentrace [g/l]		
	c₁	c₂	Průměr c
1	2,59	2,59	2,59
2	2,46	2,46	2,46
3	2,34	2,35	2,35
Průměr			2,47
SD			0,1
RSD [%]			4

Bañkovou metodou byla zjištěna rozpustnost kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku 2,47 g/l při teplotě 20,3 °C.

4 DISKUZE

V prvních pokusech penetrace kyseliny benzoové byla ověřena rychlost otáček míchadla v receptorové části cely. V práci byla testována rychlost 400 a 600 rpm. Vzhledem k výsledné nižší hodnotě lag time a vyšší hodnotě flux u 600 rpm bylo zjištěno, že při těchto otáčkách nedochází k víru pod membránou zabraňujícímu difuzi. Na základě těchto výsledků byla zvolena jako vhodnější rychlost 600 rpm, kterou doporučuje i předpis USP 37 <1724> [7].

V práci byly provedeny pokusy absorpce kyseliny benzoové přes membránu Strat-M. Při použití kovových klem docházelo u některých cel k protékání médií okolo membrány. Tyto cely byly z výsledného hodnocení vyřazeny. Z každého pokusu byly vyloučeny v průměru 2 cely z 10. Problémem protékání aplikované dávky u různých druhů klem se zabývá i Desmedt a kol. [39]. V publikaci autoři testovali 7 různých druhů klem s různými rozměry v kombinaci s membránou Strat-M. Na membránu byl aplikován roztok methylenové modři. Po jedné hodině byla membrána vyjmuta z cely a byla provedena vizuální kontrola membrány, zda roztok modři setrval během pokusu pouze v donorem vymezené oblasti. Výsledkem byly tři typy klem, které neudržely roztok barviva pouze v aplikační zóně. Čtyři klemy podmínku splnily.

Na základě problému s protékáním cel byl proveden pokus, kdy byla membrána Strat-M 30 minut předem máčena ve fyziologickém roztoku. Dle výrobce nemusí být membrána před pokusem máčena. Ale pokus byl proveden s předpokladem, že navlhčená membrána dokonaleji přilne k oběma částem cely a zabrání protékání. Potvrdilo se, že i přes toto opatření byla v pokusu protékající cela a máčení Strat-M tedy nemá zásadní vliv na těsnost cel s kovovou klemou.

Při provedení *in vitro* kožní absorpce kyseliny benzoové přes prasečí kůži byl výsledek pokusu flux $21,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a lag time 0,88 hodin. V porovnání se syntetickou membránou Strat-M byl lag time kyseliny benzoové u syntetické membrány šestkrát rychlejší než u prasečí kůže. Vzhledem k velkému rozptylu (40 %) fluxu z šesti provedených pokusů u Strat-M ($16,4 \pm 6,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) můžeme říct, že se výsledek fluxu s použitím prasečí kůže ($21,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) blíží fluxu membrány Strat-M. Výsledkem okružního testu *in vitro* kožní absorpce kyseliny benzoové přes lidskou kůži, který je uveden v publikaci van de Sandt a kol. [5], je flux $16,5 \pm 11,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ a lag time $1,15 \pm 0,83$ h. Výsledky jsou z osmi evropských laboratoří s použitím lidské kůže. Použitá lidská kůže byla skladována

zmrazená, použité kůže měly různou tloušťku. Přesné podmínky skladování kůže, příprava modelu a původ nebyly sjednoceny a modely kůže tak vykazují vysokou variabilitu. Z výsledků diplomové práce a výsledků uvedených v publikaci [5] lze říci, že flux u Strat-M a lidské kůže je srovnatelný. Flux z jednoho pokusu s prasečí kůží také zapadá do širokého rozmezí hodnot. Lag time u membrány Strat-M je několikanásobně kratší než u lidské kůže a vykazuje velký rozptyl výsledků. Porovnání výsledků diplomové práce s publikací je uvedeno v Tabulce 30.

Tabulka 30 - Porovnání výsledků s publikací

	Diplomová práce		Publikace van de Sandt [5]	
	Strat-M	Prasečí kůže	Potkaní kůže	Lidská kůže
Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	16,4	21,3	21,2	16,5
<i>SD</i>	6,0	-*	1,6	11,9
Lag time [h]	0,14	0,88	0,6	1,15
<i>SD</i>	0,06	-*	0,2	0,83

* výsledek pouze z jednoho pokusu

Dále byl ověřen vliv skladování prasečí kůže na kožní absorpci kyseliny benzoové. Kůže odebrané z prasečích břich byly po odříznutí podkožního tuku zamrazeny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doporučení WHO [1] na základě některých autorů je skladovat kůži při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu maximálně jednoho roku. První pokus s kyselinou benzoovou byl proveden po 1 roce skladování za těchto podmínek. Druhý pokus byl proveden po 1 roce a 3 měsících po odběru kůže. U obou pokusů byl vyhodnocen průměrný flux a lag time z 8 difuzních cel. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že u kůže starší než jeden rok, může být průnik látky přes kůži i flux rychlejší.

Při pokusu *in vitro* penetrace je důležitá přesnost odběru injekční stříkačkou. Přesnost odběru byla ověřena na celách naplněných vodou při míchání 600 rpm. Objem vody odebraný injekční stříkačkou HEPARIN byl vypuštěn do kádinky na vytárování analytických vahách. Tento postup byl opakován desetkrát se třemi injekčními stříkačkami. RSD jednotlivých odběrů se třemi injekčními stříkačkami byly 3 %, 4 % a 4 %. V diplomové práci T. Hubky [40] byl proveden pokus se stejnou injekční stříkačkou. Odchylka dávkování byla obdobná, v rozmezí 3-6 %.

Při pokusu *in vitro* kožní penetrace je nutná konstantní teplota kožního modelu a receptorového média, protože teplota má velký vliv na rychlost difuze. Po každém odběru

vzorku je do receptoru doplňováno čerstvé receptorové médium. V práci byl porovnán pokus, ve kterém bylo doplňováno receptorové médium o laboratorní teplotě a pokus, ve kterém bylo doplňováno receptorové médium přehřáté na 32 °C. Cílem bylo zjistit, zda doplňované médium o laboratorní teplotě nezpůsobuje v receptoru teplotní fluktuaci, která by mohla mít zásadní vliv na difuzi látky. Předpokladem bylo zvýšení fluxu při doplňování přehřátého média. Tato teorie nebyla potvrzena, protože výsledek fluxu byl naopak nižší. V dalších pokusech bylo zvoleno doplňování média o laboratorní teplotě.

V diplomové práci byla ověřena rozpustnost kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku dle metodiky OECD [38]. Znalost rozpustnosti kyseliny benzoové v receptorovém médiu je důležité znát kvůli zachování tzv. *sink conditions* při pokusu *in vitro* penetrace. Při nedodržení těchto podmínek může v receptoru během pokusu vzniknout nasycený roztok a difuze se zastaví. Shioh-Fern a kol. [19] doporučují dodržovat maximální koncentraci v receptoru odpovídající 10% rozpustnosti látky v receptorovém médiu. Rozpustnost byla stanovena na 2,47 g/l při teplotě 20,3 °C. Pro zachování *sink conditions* je nutno dodržet maximální koncentraci v receptoru 247 mg/l (odpovídá 10% rozpustnosti). Překročení této koncentrace nebylo v žádném z pokusů u žádného odběru zaznamenáno, *sink conditions* byly dodrženy.

5 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byly popsány parametry ovlivňující testování *in vitro* kožní penetrace. Mezi ně patří výběr kožního modelu, výběr difuzní cely, teplota, míchání, aplikace testované látky, akceleranty penetrace, okluze.

V experimentální části diplomové práce byla nejprve provedena validace analytické metody (HPLC-DAD) pro stanovení kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku a byla stanovena rozpustnost kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku na 2,47 g/l při 20,3 °C. Jako optimální rychlost míchání byla na základě pokusů zvolena rychlost 600 rpm. Dále bylo zjištěno, že laboratorní teplota doplňovaného média nezpůsobuje teplotní fluktuaci. Ověřená přesnost odběru injekční stříkačkou byla do 4 %.

Absorpce kyseliny benzoové byla ověřena na vertikálních difuzních celách s kovovou klemou a se šroubením. Cely s kovovou klemou se ukázaly jako méně vhodné, protože při jejich použití docházelo častěji k protékání médií okolo membrány. V důsledku nedostatečného utěsnění docházelo častěji i k vniknutí vzduchových bublin pod membránu. Kovové klemy nelze doporučit ani pro použití s kůží, neboť kůže má větší tloušťku než syntetická membrána a kvůli tomu úchyty kovové klemy ne vždy dokonale zapadnou do drážek v receptorové části. Proto nelze kůži do cel kovovou klemou dobře uchytit. Naopak cely se šroubením jsou lépe uzpůsobeny pro použití s kůží. Díky variabilnímu šroubení lze do cely upevnit různé tloušťky kožních modelů (kůže i membrána). U cel se šroubením se problémy s protékáním médií objevily také. V průběhu práce ale byla zjištěna příčina protékání (nedokonalé umístění kožního modelu do cely), která může být v budoucích pokusech eliminována. Na základě těchto poznatků byly zvoleny jako vhodnější cely se šroubením.

