

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Tomáš Hubka

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Verifikace testovacího zařízení pro *in vitro* test kožní penetrace jako  
alternativní test toxicity

Bc. Tomáš Hubka

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš Hubka**  
Osobní číslo: **C17460**  
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Název tématu: **Verifikace testovacího zařízení pro in vitro test kožní penetrace jako alternativní test toxicity**  
Zadávací katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte krátkou literární rešerši na oblast analýzy látek s různou schopností penetrovat kůži, které použijete pro ověření testovacího zařízení pro in vitro test kožní penetrace. Pozornost zaměřte také na možné biologické materiály vhodné pro tento test.
2. Porovnejte za použití vhodné membrány dva typy difuzních komůrek (komerční a vyráběné) z hlediska přesnosti metody. Vyberte vhodný biologický model (prasečí kůže, dostupné membrány) a na vybrané látce otestujte její prostup do akceptorové kapaliny a modely ohodnoťte.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, proveďte jejich diskusi a pokuste se navrhnout vhodný biologický model pro ověření testovacího zařízení pro in vitro test kožní penetrace.
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 grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné 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:

**8. února 2019**

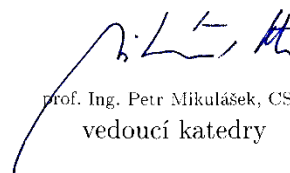
Termín odevzdání diplomové práce:

**10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 8. února 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Bc. Tomáš Hubka

## Poděkování

Děkuji Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. a Ing. Zoře Nývltové, Dr. za cenné rady, ochotu, pomoc a vstřícnost při zpracování diplomové práce. Děkuji Mudr. Lence Kotingové, Ph.D za pomoc při provádění několika testů na půdě LFHK UK Hradec Králové. Dále děkuji Bc. Lucii Bíškové za pomoc při provádění testu a Ing. Janě Volkové za pomoc při analýzách vzorků a za pomoc s korekturou diplomové práce. Děkuji i Mgr. Karolíně Štochlové za pomoc při analýzách vzorků. Také bych rád poděkoval Výzkumnému ústavu organických syntéz a.s. za poskytnuté zázemí. A v neposlední řadě děkuji své rodině, která mi poskytla nemalé finanční prostředky, které mi dovolily studovat na Univerzitě Pardubice.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zaměřuje na verifikaci vybavení, konkrétně na difuzní komory, kožní preparáty a jejich náhrady. V teoretické části je popsána metodika testu, analýza vybraných látek s různou schopností penetrovat kůži a validace HPLC metod. Experimentální část práce se zabývá validací HPLC metody analýzy kofeinu a verifikací vybavení testu penetrace kůže. Kapitola výsledky a diskuze obsahuje vyhodnocená data jednotlivých testů a porovnání použitého vybavení v kontextu přesnosti metody.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

penetrace, kůže, verifikace, Strat-M, alternativní test toxicity, kofein

## **TITLE**

Verification of a test equipment for in vitro skin penetration test as an alternative toxicity test

## **ANNOTATION**

Master thesis focuses on the verification of equipment, namely diffusion chambers, skin preparations and their replacements. The theoretical part describes the test methodology, analysis of selected substances with different ability to penetrate the skin and validation of HPLC method. The experimental part of this thesis deals with the validation of the HPLC method of caffeine analysis and verification of skin penetration test equipment. The results and discussion chapter contains evaluated test data and comparison of used equipments in the context of method accuracy.

## **KEYWORDS**

Penetration, skin, verification, Strat-M, alternative test of toxicity, caffeine

# OBSAH

ÚVOD .....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1.1 Využití experimentu .....	15
1.1.1 Toxikologie .....	15
1.1.2 Farmaceutický a kosmetický průmysl .....	16
1.2 Legislativa .....	16
1.3 Popis testu .....	17
1.3.1 Franzovy difuzní cely .....	17
1.3.2 Těsnost difuzní komory .....	18
1.3.3 Příprava scénáře testu .....	18
Doba expozice .....	19
1.3.4 Pomocná zařízení .....	19
1.3.5 Kožní preparáty a náhrady .....	21
1.3.6 Lidská a prasečí kůže .....	21
1.3.7 Náhrady kůže .....	22
1.3.8 Kontrola integrity kožního preparátu .....	26
1.3.9 Akceptorová kapalina .....	28
1.3.10 Míchání .....	28
1.3.11 Teplota .....	28
1.3.12 Testovaná látka .....	29
1.3.13 Aplikace testované látky .....	29
1.3.14 Odběry vzorků .....	29
1.3.15 Matematické zpracování výsledků .....	30



1.4	Testovací látky .....	31
1.4.1	Stanovení kofeinu vysokotlakou kapalinovou chromatografií.....	31
1.4.2	Stanovení kofeinu spektrofotometricky .....	32
1.4.3	Stanovení testosteronu vysokotlakou kapalinovou chromatografií.....	32
1.4.4	Stanovení kyseliny benzoové vysokotlakou kapalinovou chromatografií ..	33
1.4.5	Stanovení kyseliny benzoové spektrofotometricky.....	33
1.4.6	Stanovení methylenové modři spektrofotometricky .....	33
1.5	Validace analytických metod .....	34
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČAST .....	36
2.1	Přístroje a zařízení.....	36
2.1.1	Modulový kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera 2.....	36
2.1.2	Difuzní komory .....	36
2.1.3	Injekční stříkačky .....	37
2.1.4	Zařízení pro kontrolu teploty.....	37
2.1.5	Ostatní.....	37
2.2	Použité chemikálie .....	38
2.3	Příprava roztoků .....	38
2.4	Validace analytické metody HPLC .....	40
2.4.1	Příprava kalibračních roztoků.....	40
2.4.2	Podmínky chromatografické metody .....	40
2.4.3	Parametry validace .....	40
2.5	Test penetrace kůže .....	42
2.5.1	Kontrola těsnosti difuzních komor .....	42
2.5.2	Příprava kožních preparátů.....	42
2.5.3	Příprava difuzních komor k experimentu .....	43
2.5.4	Popis experimentů .....	43
2.5.5	Čištění difuzních komor .....	44

2.5.6	Porovnání dávkování testovací látky.....	44
2.5.7	Porovnání vlivu obsluhy na výsledek experimentu.....	44
2.5.8	Výroba nového přítlačného systému a jeho porovnání .....	45
2.5.9	Stanovení přesnosti dávkování testovací látky.....	45
2.5.10	Stanovení přesnosti odběru vzorků.....	45
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
3.1	Validace.....	46
3.1.1	Linearita.....	46
3.1.2	Opakovatelnost nástřiku .....	47
3.1.3	Správnost metody .....	47
3.1.4	Limit detekce a stanovitelnosti .....	48
3.1.5	Použité vzorce .....	48
3.1.6	Souhrn.....	49
3.2	Test penetrace kůže .....	50
3.2.1	Použité vzorce .....	50
3.2.2	Souhrnné výsledky .....	51
3.2.3	Porovnání difuzních komor .....	52
3.2.4	Porovnání kožních preparátů a jejich náhrad .....	55
3.2.5	Porovnání dávkování testovací látky.....	58
3.2.6	Porovnání vlivu obsluhy.....	59
3.2.7	Porovnání přítlačného systému.....	60
3.2.8	Stanovení přesnosti dávkování testovací látky.....	62
3.2.9	Stanovení přesnosti odběru vzorků .....	64
3.2.10	Kontrola těsnosti difuzních komor .....	68
4	ZÁVĚR.....	70
5	POUŽITÁ LITERATURA .....	72
6	PŘÍLOHY .....	80

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1</b> - Vodní lázeň s plastovým držákem komor na vyhříváním laboratorní míchadle [5] .....	19
<b>Obrázek 2</b> - Zařízení HDT-1000 od firmy Copley Scientific [15].....	20
<b>Obrázek 3</b> - Zařízení V9-CA Stirrer od firmy Perme gear [17] .....	20
<b>Obrázek 4</b> - Snímek podélného řezu membránou Strat-M [19] .....	22
<b>Obrázek 5</b> - Detailní snímek povrchu membrány Xederma [22] .....	25
<b>Obrázek 6</b> - Aproximace kůže na paralelní zapojení rezistorů [23].....	27
<b>Obrázek 7</b> - Aproximace kůže na zapojení kondenzátorů a rezistorů [23] .....	27
<b>Obrázek 8</b> - Difuzní komora typu 1 [53] .....	36
<b>Obrázek 9</b> - Difuzní komora typu 2 [5] .....	36
<b>Obrázek 10</b> - Injekční stříkačky použité v testech k odběru vzorků akceptorové kapaliny [22] .....	37
<b>Obrázek 11</b> - Fotografie extrahované prasečí kůže [22] .....	42
<b>Obrázek 12</b> - Fotografie raznice k přípravě terčků kožních preparátů [22] .....	42
<b>Obrázek 13</b> - Testování těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu A [22] .....	68
<b>Obrázek 14</b> - Testování těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu B [22].....	68
<b>Obrázek 15</b> - Membrány Strat-M použité při kontrole těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu A [22].....	69
<b>Obrázek 16</b> - Membrány Strat-M použité při kontrole těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu B [22].....	69