Kromě porovnání difuzních cel, byla v práci porovnávána absorpce kyseliny benzoové přes prasečí kůži a přes membránu Strat-M. Obecně je výhodou syntetické membrány Strat-M její lepší dostupnost a nízká variabilita oproti kůži prasečí. Ale z porovnání výsledků této práce a z výsledků uvedených v publikaci od van de Sandt a kol. [5] bylo zjištěno, že jednou z nevýhod syntetické membrány Strat-M je několikanásobně rychlejší lag time kyseliny benzoové oproti lag time u lidské, prasečí i potkaní kůže. Tok byl srovnatelný s lidskou i prasečí kůží. Nejvhodnější alternativou lidské kůže je díky obdobné morfologii a propustnosti kůže prasečí. Z výsledků této práce a výsledků z publikace [5] bylo zjištěno, že parametry absorpce kyseliny benzoové (flux a lag time) přes prasečí kůži jsou s lidskou kůží

srovnatelné. Nevýhodou prasečí kůže je ale oproti syntetické membráně vysoká variabilita kůže způsobená například tloušťkou nebo různou hustotou ochlupení. Na vlastnosti kůže může mít vliv i doba skladování. Kůže skladovaná při -20 °C po dobu delší než jeden rok, může urychlovat absorpci látek skrz kůži.

S experimenty *in vitro* kožní penetrace se bude ve VUOS i nadále pokračovat. V budoucnu by bylo vhodné se zaměřit na testování se šroubovacími celami a zdokonalit vkládání kůže mezi donorovou a receptorovou část tak, aby byly eliminovány problémy s protékáním médií kolem kožního modelu.

..

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WHO. *Environmental Health Criteria 235 - Dermal Absorption* [online]. 2006 [cit. 2019-12-05].
Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>
- [2] OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 28* [online]. (2004)2 [cit. 2019-12-05].
Dostupné z: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>
- [3] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích, [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- [4] OECD. *OECD Guideline for Testing of Chemicals - Guideline 428: Skin Absorption: In Vitro Method* [online]. c2004c [cit. 2020-01-07]. Dostupné z: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en
- [5] VAN DE SANDT, J.J.M., J.A. VAN BURGSTEDEN, S. CAGE, et al. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2004, **39**(3), 271-281 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2004.02.004. ISSN 02732300. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230004000145>
- [6] DIEMBECK, W, H BECK, F BENECH-KIEFFER, et al. Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 1999, **37**(2-3), 191-205 [cit. 2020-01-10]. DOI: 10.1016/S0278-6915(98)00114-8. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691598001148>
- [7] The United States Pharmacopeial Convention (USP) General Chapter <1724> Semisolid drug products – performance tests, 2014
- [8] HOLMGAARD, R., Bo Nielsen, J., Dermal Absorption of Pesticides Evaluation of variability and Prevention, The Danish Environmental Protection Agency, University of Southern Denmark, Danish 2009, cit. [2020-02-29]. Dostupné z: <https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2009/978-87-7052-980-8/pdf/978-87-7052-981-5.pdf>
- [9] CHILCOTT, Robert P. a Shirley PRICE, ed. *Principles and Practice of Skin Toxicology* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2008 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1002/9780470773093. ISBN 9780470773093.

- [10] BOS, Jan D. a Marcus M. H. M. MEINARDI. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology* [online]. 2000, **9**(3), 165-169 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x. ISSN 0906-6705. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>
- [11] Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (SCCNFP), [online] 2003, [cit. 2020-01-17]. Opinion concerning „Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients.“ SCCNFP/0750/03.
- [12] GUTH, Katharina, Monika SCHÄFER-KORTING, Eric FABIAN, Robert LANDSIEDEL a Ben VAN RAVENZWAAY. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. 2015, **29**(1), 113-123 [cit. 2020-01-10]. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.09.007. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233314001714>
- [13] NIELSEN, J.B., I. PLASENCIA, J.A. SØRENSEN a L.A. BAGATOLLI. Storage Conditions of Skin Affect Tissue Structure and Subsequent in vitro Percutaneous Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2011, **24**(2), 93-102 [cit. 2020-01-10]. DOI: 10.1159/000322304. ISSN 1660-5535. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/322304>
- [14] Merck Millipore, Brochure: Test without limits, Overcome the barriers to predicting diffusion in human skin [online]. [cit. 2019-08-30]. Dostupné z: https://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/255210?v=636053819429970000
- [15] HAQ A, GOODYEAR B, AMEEN D, et al., Strat-M synthetic membrane: permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 547 (2018) 432–437, [cit. 2019-08-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29890259>
- [16] NG, Shiow-Fern, Jennifer ROUSE, Dominic SANDERSON a Gillian ECCLESTON. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics* [online]. 2010, **2**(2), 209-223 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.3390/pharmaceutics2020209. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1999-4923/2/2/209>
- [17] EPISKIN, <https://www.episkin.com/Episkin-Academy/News>
- [18] BD, Eman, Shereen YOUSUF, Michael PASTORE, Krishna TELAPROLU, Yousuf MOHAMMED, Sarika NAMJOSHI, Jeffrey GRICE a Michael ROBERTS. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and*

- Applications* [online]. 2016, **8**, 163-176 [cit. 2020-01-07]. DOI: 10.2147/CPAA.S64788. ISSN 1179-1438. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/skin-models-for-the-testing-of-transdermal-drugs-peer-reviewed-article-CPAA>
- [19] NG, Shioh-Fern, Jennifer J. ROUSE, Francis D. SANDERSON, Victor MEIDAN a Gillian M. ECCLESTON. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2010, **11**(3), 1432-1441 [cit. 2019-08-09]. DOI: 10.1208/s12249-010-9522-9. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-010-9522-9>
- [20] OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 28* [online]. (2004)2 [cit. 2019-12-05]. Dostupné z: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>
- [21] LAU, Wing Man a Keng Wooi NG. Finite and Infinite Dosing. DRAGICEVIC, Nina a Howard I. MAIBACH, ed. *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, 2017-05-05, s. 35-44 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.1007/978-3-662-53270-6_3. ISBN 978-3-662-53268-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-53270-6_3
- [22] In Vitro Percutaneous Penetration of Five Pesticides—Effects of Molecular Weight and Solubility Characteristics. *The Annals of Occupational Hygiene* [online]. 2004 [cit. 2020-01-08]. DOI: 10.1093/annhyg/meh070. ISSN 1475-3162. Dostupné z: <https://academic.oup.com/annweh/article/48/8/697/139722>
- [23] KOTINGOVÁ, Lenka. *Kinetika vybraných látek při dermální expozici: (Polycyklické aromatické uhlovodíky)*. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- [24] OECD. *OECD Guidance notes on dermal absorption - No. 156* [online]. 2011 [cit. 2020-03-09]. Dostupné z: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>
- [25] WILLIAMS, Adrian C a Brian W BARRY. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2004, **56**(5), 603-618 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.025. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X03002412>

- [26] BENSON, Heather. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery* [online]. 2005, **2**(1), 23-33 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.2174/1567201052772915. ISSN 15672018. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=2&issue=1&spage=23>
- [27] HANSCH, C.; Leo, A; Hoekman, D. Exploring QSAR. *Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants* [online], American Chemical Society; Washington, DC, 1995, [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1021/jm950902o. ISBN 0-8412-2993-7 Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm950902o>
- [28] BERTHOD, Alain, Yoon Il HAN a Daniel W. ARMSTRONG. Centrifugal Partition Chromatography. V. Octanol-Water Partition Coefficients, Direct and Indirect Determination. *Journal of Liquid Chromatography* [online]. 1988, **11**(7), 1441-1456 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1080/01483918808067185. ISSN 0148-3919. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01483918808067185>
- [29] BELOBORODOVA, Natalia, Iskander BAIRAMOV, Andrei OLENIN, Victoria SHUBINA, Vera TEPLOVA a Nadezhda FEDOTCHEVA. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2012, **19**(1) [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1186/1423-0127-19-89. ISSN 1423-0127. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/89>
- [30] NIELSEN, Jesper B. Natural Oils Affect the Human Skin Integrity and the Percutaneous Penetration of Benzoic Acid Dose-Dependently. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology* [online]. 2006, **98**(6), 575-581 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_388.x. ISSN 1742-7835. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_388.x
- [31] GUILLORY, J. Keith. Handbook of Aqueous Solubility Data By Samuel H. Yalkowsky and Yan He. CRC Press, Boca Raton, FL. 2003. xii + 1496 pp. 18 × 26 cm. ISBN 0-89493-1532-8. \$299.95. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2003, **46**(19), 4213-4213 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1021/jm0303251. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm0303251>
- [32] International Organization for Standardization, Guide 8402: Quality Vocabulary, ISP, Geneva, 1994.
- [33] <http://www.hplc.cz/>, [cit. 2019-07-24].

- [34] GUPTA Vibha, Ajay Deep Kumar JAIN, N.S. GILL, Kapil UPTA. Development and validation of HPLC method – a review. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry* [online]. 2012, 2(4), 17-25. [cit. 2019-07-24]. ISSN 2249734X. Dostupné z: [http://www.irjpas.com/view_content.php?quat=2&date=29-08-2012\(2012\)&issue=4](http://www.irjpas.com/view_content.php?quat=2&date=29-08-2012(2012)&issue=4)
- [35] ÉPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 2004, 38(4), 212-228 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c. ISSN 0091-150X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/225876313_Validation_of_HPLC_Techniques_for_Pharmaceutical_Analysis. Verze přeložena z: *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 38(4), 40-56, 2004.
- [36] ARAUJO, Pedro. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, 877(23), 2224-2234 [cit. 2019-07-24]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.09.030. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023208007265>
- [37] BEZROUK, Aleš, Zdeněk FIALA, Lenka KOTINGOVÁ, Iva Selke KRULICHOVÁ, Monika KOPEČNÁ a Kateřina VÁVROVÁ. SAMPA: A free software tool for skin and membrane permeation data analysis. *Toxicology in Vitro* [online]. 2017, **44**, 361-371 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.07.017. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233317302035>
- [38] OECD. *OECD Guideline for Testing of Chemicals – Guideline No. 105: Water Solubility* [online]. 27.7. 1995 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069589-en.pdf?expires=1583228236&id=id&accname=guest&checksum=4A92A9BB0676A267F6A9A4F36E5538C3>
- [39] DESMEDT, Bart, Patricia COURSELLE, Jacques O. DE BEER, Vera ROGIERS, Eric DECONINCK a Kristien DE PAEPE. In vitro Dermal Absorption: Sample Application and Seal Quality in a Franz Diffusion Cell System. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. 2015, **28**(5), 245-249 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1159/000375321. ISSN 1660-5527. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/375321>
- [40] HUBKA, Tomáš. *Verifikace testovacího zařízení pro in vitro test kožní penetrace jako alternativní test toxicity*. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.