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> - Porovnání podmínek dvou různých testů.....	18
<b>Tabulka 2</b> - Shrnutí metod stanovení kofeinu pomocí HPLC .....	31
<b>Tabulka 3</b> - Shrnutí metod stanovení kofeinu pomocí spektrofotometrie.....	32
<b>Tabulka 4</b> - Shrnutí metod stanovení testosteronu pomocí HPLC .....	32
<b>Tabulka 5</b> - Shrnutí metod stanovení kyseliny benzoové pomocí HPLC .....	33
<b>Tabulka 6</b> - Zásobní a naředěné roztoky testovací látky pro stanovení přesnosti metody .....	41
<b>Tabulka 7</b> - Časový harmonogram vzorkování akceptorové kapaliny .....	43
<b>Tabulka 8</b> - Přehled hodnot kalibrační řady .....	46
<b>Tabulka 9</b> - Vyhodnocení opakovatelnosti nápichu .....	47
<b>Tabulka 10</b> - Vyhodnocení přesnosti metody.....	47
<b>Tabulka 11</b> - Vyhodnocení šumu .....	48
<b>Tabulka 12</b> - Výpočet odezvového faktoru $RF_h$ .....	48
<b>Tabulka 13</b> - Výpočet LOD a LOQ.....	48
<b>Tabulka 14</b> - Souhrn parametrů validace.....	49
<b>Tabulka 15</b> - Souhrnné výsledky ze všech provedených testů .....	51
<b>Tabulka 16</b> - Stanovení přesnosti dávkování testovací látky, objem 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .....	62
<b>Tabulka 17</b> - Stanovení přesnosti dávkování testovací látky, objem 1000 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .....	63
<b>Tabulka 18</b> - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu A ...	64
<b>Tabulka 19</b> - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu B ...	65
<b>Tabulka 20</b> - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu C ...	66
<b>Tabulka 21</b> - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu D ...	67

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1</b> - Porovnání výsledků získaných pomocí membrány Strat-M a lidské kůže z hlediska správnosti [19] .....	23
<b>Graf 2</b> - Porovnání výsledků získaných pomocí membrány Strat-M a lidské kůže z hlediska přesnosti [19] .....	23
<b>Graf 3</b> - Průběh kožní penetrace Rivastigminu polymerními membránami [20] .....	24
<b>Graf 4</b> - Průběh kožní penetrace Rivastigminu kožním preparátem [20] .....	24
<b>Graf 5</b> - Kalibrační přímka - linearita .....	46
<b>Graf 6</b> - Grafické porovnání difuzních komor za použití membrány Strat-M.....	53
<b>Graf 7</b> - Grafické porovnání difuzních komor za použití kožního preparátu typu A .....	54
<b>Graf 8</b> - Grafické porovnání kožního preparátu typu A a membrány - difuzní komora typ 1 ..	55
<b>Graf 9</b> - Grafické porovnání různých kožních preparátů a membrány - difuzní komora typ 2 ..	57
<b>Graf 10</b> - Grafické porovnání různých aplikovaných objemů k ploše membrány.....	58
<b>Graf 11</b> - Vliv obsluhy na výsledek testování.....	59
<b>Graf 12</b> - Porovnání klem, dávkovaný objem testovací látky 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .....	60
<b>Graf 13</b> - Porovnání klem, dávkovaný objem testovací látky 560 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .....	61

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
No.	Number (číslo)
BSA	Bovinní sérum albumin
TWF	Tritium water flux (tok tritiové vody)
TEWL	Transepidermal water loss (transepidermální ztráta vody)
TEER	Transepithelial electrical resistance (transepiteliální elektrická rezistence)
LCR	Inductance, capacitance and resistance (elektrická indukčnost, kapacita a odpor)
SAMPA	Skin And Membrane Permeation data Analysis (analýza dat permeace kůží a membránami)
PDA	Photodiode array (detektor s diodovým polem)
UV	Ultraviolet (ultrafialové záření)
MTBH	3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochlorid
SD	Směrodatná odchylka
RSD	Relativní směrodatná odchylka
HPLC	High pressure liquid chromatography (vysokotlaká kapalinová chromatografie)
LOD	Limit of detection (mez detekce)
LOQ	Limit of quantification (mez stanovitelnosti)
mV	Milivolt
mV·s	Milivolt za sekundu
VUOS	Výzkumný ústav organických syntéz, a.s

## ÚVOD

Schopnost chemických látek vstupovat do organismu skrze kůži byla pozorována již v 18. století. Studium dermální absorpce a penetrace látek do organismu se provádí od 20. století. Z počátku se testování provádělo na živých zvířatech (*in vivo* metody). Nejnovějším trendem z přelomu 20 a 21. století je testování na neživé části zvířete (*in vitro* metody). V případě testování kožní penetrace se používá extrahovaná a upravená kůže z mrtvých zvířat. Výjimkou není ani použití kůže lidské získané po různých chirurgických zákrocích. K provedení testu kožní penetrace *in vitro* se používají tzv. difuzní komory. Použitím zvířecí nebo lidské kůže vyvstávají různé problémy ovlivňující výsledek experimentů. Jedním z nich je intra-druhová fyziologická variabilita kůže, která má přímý dopad na přesnost prováděných experimentů. Řešením tohoto problému je náhrada kůže v experimentu za membránu s vlastnostmi podobnými lidské kůži. Při použití membrány bychom měli tak získávat přesnější výsledky. Dnes je na trhu nabízena celá řada membrán určená jako přímá náhrada lidské kůže pro experimenty *in vitro* kožní penetrace.

Cílem diplomové práce bylo popsat průběh experimentu kožní penetrace s důrazem na aspekty, které největší měrou přispívají k nekonzistentnosti získaných výsledků. Dále byla zpracována stručná literární rešerše na oblast analýzy chemických látek s různou schopností penetrovat. Byly provedeny experimenty s cílem vybrat vhodnou difuzní komoru a kožní preparát nebo jeho náhradu z hlediska přesnosti metody. Dále popsat a vhodně okomentovat naměřená data v kontextu jejich přesnosti.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Využití experimentu

### 1.1.1 Toxikologie

Chemické látky na pracovišti, či v jiném prostředí, přichází do styku s kůží a mohou být absorbovány. Stanovení rozsahu dermální absorpce je klíčovým krokem v posuzování rizika chemických látek. Expoziční studie o vystavení organismu člověka různým chemickým látkám z pracovního a životního prostředí byly v minulosti zaměřeny na inhalační toxicitu těchto látek. Důvodem byly poznatky z různých případů nemocí z povolání. Největší výskyt respiračních onemocnění byl v těžebním, hutním a manufakturním průmyslu [1, 2, 3].

Vstup chemických látek do organismu skrze kůži byl studován již v 18. století. Autor epidemiologické studie z roku 1775 popisuje souvislosti mezi dermální expozicí sazemí a výskytem nádoru kůže. Ve 20. století byla pozorována schopnost tetraethylolova vstupovat transdermálně do systémového oběhu a odtud dále z krve přes hematoencefalickou membránu do mozku. Nicméně většina výsledků ze studií dermální absorpce a penetrace pochází z novějších výzkumů účinků pesticidů na lidské zdraví [1, 4, 5].

V roce 2004 byl vydán organizací OECD pokyn No. 428 a v roce 2011 doplněk tohoto dokumentu, který stanoví podmínky pro testování penetračních schopností různých chemických látek. Absorpci či penetraci chemických látek kůží ovlivňují tři základní faktory, jako jsou expoziční doba, expoziční dávka a metabolická aktivita kůže. Experiment kožní penetrace představuje *in vitro* náhradu za *in vivo* pokus dle OECD No. 427 [6].

Tento test se používá pro sledování penetrační schopnosti chemických látek nebo pro studium metabolismu kůže, kdy se místo mrtvé kůže použije kůže živá, tj. z čerstvě usmrceného organismu. Výsledkem experimentu jsou základní farmakokinetické informace. Takto získané výsledky slouží buď jako plnohodnotná data na úrovni *in vivo* testů nebo dále slouží jako data vstupní k testům *in silico* [6, 7].



### 1.1.2 Farmaceutický a kosmetický průmysl

Dalším vědeckým odvětvím, kde experiment dermální absorpce a penetrace představuje nenahraditelnou metodu, je farmaceutický a kosmetický průmysl. Ve farmaceutickém průmyslu je hojně používán ke sledování léčiv aplikovaných topicky či ke studování mechanismů akceleračních penetrace. Mezi největší výhody transdermálního průchodu léčiva do systémového oběhu člověka patří především zamezení jeho metabolického odbourávání ještě před vstupem do systémového oběhu a následného transportu do místa účinku. Další nespornou výhodou je samotné podání léčiva. Při srovnání s perorálním či parenterálním podáním odpadají problémy s drážděním a poškozováním trávicího traktu [8].

V kosmetickém průmyslu představuje experiment dermální absorpce a penetrace opět náhradu za *in vivo* testování kosmetických přípravků a ingrediencí. Použití alternativních *in vitro* testů toxicity kůže je pro kosmetický průmysl zakotven v národní a nadnárodní legislativně, viz bod 1.2.

## 1.2 Legislativa

*„Při výběru metod postupu by zásady nahrazení a omezení používání zvířat a šetrného zacházení s nimi měly být prováděny na základě přísné priority požadavku na používání alternativních metod. Pokud neexistuje žádná alternativní metoda uznaná právními předpisy Unie, lze počet zvířat snížit uplatněním jiných metod a provedením zkušebních strategií, například použitím metody *in vitro* a jiných metod, které by omezily používání zvířat a vedly by k šetrnému zacházení s nimi“* [9]. Lze tedy interpretovat tento odstavec takto: Aktuální platná legislativa dovoluje a podporuje provádět vedle experimentů *in vivo* i experimenty *in vitro*. Ty jsou v některých případech požadovány, jsou-li dostupné jako ekvivalentní validované metody. V oblasti testování dermální penetrace zatím neexistuje striktní požadavek pro nahrazení *in vivo* metody. Experiment dermální penetrace se dá použít jako predikční test, na který *in vivo* metoda může navazovat.

Zákon o ochraně zvířat proti týrání byl v ČR přijat v roce 1992, novelizován byl v roce 2004 na základě nadnárodní legislativy. V roce 2003 byla upravena legislativa Evropské unie. Byl vydán tzv. sedmý dodatek kosmetické směrnice, který zakazuje zkoušení kosmetických ingrediencí a přípravků na zvířatech, rovněž zakazuje uvádět do oběhu výrobky, které byly testovány na zvířatech i poté, co již existovala validovaná *in vitro* metoda [10].

### 1.3 Popis testu

Základní pokyny a informace o experimentech dermální absorpce a penetrace *in vitro* jsou popsány v pokynu No. 428 vydaném OECD. K tomuto dokumentu byly vydány další upřesňující informace [6].

Při samotném testu se používají kožní preparáty či membrány upevněné v difuzní komoře. Na povrch kožního preparátu či membrány je dávkována testovaná chemická látka nebo jejich směs. Chemické látky pasivně difundují do akceptorové části komory, která je naplněna akceptorovou kapalinou. Pomocí vzorkovacího ramínka se v různých časových intervalech odebírá vzorek akceptorové kapaliny, který je následně analyzován. Výsledkem je koncentrace analytu v přesném časovém okamžiku, který prošel kožním preparátem nebo membránou [3, 6].

#### 1.3.1 Franzovy difuzní cely

Difuzní komora se skládá z donorové a akceptorové části. Mezi tyto části je umístěna kůže či její náhrada. Na difuzní komoru jsou kladeny značné nároky. Difuzní komora by měla dobře těsnit. Měla by umožňovat snadné odebírání vzorků akceptorové kapaliny v požadovaném objemu. Musí umožnit dobré promíchání akceptorové kapaliny pomocí magnetického míchadla a zároveň zajišťovat kontakt akceptorové kapaliny se spodní stranou kůže či membrány [6].

Difuzní komory se dají rozdělit na několik základních typů dle konstrukce:

- Statické komory
- Průtočné komory
- Vertikální komory
- Horizontální komory

Dále lze difuzní komory rozdělit dle materiálu, z kterého jsou zhotoveny či způsobu zahřívání akceptorové kapaliny:

- Skleněné komory
- Teflonové komory
- Jednoplášťové komory
- Komory s duplikátorem [11]

### 1.3.2 Těsnost difuzní komory

K netěsnostem difuzní komory může docházet v místě kontaktu akceptorové a donorové části. Prakticky lze k ověření použít 2% roztok methylenové modři, který je nadávkován na kožní preparát či membránu upevněné v difuzní komoře. Po nadávkování se vizuálně pozorují úniky roztoku na vnějších hranách donorové a akceptorové části komory [12].

### 1.3.3 Příprava scénáře testu

Před samotným provedením testu je důležité definovat účel a použití dat, která chceme získat. Dle toho se odvíjí použití různých typů kožních preparátů, donorové a akceptorové kapaliny, vzorkovací frekvence, délka experimentu, atp [6].

Příkladem může být disertační práce [5] autorky L. Kotingové. Práce se zabývá dermální expozicí polyaromatickými uhlovodíky, což jsou lipofilní látky s velkou relativní molekulovou hmotností. Autorka předpokládala, že vstup kůži bude pomalý, proto byl zvolen čas experimentu 72 hodin (což je třikrát delší čas, než je doporučení dle OECD No. 428). Jako kožní preparát byla zvolena lidská dermatomovaná kůže, která je vhodná pro studium látek s lipofilním charakterem. Akceptorová kapalina byla připravena z Hanksova roztoku a bovinního séra albumin.

Autoři P. H. Dugard a kol. popisují ve své práci [13] test dermální penetrace deriváty různých alkoholů. Charakter těchto látek je převážně hydrofilní, mají nízkou molekulovou hmotnost. Je možné předpokládat rychlý průnik látek do akceptorové kapaliny, proto byl zvolen čas experimentu 8 hodin. Jako kožní preparát byl zvolen tepelně separované epidermis (příprava viz bod 1.6.1). Jako akceptorová kapalina byla použita destilovaná voda.

**Tabulka 1** - Porovnání podmínek dvou různých testů

	Příklad č. 1	Příklad č. 2
skupina testovaných látek	polyaromatické uhlovodíky	deriváty alkoholů
rozmezí $K_{ow}$	3,33 až 6,06	-1,18 až 0,83
rozmezí mol. Hmotností [g/mol]	128 až 252	76 až 162
expoziční čas [hod]	72	8
kožní preparát	dermatomovaná kůže	tepelně separované epidermis
akceptorová kapalina	Hanksův roztok s BSA	destilovaná voda

## Doba expozice

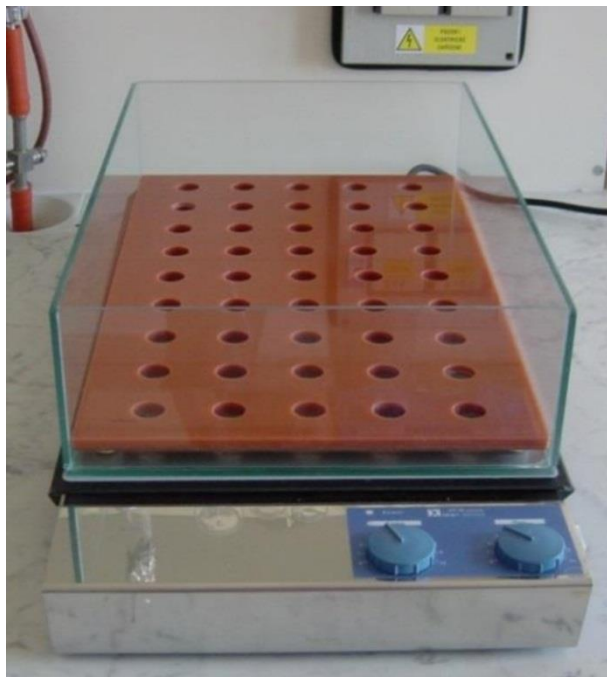
Expoziční čas je doporučen 24 hodin. Při delším času expozice již dochází k fyziologickým změnám v kůži, což negativně ovlivňuje výsledek experimentu. Je dovoleno čas experimentu zkrátit na časový úsek, který odpovídá některému z typů specifické expozice. Po celou dobu testu je odebírán vzorek akceptorové kapaliny v definovaných časových bodech. Tato frekvence vzorkování by měla umožnit grafické prezentování absorpčního profilu testované látky. Při použití vhodné náhrady (především umělé membrány) preparátu zhotoveného z kůže může být doba expozice delší [6].

### 1.3.4 Pomocná zařízení

Pro zajištění správné teploty akceptorové kapaliny a kožního preparátu je používáno zařízení, které vyhřívá difuzní komory konstantně po celý čas experimentu a zároveň zajišťuje plynulé míchání. V praxi se můžeme setkat s třemi základními typy.

#### Vodní lázeň

Toto zařízení je nejvíce používané v praxi. Základ tvoří skleněná nádoba nebo nízké lepené akvárium, ve kterém je umístěn držák difuzních komor (plastová deska s otvory na distančních sloupcích). V nádobě je přítomna teplosměnná kapalina (nejčastěji voda). Nádoba je postavena a zahřívána na míchadle s možností ohřevu [5].



**Obrázek 1** - Vodní lázeň s plastovým držákem komor na vyhříváném laboratorní míchadle [5]

### Termoblok

Společnost Copley scientific vyvinula pro potřeby experimentu kožní penetrace kompaktní vyhřívaný blok HDT-1000. Příklad se skládá z kovového bloku s otvory pro umístění difuzních komor a displeje s ovládacími prvky. Každá difuzní komora má vlastní bod pro míchání pomocí magnetického míchadélka [14].



**Obrázek 2** - Zařízení HDT-1000 od firmy Copley Scientific [15]

### Cirkulační systém

Pro vyhřívání difuzních komor s duplikátorem je zapotřebí zařízení, které ohřeje a dopraví teplosměnné médium do pláště difuzní komory (v praxi se používá čerpadlo a termostat). Společnost Permegear vyvinula pro potřeby experimentu kožní penetrace kompaktní přístroj, který zajišťuje přívod a odvod teplosměnného média, jeho ohřev a poskytuje vlastní bod každé difuzní komoře pro míchání pomocí magnetického míchadélka [16].



**Obrázek 3** - Zařízení V9-CA Stirrer od firmy Permegear [17]

### **1.3.5 Kožní preparáty a náhrady**

Kůže použitá v experimentech může být lidská nebo zvířecí. Použití lidské kůže podléhá v některých státech souhlasu etické komise. Pro použití kůže ze zvířecích zdrojů není zapotřebí žádné povolení. Nejvíce se používá kůže prasečí, která vykazuje nejlepší shodu s kůží lidskou, co se fyziologického složení týče. Pro samotný experiment lze z lidské či prasečí kůže připravit různé typy kožních preparátů [6, 18].

### **1.3.6 Lidská a prasečí kůže**

#### **Celá kůže**

Obsahuje vrstvu epidermis společně s dermis, subkutánní tuk je odstraněn. Příprava se provádí ručně pomocí skalpelu. Takto připravený kožní preparát je vhodný pro testování převážně hydrofilních látek. Pro testování lipofilních látek není použití vhodné z důvodů sorpce látky ve vrstvě dermis.

#### **Rozdělená kůže**

Zhotovený kožní preparát obsahuje epidermis a část dermis. Příprava se provádí pomocí dermatomu. Takto připravený kožní preparát je vhodný pro testování hydrofilních látek.

#### **Dermatomovaná kůže**

Tento kožní preparát je tvořen epidermis (může obsahovat i část dermis), tloušťka preparátu je obvykle 200-500  $\mu\text{m}$ . Připravuje se pomocí dermatomu, v minulosti se připravoval i pomocí Humbyho nože. Takto připravený kožní preparát je vhodný pro testování hydrofilních i lipofilních látek.

#### **Tepelně separované epidermis**

Kožní preparát obsahuje pouze epidermis. Příprava se provádí tepelnou extrakcí ve vodní lázni. Takto připravený kožní preparát je vhodný pro testování hydrofilních i lipofilních látek.