7 PŘÍLOHY

Příloha A – Souhrn provedených pokusů a výsledků

Příloha B – Pokus č. 1: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 400 rpm

Příloha C – Pokus č. 1 – graf a pozorování

Příloha D – Pokus č. 2: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

Příloha E – Pokus č. 2 – graf a pozorování

Příloha F – Pokus č. 3: VDC s kovovou klemou, Strat-M – předem máčena, konečná dávka, 600 rpm

Příloha G – Pokus č. 3 – graf + pozorování

Příloha H – Pokus č. 4: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm, předeřtáté doplňované médium (32 °C)

Příloha I – Pokus č. 4 – graf + pozorování

Příloha J – Pokus č. 5: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

Příloha K – Pokus č. 5 – graf + pozorování

Příloha L – Pokus č. 6: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

Příloha M – Pokus č. 6 – graf + pozorování

Příloha N – Pokus č. 7: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

Příloha O – Pokus č. 7 – graf + pozorování

Příloha P – Pokus č. 8: VDC se šroubením, prasečí kůže, konečná dávka, 600 rpm

Příloha Q – Pokus č. 8 – graf + pozorování

Příloha R – Pokus č. 9: VDC se šroubením, Strat-M, nekonečná dávka, 600 rpm

Příloha S – Pokus č. 9 – graf + pozorování

Příloha T – Pokus č. 10: VDC se šroubením, prasečí kůže, konečná dávka, 600 rpm

Příloha U – Pokus č. 10 – graf + pozorování

Příloha V – Pokus č. 11: VDC se šroubením, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

Příloha W – Pokus č. 11 – graf + pozorování

Příloha A – Souhrn provedených pokusů a výsledků

Pokus č.		1	2	3	4	5	6	7
Cela	Typ upínání	klema	klema	klema	klema	klema	klema	klema
	Povrch [cm ²]	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77
	Počet vyhodnocených ks	8	6	9	8	8	8	8
Membrána	Typ	Strat-M	Strat-M	Strat-M	Strat-M	Strat-M	Strat-M	Strat-M
	Předem máčena [min]	NE	NE	30 min ve FR	NE	NE	NE	NE
Aplikace kys. benzoové	Aplikovaný objem [μl]	45	45	45	45	45	45	45
	Koncentrace látky [g/l]	4	4	4	4	4	4	4
	Rozpouštědlo (donor)	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH
Receptorové médium	Typ	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok
	Objem [ml]	11	11	11	11	11	11	11
	Teplota doplň. média [°C]	laboratorní teplota	laboratorní teplota	laboratorní teplota	32 °C	laboratorní teplota	laboratorní teplota	laboratorní teplota
Rychlost míchání [rpm]		400	600	600	600	600	600	600
Odběr	Objem [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Okluze		NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Lag time [h] / RSD [%]		0,08 / 70	0,07 / 107	0,25 / 70	0,11 / 64	0,13 / 98	0,11 / 97	0,19 / 105
Flux [μg/cm²/h] / RSD [%]		8,6 / 14	17,6 / 19	15,4 / 32	8,6 / 30	25,7 / 48	9,8 / 19	21,5 / 17

Příloha A – pokračování

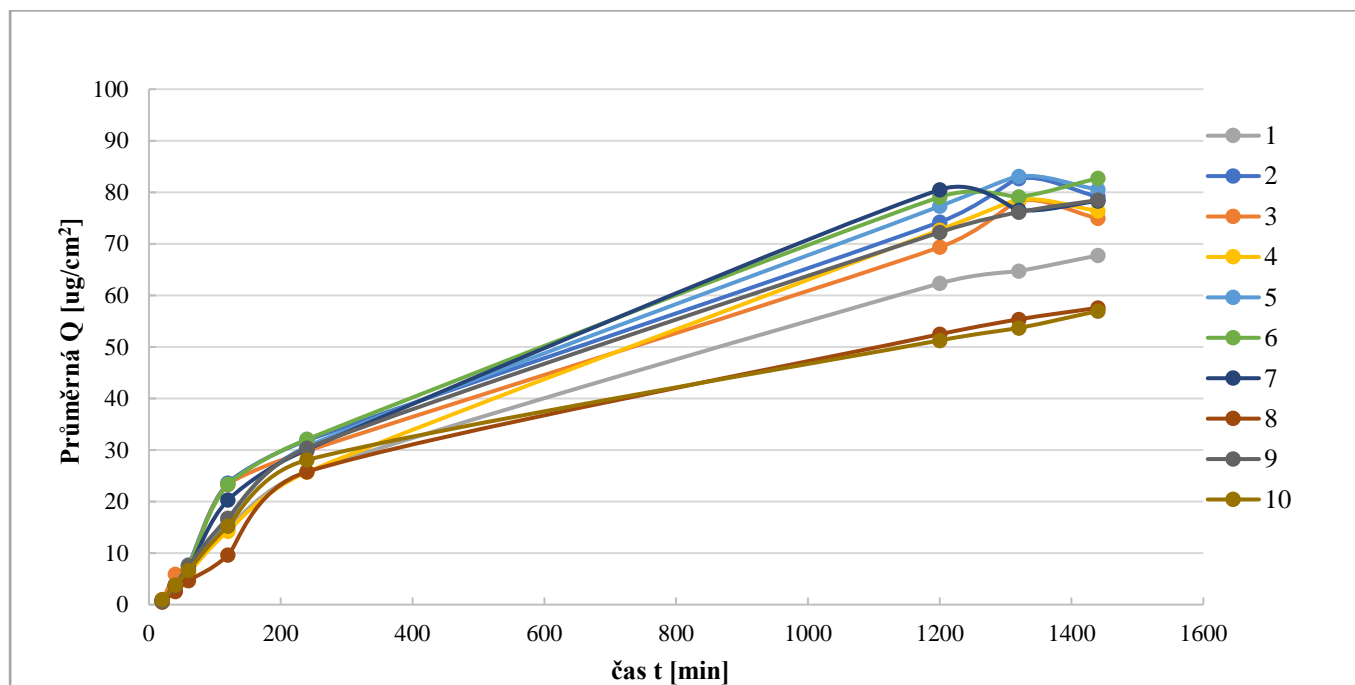
Pokus č.		8	9	10	11
Cela	Typ upínání	šroubení	šroubení	šroubení	šroubení
	Povrch [cm ²]	1,77	1,77	1,77	1,77
	Počet vyhodnocených ks	8	9	8	9
Membrána	Typ	Prasečí kůže (břicho)	Strat-M	Prasečí kůže (břicho)	Strat-M
	Předem máčena [min]	NE	NE	NE	NE
Aplikace kys. benzoové	Aplikovaný objem [μl]	45	450	45	45
	Koncentrace látky [g/l]	4	4	4	4
	Rozpouštědlo (donor)	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH	50% EtOH
Receptorové médium	Typ	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok	Fyziologický roztok
	Objem [ml]	12	12	12	12
	Teplota doplň. média [°C]	laboratorní teplota	laboratorní teplota	laboratorní teplota	laboratorní teplota
Rychlost míchání [rpm]		600	600	600	600
Odběr	Objem [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5
Okluze		NE	NE	NE	NE
Lag time [h] / RSD [%]		0,88 / 86	1,04 / 14	0,64 / 84	0,03 / 197
Flux [μg/cm²/h] / RSD [%]		21,3 / 46	236 / 31	29,5 / 79	32,9 / 37

Příloha B – Pokus č. 1: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 400 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 200 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	0,60	3,0	6,2	14,6	25,8	62,3	64,7	67,7	7,0	0,07
2	0,84	3,9	7,7	23,6	31,9	74,2	82,7	79,2	9,6	0,02
3	0,72	5,9	7,5	23,3	29,8	69,3	78,3	75,0	10,8	0,00
4	0,59	3,2	6,1	14,2	25,7	72,7	78,6	76,4	7,0	0,12
5	0,77	3,3	6,8	16,4	30,7	77,3	83,1	80,5	8,4	0,19
6	0,64	3,5	7,4	23,3	32,1	79,1	79,1	82,7	9,4	0,06
7	0,85	3,7	6,8	20,3	30,1	80,5	76,5	78,3	8,8	0,14
8*	0,50	2,5	4,6	9,6	25,8	52,5	55,4	57,6	7,4	0,53
9	0,69	3,7	7,5	16,8	30,4	72,2	76,1	78,5	8,2	0,07
10*	1,0	3,8	6,7	15,2	28,1	51,3	53,7	57,0	8,0	0,16
Průměr	0,71	3,8	7,0	19,1	29,6	73,5	77,4	77,3	8,6	0,08
Medián	0,71	3,6	7,1	18,5	30,2	73,5	78,4	78,4	8,6	0,07
SD	0,09	0,9	0,6	3,8	2,3	5,5	5,3	4,2	1,2	0,06
RSD %	13	23	8	20	8	7	7	5	14	70

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha C – Pokus č. 1 – graf a pozorování



Pozorování:

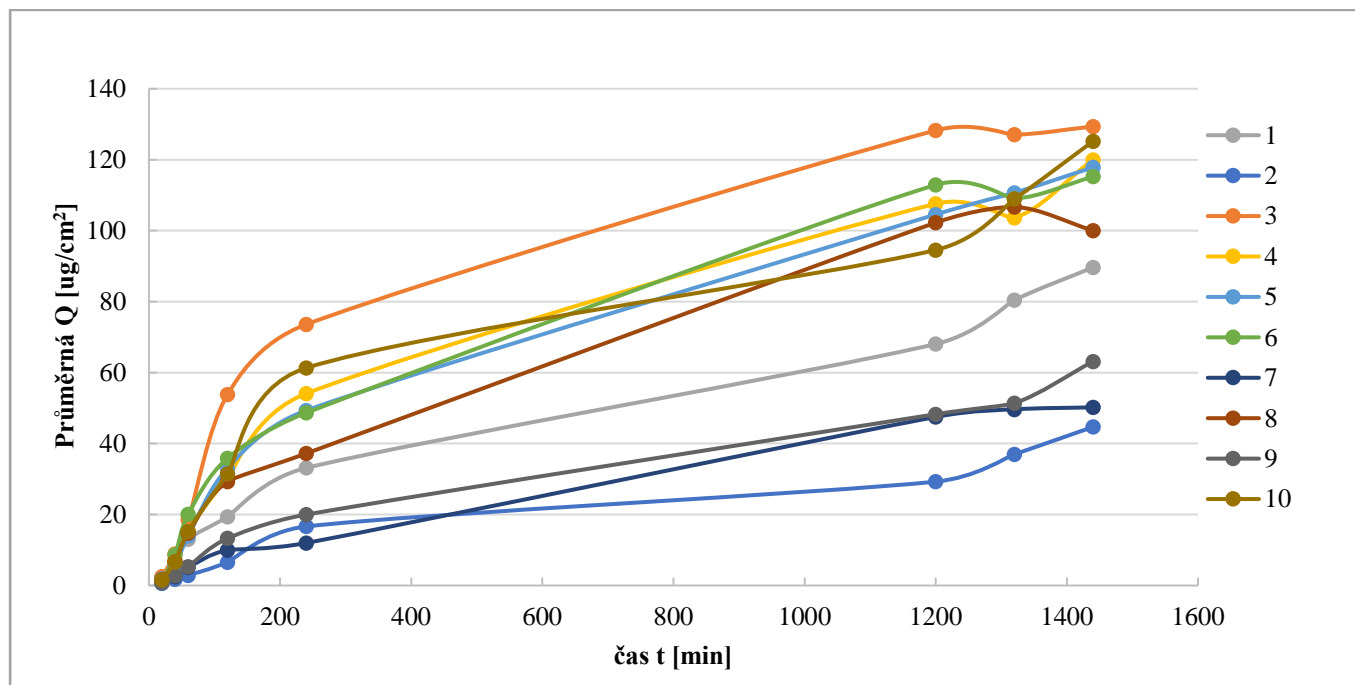
U cel 8 a 10 byla zpozorována před odběrem F bublina pod membránou. Na konci pokusu byly cely zasoleny. Zasolení bylo způsobeno únikem fyziologického roztoku kolem membrány na povrch cel kvůli netěsnosti membrány v cele. Vzhledem k netěsnosti cel a bublině pod membránou, která se vytvořila mezi odběrem E a F, jsou z grafu patrné pozvolnější křivky kumulativního množství u cely 8 a 10.

Příloha D – Pokus č. 2: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 200 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1*	1,2	7,2	13,1	19,4	33,1	68,1	80,4	89,7	0,0	0,00
2*	0,6	1,8	2,9	6,6	16,6	29,3	37,0	44,7	0,0	0,00
3	2,5	8,9	18,6	53,8	73,6	128	127	129	23,9	0,12
4	1,4	6,7	15,3	30,3	54,1	108	104	120	15,4	0,09
5	1,8	5,7	13,9	33,0	49,4	105	111	118	14,8	0,01
6	1,4	8,7	20,1	35,9	48,7	113	109	115	19,7	0,00
7*	1,1	2,6	5,1	10,0	12,0	47,5	49,6	50,2	4,9	0,00
8	1,7	6,6	14,8	29,3	37,2	102	107	100	14,3	0,00
9*	0,80	8,2	5,3	13,3	20,0	48,3	51,4	63,1	0,0	0,00
10	1,6	6,6	15,2	31,5	61,3	94,6	109	125	17,6	0,20
Průměr	1,7	7,2	16,3	35,7	54,1	108	111	118	17,6	0,07
Medián	1,6	6,7	15,3	32,3	51,7	106	109	119	16,5	0,05
SD	0,4	1,2	2,2	8,4	11,3	11	8	9	3,4	0,07
RSD %	22	16	14	24	21	10	7	8	19	107

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha E – Pokus č. 2 – graf a pozorování



Pozorování:

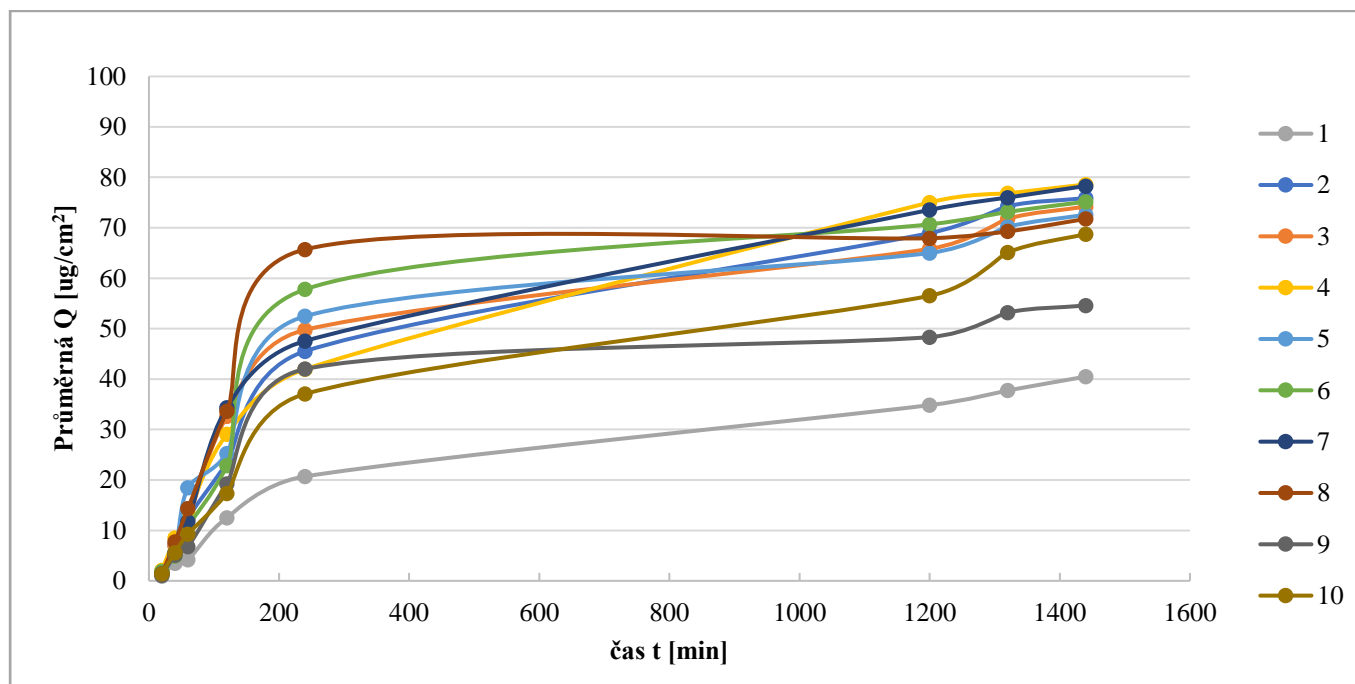
U cel 1, 2, 7 a 9 byly před odběrem F zpozorovány bubliny pod membránou. Tyto bubliny zřejmě zamezily difuzi kyseliny benzoové do receptorového média. Bubliny byly při odběru F odstraněny. Na konci pokusy byly tyto cely zasoleny.