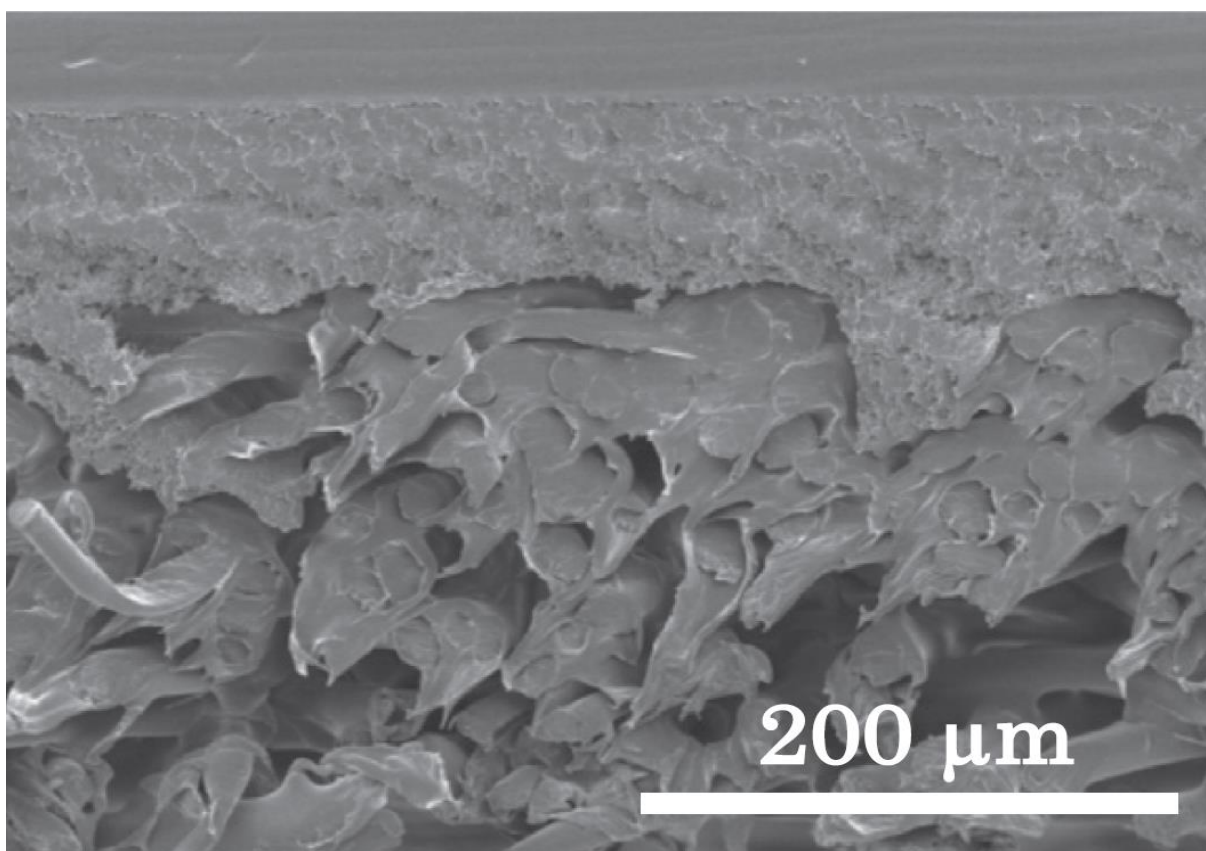
#### **Izolované stratum corneum**

Kožní preparát obsahuje pouze vrstvu *stratum corneum* ze souboru epidermis. Připravuje se především enzymaticky. Izolované *stratum corneum* je vhodné pro studium lipofilních i hydrofilních látek [11].

### 1.3.7 Náhrady kůže

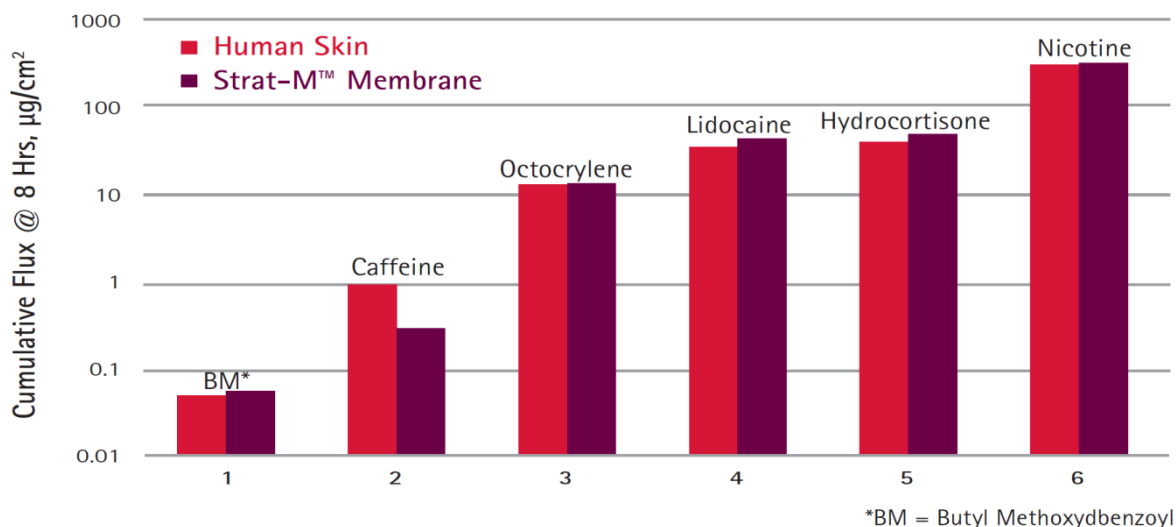
#### Strat-M

Společnost EMD Millipore vyvinula pro potřeby *in vitro* testu dermální absorpce a penetrace náhradu kožních preparátů. Jedná se o membránu tvořenou dvěma vrstvami různých materiálů. První svrchní vrstva je tvořena polyolefinem, která je vůči spodní vrstvě hydrofilní a více difuzivní. Druhá, spodní vrstva je zhotovena z polyethersulfonu, která je převážně hydrofobní a odolnější proti difuzi vodných roztoků. Tyto složené polymerní vrstvy vytvářejí porézní strukturu, která je impregnována směsí syntetických lipidů, což celé membráně dodává vlastnosti podobné lidské kůži.



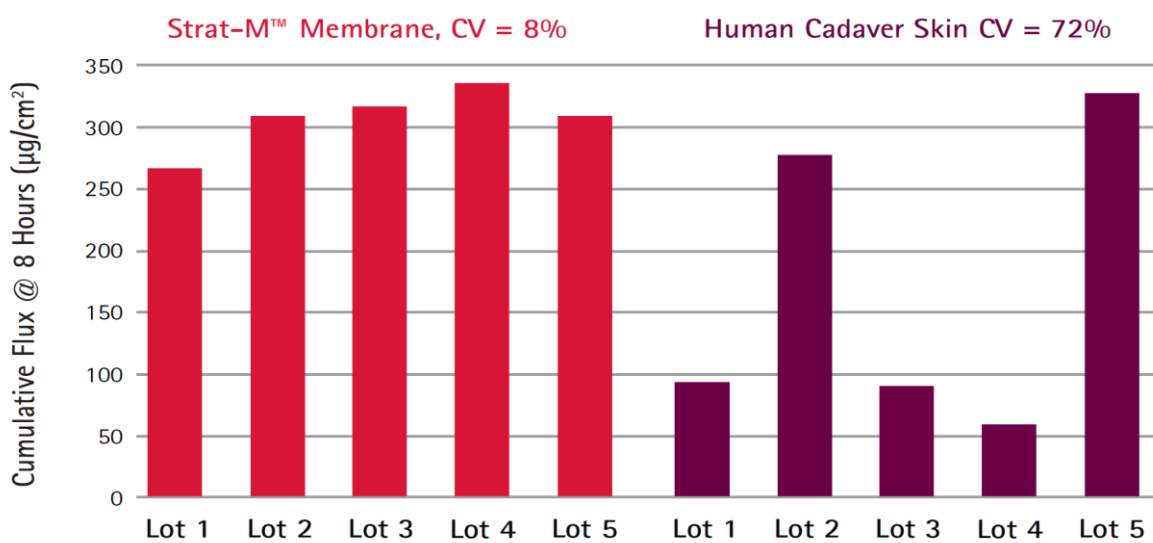
**Obrázek 4** - Snímek podélného řezu membránou Strat-M [19]

Výrobce si je vědom hned několika nedostatků tradičních náhrad lidské kůže používané v *in vitro* experimentech. První z nedostatků se týká fyziologických odlišností lidské kůže a kůží získaných ze zvířat. Druhý z nedostatků je ve fyziologické variabilitě lidské kůže od různých dárců. Dalším z mnoha problémů může být už získání lidské kůže samotné pro *in vitro* experimenty, kdy je zapotřebí souhlas a povolení jejího použití v experimentu etickou komisí. Veškeré výše zmíněné nedostatky tento výrobek eliminuje. Membrána Strat-M vykazuje v experimentech lepší korelaci ve srovnání s jinými tradičními biologickými modely kůže.



**Graf 1** - Porovnání výsledků získaných pomocí membrány Strat-M a lidské kůže z hlediska správnosti [19]

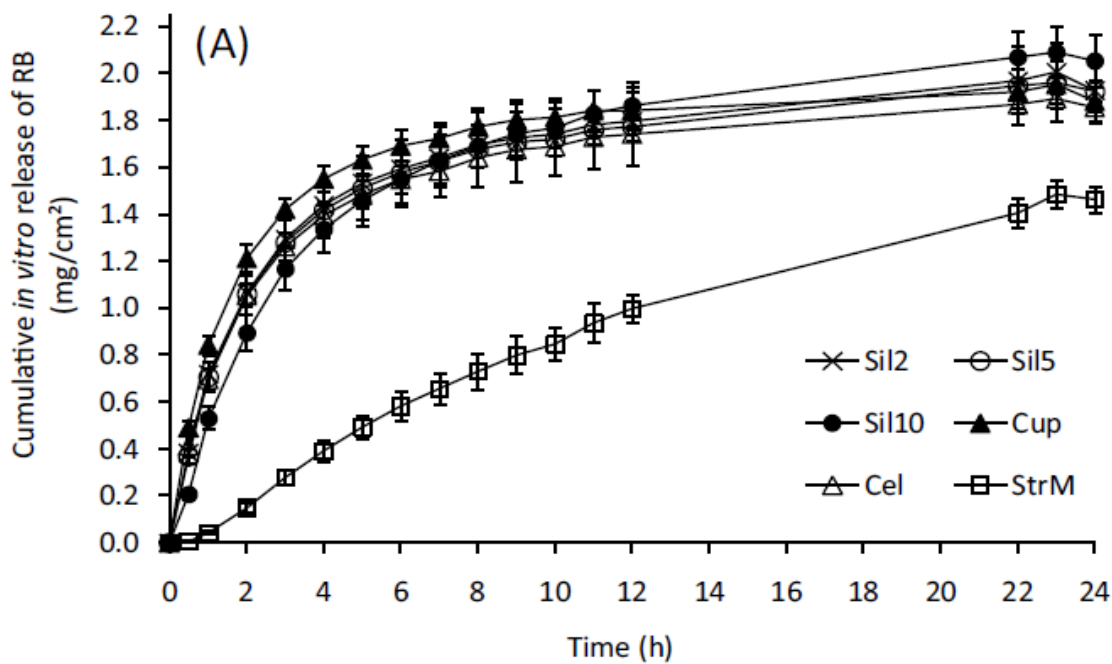
Výrobce svoji membránu opakovaně testoval pomocí nasyceného roztoku kofeinu. Ze získaných výsledků určil variabilitu membrán, v jednotlivých výrobních sériích, která činila 8 %.



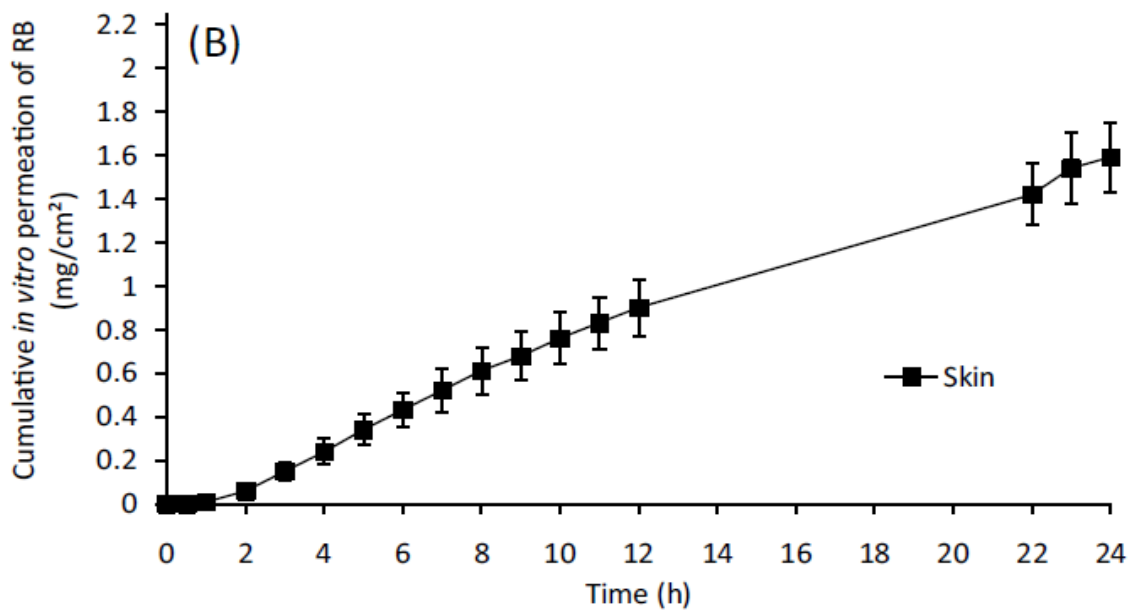
**Graf 2** - Porovnání výsledků získaných pomocí membrány Strat-M a lidské kůže z hlediska přesnosti [19]

Publikace [20] autorů Simon A. a spol. se zabývá porovnáním různých typů polymerních membrán a prasečí kůže. Na membrány a prasečí kůži byla aplikována látka Rivastigmin ve formě nasyceného roztoku. Při pohledu na graf 3 a graf 4 lze najít shodu mezi absorpčními profily použité membrány Strat-M a kožním preparátem zhotoveným z prasečí kůže.





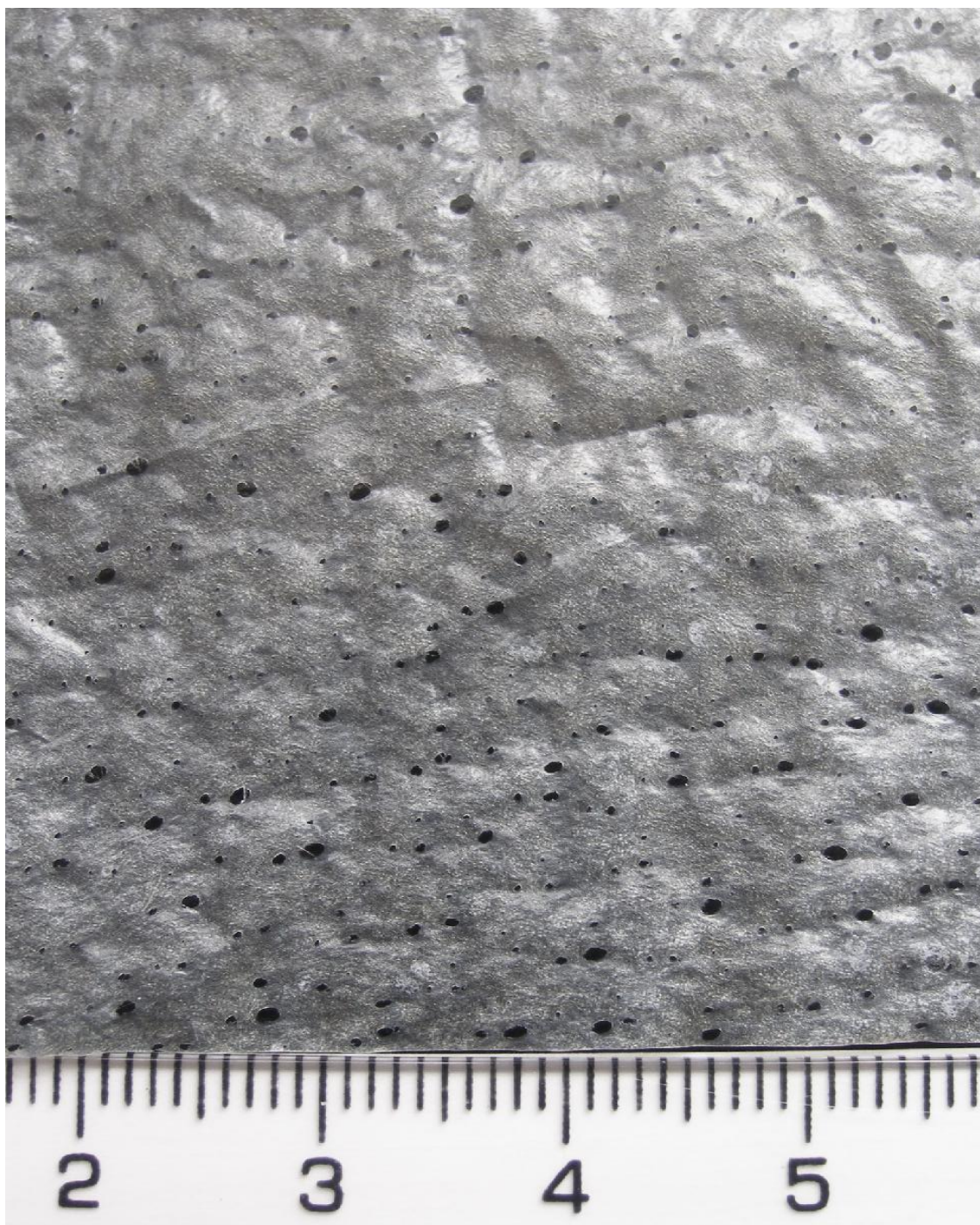
Graf 3 - Průběh kožní penetrace Rivastigminu polymerními membránami [20]



Graf 4 - Průběh kožní penetrace Rivastigminu kožním preparátem [20]

## **Xederma**

Jde o nový typ suchého a sterilního biologického krytí používaného ke krytí popálenin a ran většího rozsahu. Xederma je připravena z prasečí kůže enzymatickým odstraněním epidermis a všech ostatních buněk ve vrstvě dermis, zbyde tak pouze acelulární dermis. Hydratovaný preparát má stejné bio-mechanické vlastnosti jako kůže lidská [21]. Pro použití v testech penetrace kůže se nehodí z důvodů neintegrity (viz obrázek 5).



**Obrázek 5** - Detailní snímek povrchu membrány Xederma [22]

### 1.3.8 Kontrola integrity kožního preparátu

Dle pokynu No. 428 je požadována kontrola integrity neboli celistvosti kožního preparátu. V praxi jsou používány převážně metody TEWL a TEER, méně často se můžeme setkat s metodou TWF [6, 23].

#### **TWF**

Tok tritiové vody je metoda používaná ke sledování celistvosti kůže. Prakticky se nechá penetrovat tritiová voda o definované aktivitě rozpadu za jednotku času kožním preparátem usazeném v difuzní komoře. Vzorky akceptorové kapaliny se vyhodnocují pomocí metody kapalinové scintilační detekce. Výsledkem je tok tritiové vody vztažený na plochu za jednotku času. V praxi se příliš nepoužívá, kvůli své pracnosti, potřebnému vybavení a absenci povolení pracoviště pracovat s radioizotopy [24].