Příloha F – Pokus č. 3: VDC s kovovou klemou, Strat-M – předem máčena, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	0,94	3,5	4,2	12,5	20,7	34,8	37,7	40,5	6,2	0,14
2	1,7	7,2	12,5	23,4	45,5	68,9	74,3	75,9	13,6	0,17
3	1,5	6,9	12,1	32,6	49,8	65,8	71,8	74,2	17,0	0,22
4	2,1	8,5	13,6	29,1	42,0	75,0	76,8	78,6	14,2	0,01
5	1,4	5,7	18,5	25,3	52,5	65,0	70,2	72,6	16,7	0,22
6	1,9	5,0	10,8	22,8	57,8	70,7	73,2	75,2	19,3	0,62
7	1,5	5,5	11,7	34,4	47,6	73,5	76,0	78,3	15,9	0,17
8	1,3	7,7	14,3	33,7	65,7	67,9	69,3	71,8	24,9	0,47
9*	1,1	5,1	6,8	19,2	42,0	48,3	53,2	54,6	14,4	0,54
10	1,4	5,6	9,3	17,4	37,1	56,5	65,1	68,8	10,6	0,21
Průměr	1,5	6,2	11,9	25,7	46,5	64,3	68,3	70,6	15,4	0,25
Medián	1,5	5,7	12,1	25,3	47,6	67,9	71,8	74,2	15,9	0,21
SD	0,3	1,4	3,7	7,1	12,1	11,6	11,3	11,1	5,0	0,17
RSD %	21	23	31	28	26	18	17	16	32	70

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha G – Pokus č. 3 – graf + pozorování



Pozorování:

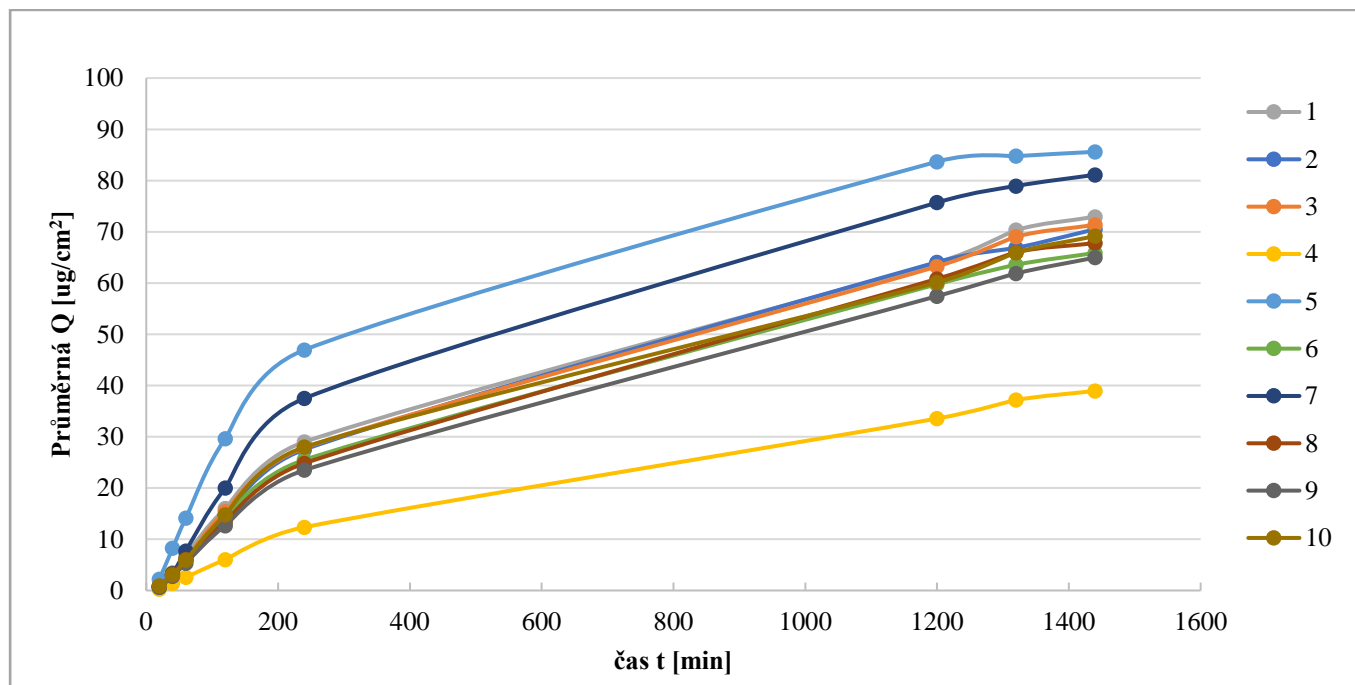
Cela č. 9 byla již před odběrem D zasolená. U cely č. 4, 8 a 9 byl pozorována před odběrem F bublina pod membránou. Bubliny byly odstraněny.

Příloha H – Pokus č. 4: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm, předeřtáé doplňované médium (32 °C)

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	0,86	3,5	6,9	16,0	29,0	64,0	70,3	73,0	7,8	0,07
2	0,82	3,1	6,0	14,7	27,5	64,1	66,9	70,5	7,4	0,14
3	0,70	3,1	6,1	15,4	27,9	63,2	69,1	71,4	7,5	0,11
4*	0,26	1,4	2,6	6,1	12,4	33,6	37,2	39,0	3,1	0,01
5	2,23	8,2	14,1	29,7	47,0	83,7	84,8	85,6	14,6	0,05
6	0,70	3,3	6,2	14,5	25,5	59,8	63,6	65,9	7,0	0,06
7	0,64	3,3	7,7	20,0	37,5	75,7	78,9	81,1	10,8	0,28
8*	0,87	3,2	6,1	13,5	24,8	60,8	66,0	67,8	6,6	0,04
9	0,63	2,8	5,4	12,7	23,5	57,4	61,9	65,0	6,2	0,05
10	0,93	3,1	5,9	14,8	28,0	60,1	66,0	69,2	7,6	0,14
Průměr	0,94	3,8	7,3	17,2	30,7	66,0	70,2	72,7	8,6	0,11
Medián	0,76	3,2	6,1	15,1	27,9	63,6	68,0	70,9	7,5	0,09
SD	0,50	1,7	2,7	5,1	7,2	8,4	7,4	6,7	2,6	0,07
RSD %	53	45	37	30	24	13	10	9	30	64

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha I – Pokus č. 4 – graf + pozorování



Pozorování:

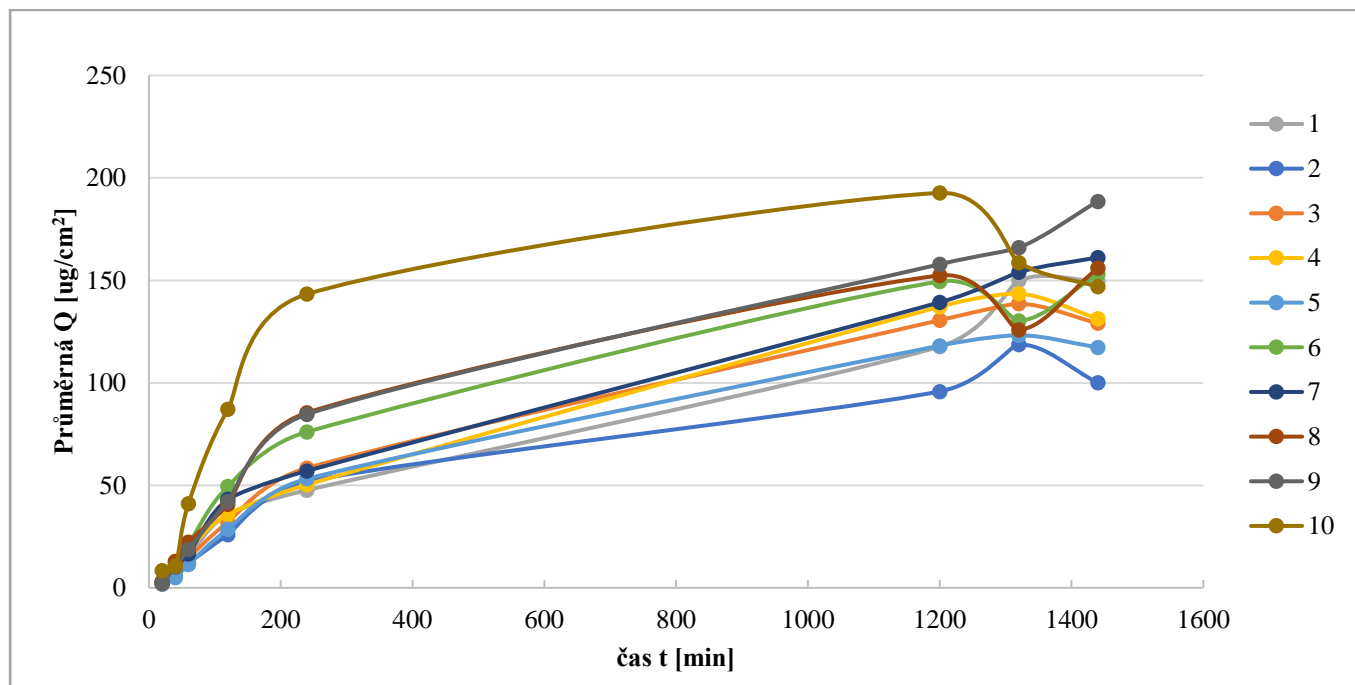
U cely č. 5 byla pozorována před odběrem F bublina pod membránou. Cely č. 4 a 8 byly na konci pokusu zasoleny.