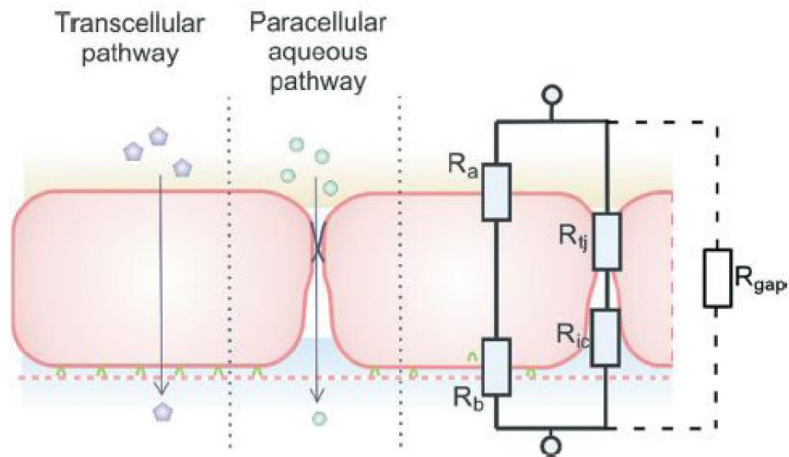
#### **TEWL**

Transepidermální ztráta vody je metoda měření celistvosti kůže, při které se pomocí RH metru nebo Tewametru sleduje vypařené množství vody z povrchu kůže. Výsledek je vyjádřen jako množství vypařené vody vztažené na plochu kůže za jednotku času [25].

#### **TEER**

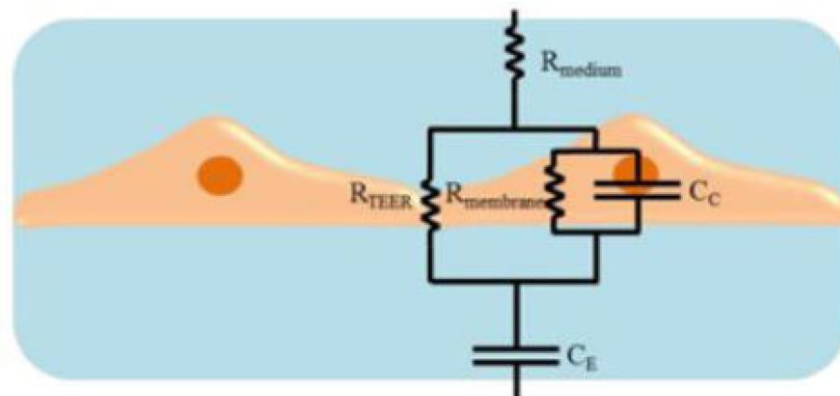
Transepiteliální elektrická resistance je metoda měření integrity kůže. Lze měřit odpor (převrácená hodnota vodivosti) nebo impedanci (převrácená hodnota admitance). Princip metody spočívá v schopnosti kůže chovat se jako odpor a zároveň jako dielektrikum, resp. dochází k její polarizaci v poli střídavého napětí (chová se jako kondenzátor).

Měření se v praxi provádí nejčastěji LCR metrem. Při měření odporu se sleduje průchod proudu v závislosti na vloženém napětí, které je konstantní. Výsledný odpor je vypočten z Ohmova zákona [23].



**Obrázek 6** - Aproximace kůže na paralelní zapojení rezistorů [23]

Výsledkem měření je elektrický odpor v ohmech vztažený na plochu kůže. Při měření impedance se sleduje odpor a fázový posuv napětí v závislosti na proudu harmonické střídavé složky o konstantní frekvenci. Výsledná impedance je vypočtena z Ohmova zákona s tím rozdílem, že není značena R (odpor), ale Z (impedance) [23].



**Obrázek 7** - Aproximace kůže na zapojení kondenzátorů a rezistorů [23]

### **1.3.9 Akceptorová kapalina**

Tato kapalina imituje vnitřní prostředí lidského těla a krevní plazmu. Ta má za normálních okolností hodnotu pH rovno 7,4. Obsahuje 1 % anorganických solí a zhruba 9 % organických sloučenin (bílkoviny, hormony, enzymy a cukry) [6].

V praxi se jako akceptorová kapalina používá převážně fyziologický roztok. V některých případech je použit modifikovaný fyziologický roztok, Ringerův roztok, Hartmannův nebo Hanksův roztok. Modifikace fyziologického roztoku se nejčastěji provádí stabilizací pH na hodnotu 7,4 přidáním fosfátového pufru. Při studiu, kdy je použita metabolicky aktivní kůže, se doporučuje použít akceptorovou kapalinu, která podpoří životaschopnost kůže. Při studiu penetračních schopností látek, které mají lipofilní charakter, se k fyziologickému roztoku přidává bovinní sérum albumin. Ten simuluje přítomnost plazmatických bílkovin, které dokáží navázat a přenášet lipofilní látky. Příkladem můžou být publikace [26, 27, 28] kde se autoři zabývají studiem penetračních schopností testosteronu.

### **1.3.10 Míchání**

Správné promíchávání akceptorové kapaliny během experimentu má nezanedbatelný vliv. Jak již bylo zmíněno, při penetraci kůží či membránou se uplatňuje především pasivní difuze. Hnací silou je pouze koncentrační gradient, který je ovlivněn homogenitou penetrující látky v akceptorové kapalině [16].

### **1.3.11 Teplota**

Teplota akceptorové kapaliny zásadně ovlivňuje rychlost pasivní difuze, proto je nezbytné udržovat konstantní teplotu po dobu experimentu. Teplota by měla imitovat teplotu kůže člověka za normálního zdravotního stavu, tj.  $32 \pm 1$  °C. Relativní vlhkost vzduchu v laboratoři by měla být, dle doporučení, 30 až 70 % [6].

### 1.3.12 Testovaná látka

Průnik testované látky kožním preparátem či membránou je poháněn pasivní difuzí. Podle publikace z roku 2000, kde jsou sepsány základní farmakokinetické poznatky z oblasti transdermální aplikace léčiv, platí tzv. pravidlo 500 Daltonů. Čím větší je molekulová hmotnost testované látky, tím hůře bude procházet kožním preparátem či membránou. Horní hranicí, při které látky pronikají velmi obtížně, je 500 Daltonů. Látky s vyšší molekulovou hmotností mohou pronikat také, při použití vhodného akcelarantu penetrace [29].

Rozhodujícím kritériem mezi penetrací a absorpcí je charakter testované látky. Vysoce lipofilní látky mají větší afinitu ke kožní vrstvě *stratum corneum*, proto prochází obtížněji kožním preparátem nebo membránou do akceptorové kapaliny [5].

### 1.3.13 Aplikace testované látky

Při expozici člověka chemickými látkami, za normálních okolností, se obvykle setkáváme s tzv. konečnými dávkami. Proto je doporučeno aplikovat testované látky v množství 1 až 5 mg/cm<sup>2</sup> (pro pevné látky) a 10 μl/cm<sup>2</sup> (pro kapalné látky). Každopádně použitá koncentrace testované látky vychází z expozičního scénáře [6].

### 1.3.14 Odběry vzorků

Frekvence odběrů vzorků by měla dovolit grafické prezentování naměřených výsledků. K samotnému odběru akceptorové kapaliny se v praxi používají injekční stříkačky s odběrovou jehlou [5, 6].

### 1.3.15 Matematické zpracování výsledků

#### Lag time (zpoždění)

Je časová prodleva před stavem ustáleného toku (1). Vyjadřuje čas potřebný k uvolnění látky z donorové části, pro průchod jednotlivými vrstvami kůže a difuzi látky do akceptorové části komory.

$$t_{lag} = \frac{l^2}{6D} \quad (1)$$

Kde  $t_{lag}$  [h] je časová prodleva před stavem ustáleného fluxu,  $l$  [cm] délka difúzní dráhy a  $D$  [cm<sup>2</sup>/h] představuje difuzní koeficient.

#### Flux (tok)

Lze rozlišit tok za ustáleného stavu a tok za pseudo ustáleného stavu (2). Tok za ustáleného stavu nastává po uplynutí doby 3,2 krát větší než je hodnota lag time. Tok za pseudo ustáleného stavu nastává po uplynutí doby 2,7 krát větší než je hodnota lag time. Tok za jakéhokoliv stavu udává, kolik hmoty prošlo za čas na jednotku plochy.

$$J = -D \frac{\partial^2 c}{\partial x} \quad (2)$$

Kde  $J$  [mg/cm<sup>2</sup>/h] je tok,  $\delta c$  [mg/l] je koncentrační gradient a  $\delta x$  je tloušťka kožního preparátu nebo jeho náhrady,  $D$  [cm<sup>2</sup>/h] je difuzní koeficient [5, 11].

#### Kumulativní množství

Tato veličina udává celkové prošlé množství hmoty ve zvoleném časovém úseku. Při experimentu se odebírá určitý objem vzorku a dochází tak i k úbytku sledované látky mimo difuzní komoru. Tento úbytek analytu je v kumulativním množství zahrnut (3).

$$m_n + \sum_{i=m}^n m_m + m_{m+1} + \dots + m_{n-1} \quad (3)$$

Kde  $m$  je množství analytu a  $n$  je hodnota  $n$ ého pořadí [30].



## Výpočetní software SAMPA

Za účelem zpracování naměřených výsledků, z testů kožní penetrace, byl v prostředí Microsoft Excel navržen speciální software. Po zadání vstupních dat (obvykle naměřené koncentrace v jednotlivých odběrech) poskytuje hodnoty fluxu a lag time. Software provádí výpočet na základě složitých modelových rovnic, které řeší pomocí iterací a dovoluje vyloučit odlehlé hodnoty. Po iteračním řešení rovnic najde inflexní body (lineární část) a odtud vynese tečnu, která protíná osu x. Protnutá hodnota na ose x představuje lag time, zatímco směrnice tečny představuje flux [31].

## 1.4 Testovací látky

### 1.4.1 Stanovení kofeinu vysokotlakou kapalinovou chromatografií

**Tabulka 2** - Shrnutí metod stanovení kofeinu pomocí HPLC

Př. č.	Detektor	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Eluce	Reference
1	PDA	Zorbax SB-C18	Methanol, voda a kys. octová	Isokratická	[32]
2	PDA	Xterra MS-C18	Acetonitril a fosfátový pufr	Gradientová	[33]
3	UV	Shimpack CLS-ODS	Acetonitril a fosfátový pufr	Isokratická	[34]
4	UV	Kingsorb 5 C-18	Methanol a fosfátový pufr	Isokratická	[35]
5	UV	XDB C18	Methanol a fosfátový pufr	Isokratická	[36]
6	UV	Hypersil 5 BDS C18	Acetonitril a fosfátový pufr	Isokratická	[37]
7	PDA	RP-C18	Methanol a amonium octanový pufr	Isokratická	[38]
8	PDA	Zobax eclipse plus	Methanol a voda	Isokratická	[39]

Analýza kofeinu vysokotlakou kapalinovou chromatografií byla jedna z nejvíce používaných metod používaná jako analytická koncovka experimentu. Většina vzorků byla analyzována bez předúpravy odebraného vzorku akceptorové kapaliny, v menší míře se vzorky k analýze upravovaly filtrací přes filtr s pórovitostí 0,45  $\mu\text{m}$  [36, 32]. Nástřikový objem vzorku je převážně 10  $\mu\text{l}$ . Využívá se principu chromatografie s obrácenými fázemi. Proto se jako stacionární fáze používají především kolony s nepolární fází C18. Mobilní fáze je tvořena methanolem nebo acetonitrilem s vodou nebo fosfátovým pufrům v poměru 18 až 60 dílů organického rozpouštědla ku 35 až 75 dílům vody či fosfátového pufru. Průtok mobilní fáze kolonou se pohybuje v intervalu 0,6 až 1,5 ml/min. Nejčastěji použitý průtok je 0,8 až 1,0 ml/min [32, 34, 37, 39]. Eluce je ve většině případů isokratická. K detekci se používá jak UV, tak PDA detektorů. Nejčastější vlnová délka pro detekci je 272 nm (odpovídá absorpčnímu maximu kofeinu), v ojedinělých případech je použita jiná vlnová délka v intervalu 262 až 273 nm [34, 38].



### 1.4.2 Stanovení kofeinu spektrofotometricky

**Tabulka 3** - Shrnutí metod stanovení kofeinu pomocí spektrofotometrie

Př. č.	Vlnová délka [nm]	Vzorek	Reference
1	273	Nativní	[40]
2	272	Nativní	[41]
3	630	Derivatizovaný	[42]

Kofein lze analyzovat pomocí spektrofotometru v UV oblasti. Vlnová délka maximální absorbance se pohybuje v intervalu 272 – 273 nm. Vzorky se analyzovaly obvykle ve vodném prostředí. V jednom případě byl kofein analyzován ve viditelném spektru po derivatizaci pomocí reakce s MBTH za přítomnosti octové kyseliny. Reakce je založena na oxidaci kofeinu jodistanem sodným v prostředí kyseliny octové a následnou kopulací s MBTH. Vzniklý produkt měl modré zbarvení a detekován byl na vlnové délce 630 nm [42].

### 1.4.3 Stanovení testosteronu vysokotlakou kapalinovou chromatografií

**Tabulka 4** - Shrnutí metod stanovení testosteronu pomocí HPLC

Př. č.	Detektor	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Eluce	Reference
1	UV	μBondapak C18	Acetonitril a voda	Isokratická	[43]
2	UV	RP-C18	Methanol a voda	Isokratická	[44]
3	UV	Lichrocart C18	Acetonitril a acetátový pufr	Isokratická	[45]

Vzorky k analýze se v žádné z publikací neupravovaly. Nástřikový objem vzorku se obvykle pohybuje v rozmezí 10 až 20 μl. Využívá se principu chromatografie s obrácenými fázemi. Proto se jako stacionární fáze používají především kolony s nepolární fází C18. Mobilní fáze je tvořena methanolem nebo acetonitrilem s vodou nebo acetátovým pufrům v poměru 45 až 60 dílů organického rozpouštědla ku 40 až 55 dílům vody či acetátového pufru. Průtok mobilní fáze kolonou se pohybuje v intervalu 1,0 až 1,5 ml/min. Eluce je ve všech případech isokratická. K detekci se používá UV detektorů s nastavenou vlnovou délkou v intervalu 242 – 254 nm [43, 44, 45].

#### 1.4.4 Stanovení kyseliny benzoové vysokotlakou kapalinovou chromatografií

Tabulka 5 - Shrnutí metod stanovení kyseliny benzoové pomocí HPLC

Př. č.	Detektor	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Eluce	Reference
1	UV	RP-C18	Acetonitril a fosfátový pufr	Isokratická	[46]
2	PDA	Lichrospher 100 RP	Acetonitril a voda	Isokratická	[47]
3	Radiochemický	RP-C18	Acetonitril, voda a kys. octová	Gradient	[48]

Vzorky k analýze se v žádné z publikací neupravovaly. Nástřikový objem vzorku je obvykle 20  $\mu$ l. Využívá se principu chromatografie s obrácenými fázemi. Proto se jako stacionární fáze používají především kolony s nepolární fází C18. Mobilní fáze je tvořena acetonitrilem s fosfátovým pufrům v poměru 55 až 70 dílů organického rozpouštědla ku 30 až 70 dílům vody či fosfátového pufru, v některých případech se přidává i organická kyselina pro úpravu pH. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,0 ml/min. Eluce je isokratická, v jednom případě gradientová. K detekci se používá PDA a UV detektorů s nastavenou vlnovou délkou 245 nm. V případě analýzy radioaktivně značených látek se použil radiochemický detektor [46, 47, 48].

#### 1.4.5 Stanovení kyseliny benzoové spektrofotometricky

Vzorek byl analyzován ve vodném prostředí. Vlnová délka odpovídající maximální absorpenci kyseliny benzoové byla 230 nm [40].

#### 1.4.6 Stanovení methylenové modři spektrofotometricky

Vzorek byl analyzován ve vodném prostředí. Vlnová délka odpovídající maximální absorpenci methylenové modři byla 660 nm [49].

## 1.5 Validace analytických metod

Validací se rozumí ověření či kontrola analytického postupu z několika hledisek. Slouží k ověření poskytnutí objektivního výsledku za konstantních podmínek. V praxi se experimentálně provádí podrobné šetření s důkazy, že při správné aplikaci metody jsou poskytovány relevantní výsledky pro daný účel. U validace HPLC metod se obvykle setkáváme s těmito parametry [50].

### **Specifičnost**

Specifičnost je parametrem, který popisuje vhodnost navržené metody pro analýzu zamýšleného analytu bez interakce s možnými interferujícími látkami.

### **Linearita**

Linearita je parametr, který charakterizuje schopnost analytické metody získat hodnoty, které jsou přímo úměrné koncentraci analytu v analyzovaném vzorku. V praxi se nejběžněji používá vztah mezi odezvou analyzované látky a koncentrací. Když je tento vztah dosazen na osy dvourozměrného grafu (osa x a osa y), dostaneme obvykle přímku. Její lineární průběh charakterizuje rovnice přímky, korelační koeficient a koeficient determinace. Čím více se koeficient determinace blíží hodnotě 1, tím více je průběh přímky lineární.

### **Přesnost**

Přesnost vyjadřuje shodu z opakovaného odběru stejného vzorku za definovaných podmínek. Přesnost může být ovlivněna systematickou i náhodnou chybou. Tento parametr umožňuje odhadnout, do jaké míry systematická chyba dokáže ovlivnit zkoušenou analytickou metodu. V praxi se obvykle vyjadřuje jako RSD.

### **Správnost**

Správnost definuje těsnost shody naměřené hodnoty s referenční hodnotou, resp. jde o rozdíl mezi získanou a teoretickou hodnotou. V praxi se provádí porovnání se standardem, certifikovaným referenčním materiálem, validovanou metodou nebo výsledky z referenčních laboratoří.

### **Opakovatelnost**

Opakovatelnost je parametr, který vyjadřuje přesnost za konstantních provozních podmínek během krátkého časového úseku. Prakticky charakterizuje reprodukovatelnost daného analytického postupu pro jeden vzorek analyzované látky. V případě HPLC metod rozlišujeme opakovatelnost nábichu a opakovatelnost metody [50].

### **Limit detekce**

Limit detekce je parametr, který definuje nejmenší možné detekovatelné množství analytu ve vzorku.

### **Limit stanovitelnosti**

Limit stanovitelnosti udává nejmenší možné množství analytu ve vzorku, které může být numericky kvantifikováno s přijatelnou hodnotou nejistoty měření [50, 51].

### **Stabilita**

Stabilita je parametr, který popisuje stálost analytu ve vzorku v závislosti na čase [50].