Příloha J – Pokus č. 5: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	1,9	8,1	15,4	36,1	47,7	118	150	150	29,1	0,00
2*	2,4	7,1	12,1	26,0	51,9	95,8	119	100	14,5	0,18
3	1,8	8,3	14,6	32,0	58,5	131	139	129	16,5	0,15
4	2,3	8,3	18,3	35,9	50,4	137	144	131	16,0	0,01
5	1,9	5,0	11,4	28,5	53,2	118	123	117	15,2	0,26
6	2,7	12,4	21,2	49,4	76,1	149	130	153	23,4	0,06
7	2,7	10,5	16,6	43,3	57,1	139	154	161	26,8	0,00
8*	3,2	13,0	22,3	40,8	85,5	152	126	156	24,9	0,21
9	2,1	10,2	18,7	42,2	84,7	158	166	189	23,3	0,18
10	8,4	10,7	41,1	87,2	143	193	159	147	55,4	0,36
Průměr	3,0	9,2	19,7	44,3	71,4	143	146	147	25,7	0,13
Medián	2,2	9,3	17,5	39,1	57,8	138	147	148	23,3	0,11
SD	2,1	2,1	8,6	17,4	29,7	23	14	21	12,2	0,12
RSD %	70	23	44	39	42	16	9	14	48	98

* vyrazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha K – Pokus č. 5 – graf + pozorování



Pozorování:

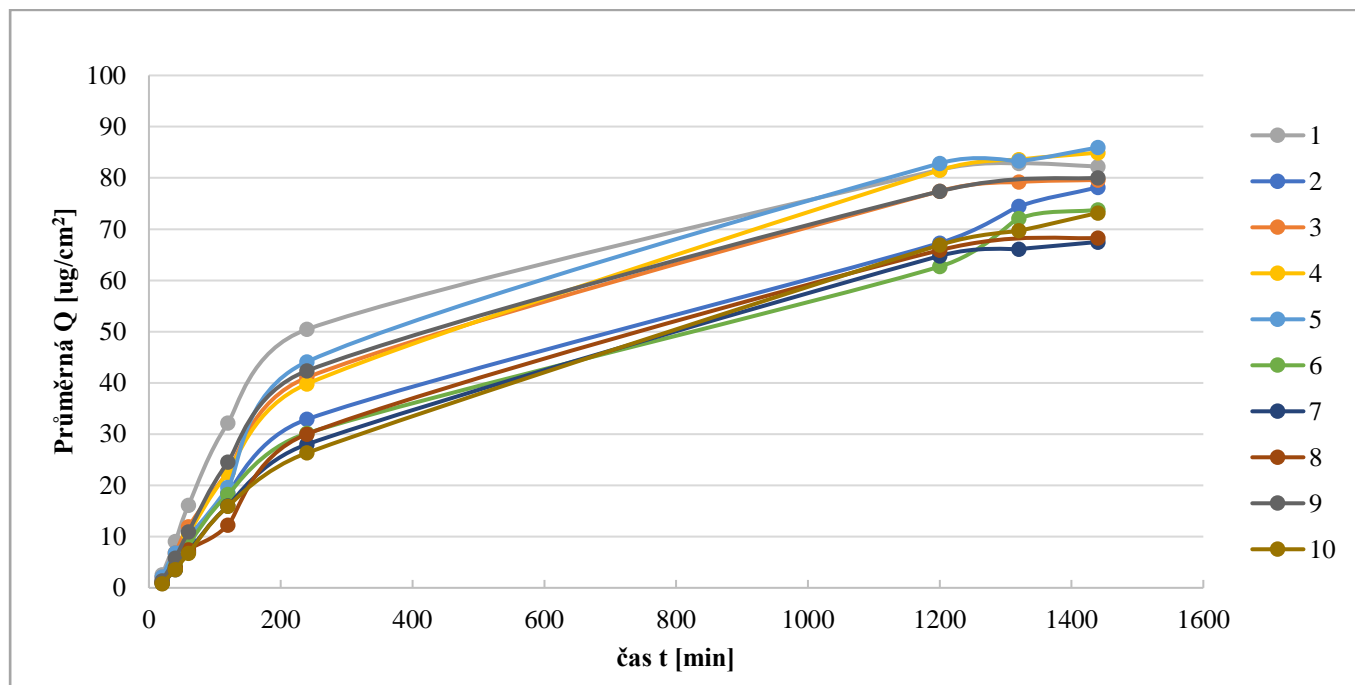
U cely č. 2 byly při odběru D pozorovány menší bublinky v receptorovém médiu. Před odběrem F byly u cel č. 2 a 8 pozorovány bubliny pod membránou. Tyto cely byly také zasoleny.

Příloha L – Pokus č. 6: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1*	2,5	9,0	16,1	32,2	50,5	81,6	82,8	82,2	16,3	0,06
2	1,3	4,8	9,2	18,5	32,9	67,3	74,4	78,2	9,5	0,00
3	2,1	6,8	11,9	22,6	41,1	77,4	79,2	79,6	12,0	0,07
4	1,1	4,5	10,4	22,5	39,8	81,5	83,6	84,9	11,4	0,14
5	2,2	6,8	N.D.	19,7	44,1	82,8	83,3	85,9	12,5	0,29
6	1,0	4,3	8,5	18,2	30,2	62,7	72,1	73,8	9,7	0,00
7	0,9	3,6	7,0	16,0	28,0	64,8	66,1	67,5	7,8	0,10
8	1,2	3,9	7,4	12,2	30,0	65,9	N.D.	68,3	8,2	0,27
9*	1,4	5,8	11,0	24,5	42,4	77,4	N.D.	80,0	12,5	0,14
10	0,83	3,6	6,7	15,9	26,3	66,9	69,7	73,2	7,4	0,01
Průměr	1,3	4,8	8,7	18,2	34,1	71,2	75,5	76,4	9,8	0,11
Medián	1,1	4,4	8,5	18,4	31,5	67,1	74,4	76,0	9,6	0,09
SD	0,5	1,2	1,8	3,3	6,2	7,5	6,3	6,5	1,8	0,11
RSD %	38	26	20	18	18	11	8	9	19	97

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha M – Pokus č. 6 – graf + pozorování



Pozorování:

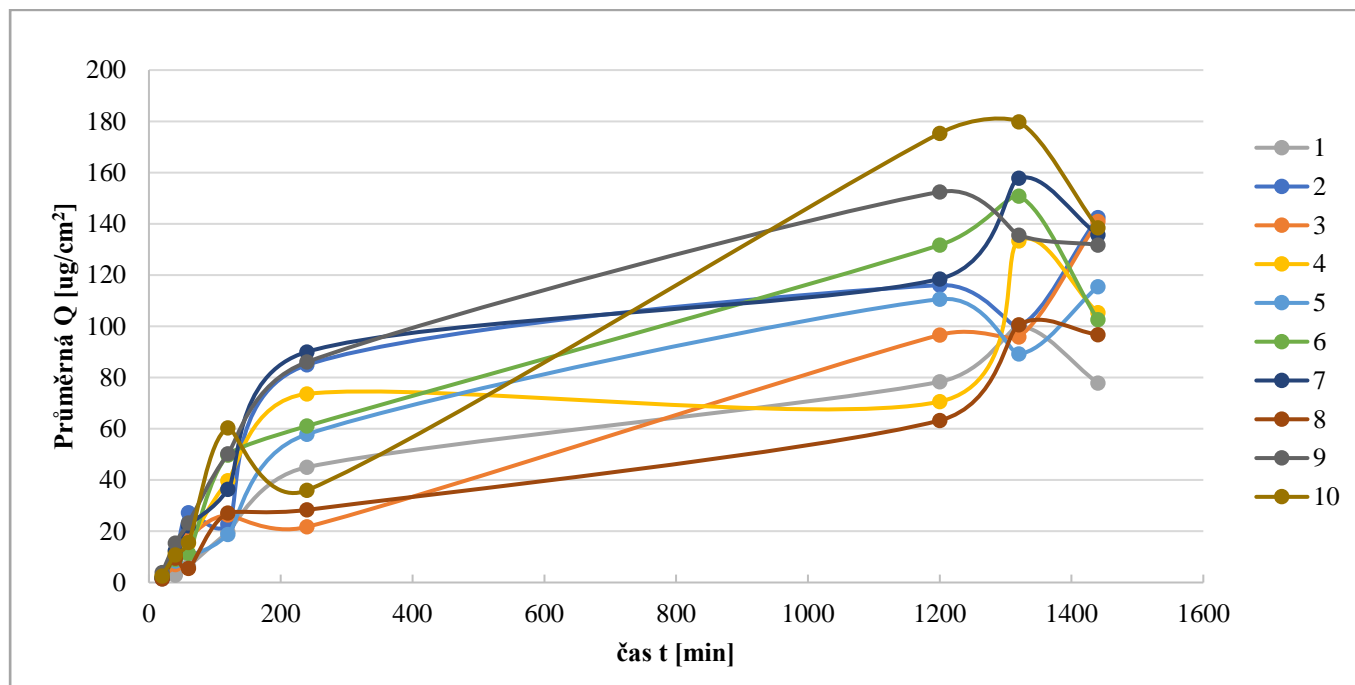
Při odběru A bylo pozorováno protékání cely č. 1 (kapky pod parafilmem). Před odběrem F bylo pozorováno zasolení cel a bubliny pod membránou u cel č. 1 a 9.

Příloha N – Pokus č. 7: VDC s kovovou klemou, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1*	2,1	3,0	6,4	19,7	45,0	78,3	99,9	77,9	13,7	0,57
2	1,5	8,9	27,3	22,8	85,0	116	100	142	24,6	0,45
3	2,1	7,1	17,1	26,4	21,7	96,6	95,9	141	-	0,00
4	2,5	11,9	15,5	39,7	73,6	70,6	133	105	23,5	0,28
5	1,9	8,4	12,0	18,8	57,9	111	89,3	115	16,8	0,53
6	1,9	9,1	11,4	49,8	61,1	132	151	103	19,7	0,12
7*	1,9	12,5	22,2	36,4	90,1	119	158	136	26,5	0,35
8	1,4	9,5	5,5	27,2	28,4	63,3	101	96,8	-	0,00
9	3,9	15,5	23,3	50,2	86,1	152	136	132	26,7	0,12
10	2,6	10,8	15,6	60,3	36,0	175	180	138	17,8	0,00
Průměr	2,2	10,1	16,0	36,9	56,2	115	123	122	21,5	0,19
Medián	2,0	9,3	15,6	33,4	59,5	113	117	124	21,6	0,12
SD	0,7	2,4	6,4	14,3	23,5	36	30	18	3,6	0,20
RSD %	33	24	40	39	42	31	24	14	17	105

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha O – Pokus č. 7 – graf + pozorování



Pozorování:

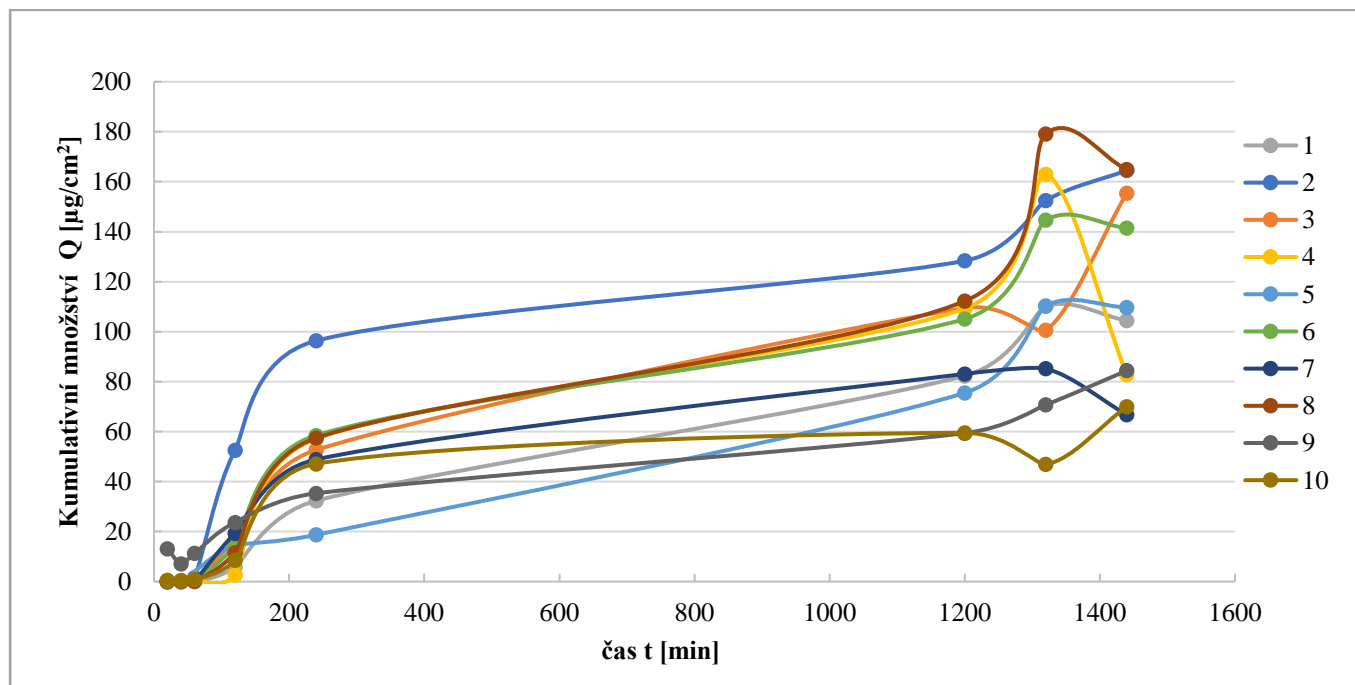
Cela č. a 7 byly zasoleny.

Příloha P – Pokus č. 8: VDC se šroubením, prasečí kůže, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	0,00	0,00	0,00	5,8	32,4	82,3	110	104	6,2	0,24
2	0,00	0,00	1,6	52,6	96,4	128	153	165	34,6	0,77
3	0,00	0,00	0,31	16,9	52,7	109	101	155	18,6	1,18
4	0,31	0,28	0,56	2,6	57,1	109	163	82,8	35,2	2,37
5	0,00	0,08	0,11	14,5	18,7	75,5	110	110	-	0,00
6	0,64	0,45	0,49	14,5	58,5	105	145	141	23,1	1,47
7	0,08	0,14	0,47	19,3	48,9	83,1	85,2	66,7	17,8	1,04
8	0,18	0,20	0,21	11,7	57,4	112	179	165	13,8	0,00
9*	<i>13,1</i>	<i>7,2</i>	<i>11,3</i>	<i>23,7</i>	<i>35,3</i>	<i>59,4</i>	<i>70,8</i>	<i>84,4</i>	-	<i>0,00</i>
10*	<i>0,15</i>	<i>0,29</i>	<i>0,89</i>	<i>8,5</i>	<i>47,1</i>	<i>59,5</i>	<i>47,0</i>	<i>70,0</i>	<i>23,6</i>	<i>1,68</i>
Průměr	0,15	0,15	0,47	17,2	52,8	101	131	124	21,3	0,88
Medián	0,04	0,11	0,39	14,5	54,9	107	127	126	18,6	0,90
SD	0,21	0,15	0,48	14,3	21,1	17	31	36	9,8	0,76
RSD %	140	105	101	83	40	17	24	29	46	86

* vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha Q – Pokus č. 8 – graf + pozorování



Pozorování:

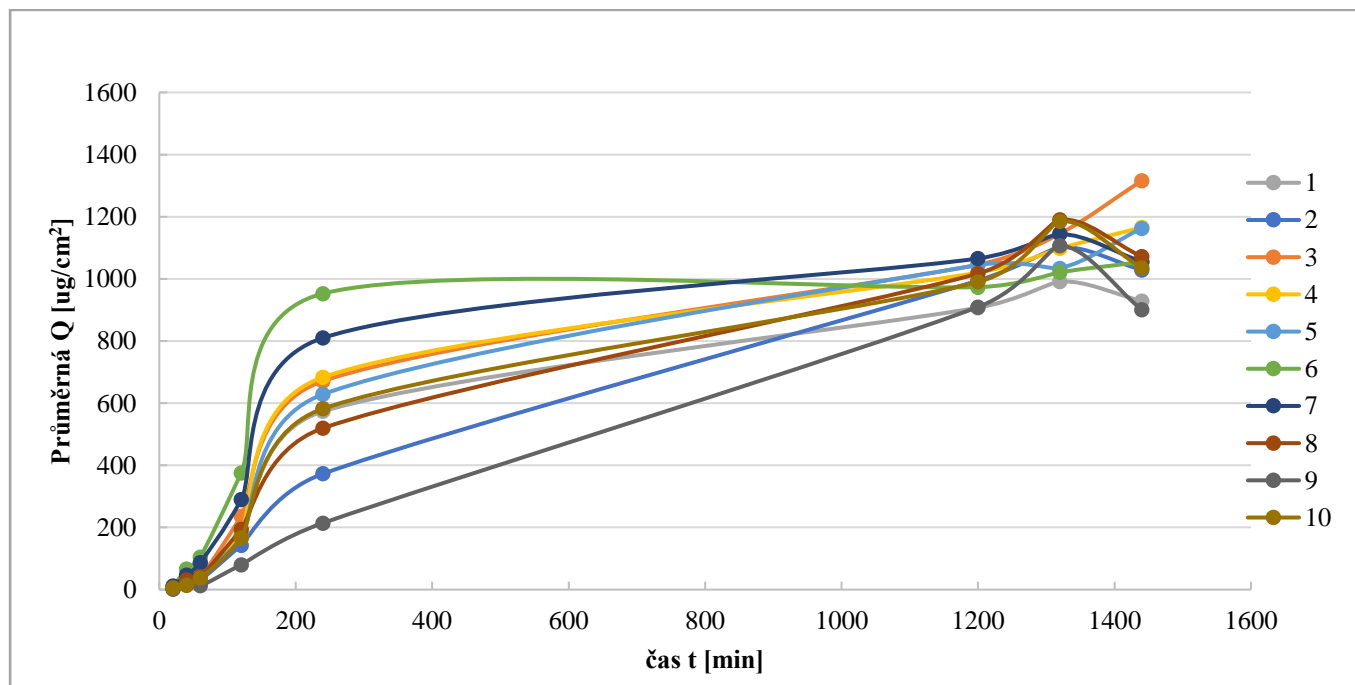
Cela č. 9 a 10 protékaly vlivem nedokonalého umístění kožního preparátu do donoru a u cely č. 10 k protékání přispěl i chybějící těsnící kroužek pod kožním preparátem.

Příloha R – Pokus č. 9: VDC se šroubením, Strat-M, nekonečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	2,8	15,3	45,3	178	574	907	992	929	207	1,11
2	3,6	18,7	31,0	143	373	995	1102	1029	119	0,86
3	7,0	33,2	42,2	236	671	1046	1146	1316	232	0,99
4	6,8	25,3	49,8	191	684	1020	1098	1165	257	1,22
5	5,8	32,8	45,0	167	629	1044	1034	1163	235	1,26
6	10,1	66,1	105	376	953	974	1021	1054	396	0,95
7	12,4	46,6	87,4	290	810	1066	1145	1055	292	0,92
8	4,3	31,2	42,0	194	520	1017	1190	1072	169	0,87
9*	<i>1,5</i>	<i>16,1</i>	<i>12,4</i>	<i>80</i>	<i>214</i>	<i>910</i>	<i>1107</i>	<i>901</i>	<i>88,9</i>	<i>1,49</i>
10	5,7	14,4	37,5	167	582	990	1186	1036	214	1,22
Průměr	6,5	31,5	53,9	216	644	1007	1102	1091	236	1,04
Medián	5,8	31,2	45,0	191	629	1017	1102	1055	232	0,99
SD	2,9	15,6	23,5	70	157	45	68	104	74	0,15
RSD %	45	50	44	32	25	5	6	10	31	14

*vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha S – Pokus č. 9 – graf + pozorování



Pozorování:

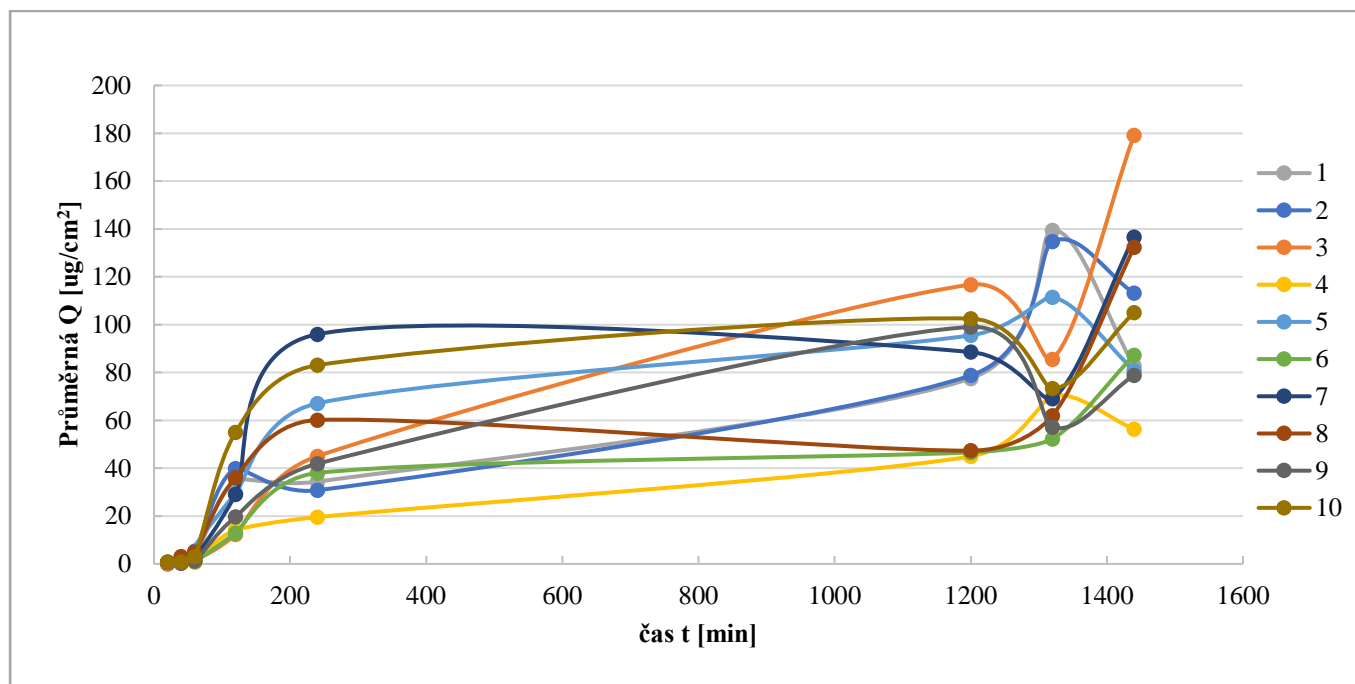
U cely č. 9 bylo pozorováno protékání po 2 hodinách od začátku pokusu. Cela do konce pokusu protékala.

Příloha T – Pokus č. 10: VDC se šroubením, prasečí kůže, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
1	0,06	0,40	2,1	35,0	34,4	77,6	139	82,9	10,6	0,08
2	0,14	1,4	5,4	39,9	30,8	78,8	135	113	-	0,00
3*	0,05	1,9	1,6	12,3	45,0	117	85,6	179	-	0,00
4	0,81	0,49	0,7	14,2	19,6	44,9	70,3	56,4	5,4	0,00
5	0,58	0,84	2,4	29,5	67,1	95,5	112	80,9	24,8	0,91
6*	0,72	0,92	1,1	12,9	38,0	46,6	52,3	87,3	13,9	1,11
7	0,66	0,53	2,9	29,1	96,0	88,6	69,1	137	72,4	1,60
8	0,77	3,1	5,0	36,0	60,2	47,3	62,0	132	22,8	0,63
9	0,64	0,28	1,3	19,7	41,9	99,0	57,1	78,8	14,3	0,85
10	0,71	0,83	3,1	55,0	83,1	103	73,3	105	56,1	1,02
Průměr	0,55	0,99	2,9	32,3	54,1	79,3	89,7	98,3	29,5	0,64
Medián	0,65	0,68	2,7	32,2	51,0	83,7	71,8	93,9	22,8	0,74
SD	0,27	0,86	1,5	11,7	25,2	20,9	31,4	26,4	23,3	0,54
RSD %	49	87	54	36	47	26	35	27	79	84

*vyřazená data z důvodu protékání cel (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha U – Pokus č. 10 – graf + pozorování



Pozorování:

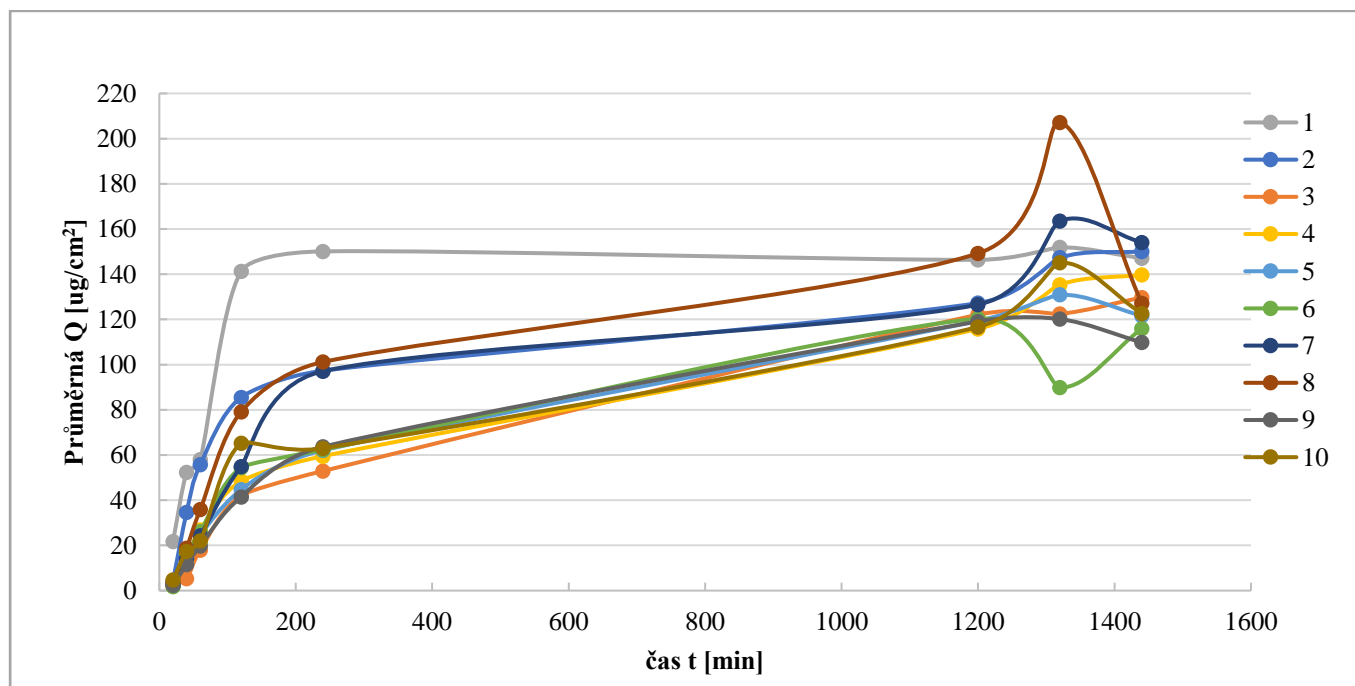
Z cel číslo 3 a 6 byla po 20 hodinách vyteklá značná část receptorového média. Médium bylo doplněno a poté až do konce pokusu nedošlo k dalšímu úniku.

Příloha V – Pokus č. 11: VDC se šroubením, Strat-M, konečná dávka, 600 rpm

VDC č.	Kumulativní množství Q [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]								Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]
	A 20 min	B 40 min	C 60 min	D 120 min	E 240 min	F 1 260 min	G 1 320 min	H 1 440 min		
<i>1*</i>	<i>21,8</i>	<i>52,3</i>	<i>58,0</i>	<i>141</i>	<i>150</i>	<i>146</i>	<i>152</i>	<i>147</i>	<i>96,4</i>	<i>0,20</i>
2	4,22	34,7	55,8	85,6	97,3	127	147	150	62,1	0,00
3	3,51	5,3	17,9	42,1	52,9	122	122	130	19,2	0,00
4	2,22	13,2	26,9	48,5	59,5	116	135	140	37,4	0,00
5	3,34	16,1	19,9	44,7	62,1	119	131	122	24,6	0,00
6	1,75	16,4	26,1	54,5	62,4	120	90	116	29,3	0,00
7	2,73	14,3	24,3	54,9	97,1	127	164	154	30,3	0,20
8	3,51	18,8	35,9	79,2	101	149	207	127	36,9	0,04
9	2,37	11,5	19,8	41,4	63,7	119	120	110	20,2	0,05
10	4,70	17,3	22,0	65,2	63,0	117	145	123	36,4	0,00
Průměr	3,15	16,4	27,6	57,3	73,2	124	140	130	32,9	0,03
Medián	3,34	16,1	24,3	54,5	63,0	120	135	127	30,3	0,00
SD	0,91	7,5	11,1	15,2	18,2	10	31	14	12,2	0,06
RSD %	29	46	40	26	25	8	22	11	37	197

*vyřazená data (nezapočítány do vyhodnocení)

Příloha W – Pokus č. 11 – graf + pozorování



Pozorování:

Během pokusu neprotékala žádná z deseti použitých cel. Po čtyřech hodinách se u cely č. 4,6,9 a 10 objevila pod membránou bublina, která byla odstraněna. Po 20 h byla bublina v celách č. 2,4,9 a 10. Bubliny byly taktéž odstraněny.