### **Robustnost**

Robustnost představuje parametr, který definuje neovlivnitelnost analytické metody při malé změně některého z parametrů metody [52].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

#### 2.1.1 Modulový kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera 2

Řídící jednotka:	LC-30AD
Degasér:	DGU-20ASR
Autosampler:	SIL-30AC
Kolonový prostor:	CTO-20AC
Detektor:	SPD-M30A

#### 2.1.2 Difuzní komory

Typ 1 VDC Type C, Copley Scientific, (UK)

Objem: 11 ml

Plocha: 1,77 cm<sup>2</sup>

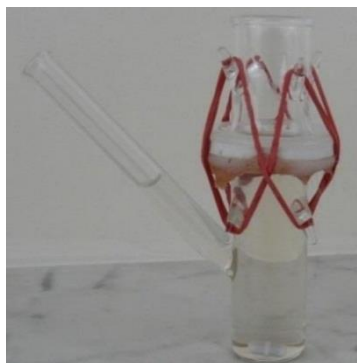


Obrázek 8 - Difuzní komora typu 1 [53]

Typ 2 Zakázkově vyráběné (Česká republika)

Objem: 10 ml

Plocha: 1,77 cm<sup>2</sup>



Obrázek 9 - Difuzní komora typu 2 [5]

### 2.1.3 Injekční stříkačky

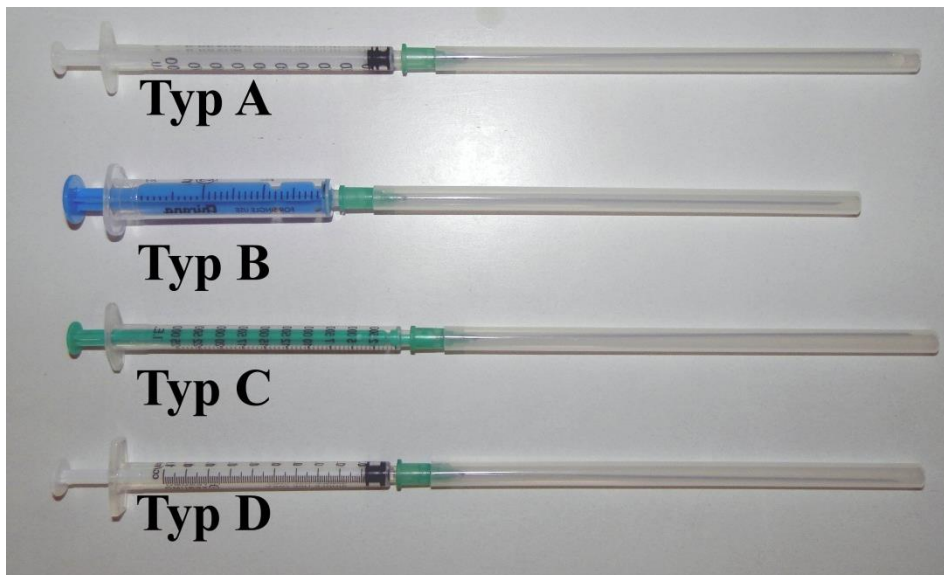
Typ A 1 ml U-100 insulin, Bbraun (Německo)

Typ B 2 ml Chirana, Chirana (Slovensko)

Typ C 1 ml Heparin, Bbraun (Německo)

Typ D 1 ml Tuberculin, Terumo (Japonsko)

Injekční jehla Sterican 0,8 x 140 mm, Bbraun (Německo)



Obrázek 10 - Injekční stříkačky použité v testech k odběru vzorků akceptorové kapaliny [22]

### 2.1.4 Zařízení pro kontrolu teploty

Termoblok Copley Scientific HDT-1000 (UK)

Magnetické míchadlo s ohřevem IKA IKAMAG RT 15 (Německo)

### 2.1.5 Ostatní

Raznice na kožní preparáty o průměru 25 mm Copley Scientific (UK)

Ultrazvuk Bandelin EK 100 (Německo)

Analytická váha Mettler Toledo XS 250DU (USA)

Předvážky Kern EW3000 (Německo)

Přístroj pro přípravu ultra-čisté vody Watek IWA 20iol (Česká republika)

## 2.2 Použité chemikálie

Methanol	Lach:ner, s.r.o.	Česká republika	99,9 %
Ethanol	Lach:ner, s.r.o.	Česká republika	96 %
Chlorid sodný	Lachema, n.p.	Česká republika	99,8 %
Kofein	Sigma - Aldrich	Irsko	99,8 %
Methylenová modř	Lachema, n.p.	Česká republika	-
Ultra-čistá voda	VUOS	Česká republika	100 %

## 2.3 Příprava roztoků

### Příprava fyziologického roztoku

Do odměrné baňky o objemu 1 litr bylo naváženo na předvážkách cca 9 g chloridu sodného. Do baňky bylo přidáno cca 200 ml ultra-čisté vody. Následně byla baňka umístěna do ultrazvuku. Po rozpuštění pevného podílu byla baňka doplněna po rysku na definovaný objem ultra-čistou vodou.

### Příprava roztoku 50% ethanolu

Do zásobní láhve bylo odměrným válcem odměřeno 520 ml 96% ethanolu a 480 ml ultra-čisté vody. Vzniklý roztok v zásobní lahvi byl homogenizován v ultrazvuku po dobu 10 min.

### Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla tvořena složkou A (methanol) a složkou B (ultra-čistá voda), obě složky byly vždy dle potřeby doplňovány do zásobních lahví u přístroje. Mísení složek v poměru 25:75 zajišťoval přístroj.

### Příprava testovacího roztoku kofeinu o koncentraci 4 g/l

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo naváženo na analytických vahách 200 mg kofeinu. Následně bylo do baňky přidáno cca 20 ml roztoku 50% ethanolu. Poté byla baňka umístěna do ultrazvuku do doby, než se kofein rozpustil. Po rozpuštění pevného podílu byla baňka doplněna po rysku na definovaný objem roztokem 50% ethanolu.

### **Příprava testovacího roztoku kofeinu o koncentraci 177 mg/l**

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo naváženo na analytických vahách 8,85 mg kofeinu. Dále bylo postupováno stejně jako při přípravě testovacího roztoku kofeinu o koncentraci 177 mg/l.

### **Příprava zásobního roztoku kofeinu o koncentraci 1g/l**

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo naváženo na analytických vahách 50,0 mg kofeinu. Následně bylo do baňky přidáno cca 20 ml fyziologického roztoku. Poté byla baňka umístěna do ultrazvuku do doby, než se kofein rozpustil. Po rozpuštění pevného podílu byla baňka doplněna po rysku na definovaný objem fyziologickým roztokem.

### **Příprava nasyceného roztoku methylenové modři**

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo naváženo na analytických vahách 200 mg methylenové modři. Následně bylo do baňky přidáno cca 20 ml roztoku 50% ethanolu. Poté byla baňka umístěna do ultrazvuku po dobu cca 20 minut. Obsah baňky byl následně doplněn po rysku na definovaný objem roztokem 50% ethanolu. Po hodině byl vzniklý roztok zfiltrován přes stříkačkový filtr o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$ .



## 2.4 Validace analytické metody HPLC

### 2.4.1 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky CS4 a CS3 byly připraveny rozředěním zásobního roztoku do odměrných baněk o objemu 50 ml. Pro roztok CS4 činil pipetovaný objem 500  $\mu$ l a pro roztok CS3 50  $\mu$ l. Roztok CS2 a CS1 byly připraveny rozředěním roztoku CS4 do odměrných baněk o objemu 50 ml. Pro roztok CS2 činil pipetovaný objem 500  $\mu$ l a pro roztok CS1 50  $\mu$ l.

Kalibrační roztok	Koncentrace [mg/l]
CS1	0,01
CS2	0,10
CS3	1,00
CS4	10,0
ZR	1000

### 2.4.2 Podmínky chromatografické metody

kolona:	Kinetex XB-C18 4,6 x 100 mm, 2,6 $\mu$ m
mobilní fáze:	A 25 % methanol B 75 % ultra-čistá voda
eluce:	isokratická
průtok mobilní fáze:	1 ml/min
teplota kolony:	25 °C
nástřikový objem:	30 $\mu$ l
detekční vlnová délka:	272 nm
doba analýzy:	5 min.
retenční čas:	3,65 min.

### 2.4.3 Parametry validace

#### Linearita

Linearita byla stanovena z kalibrační křivky ze sady kalibračních roztoků.

#### Opakovatelnost nástřiku

Tento parametr byl získán opakovaným změřením stejného kalibračního roztoku CS2, který zároveň sloužil při analýzách jako kontrolní roztok.

### Přesnost a správnost metody

Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo na analytické váze naváženo 50 mg kofeinu. Následně bylo do baňky přidáno cca 20 ml fyziologického roztoku. Poté byla baňka umístěna do ultrazvuku do doby, než se kofein rozpustil. Po rozpuštění pevného podílu byla baňka doplněna po rysku na definovaný objem fyziologickým roztokem. Tímto postupem byly připraveny tři zásobní roztoky. Každý z těchto roztoků byl rozředěn do odměrné baňky o objemu 100 ml na požadované koncentrace.

Pro účely stanovení správnosti a přesnosti metody byly zvoleny následující koncentrace roztoků: 0,01 mg/l, 1,00 mg/l a 10,0 mg/l. Roztok o koncentraci 10,0 mg/l byl připraven ze zásobního roztoku, pipetovaný objem byl 1,00 ml. Roztok o koncentraci 1,00 mg/l byl připraven ze zásobního roztoku, pipetovaný objem byl 0,100 ml. Roztok o koncentraci 0,01 mg/l byl připraven z roztoku o koncentraci 10,0 mg/l, pipetovaný objem byl 0,100 ml. Přehled roztoků, navážek a vypočtených koncentrací je uveden v tabulce 6.

**Tabulka 6** - Zásobní a naředěné roztoky testovací látky pro stanovení přesnosti metody

Zásobní roztok číslo	Navážka [mg]	Koncentrace [mg/l]
1	49,7	994
2	50,1	1002
3	50,2	1004
Naředěný roztok číslo	Pipetovaný objem [ml]	Koncentrace [mg/l]
1 (ze ZR 1)	1,00	9,940
1 (ze ZR 2)	1,00	10,02
1 (ze ZR 3)	1,00	10,04
2 (ze ZR 1)	0,100	0,994
2 (ze ZR 2)	0,100	1,002
2 (ze ZR 3)	0,100	1,004
3 (ze NR 1)	0,100	0,00994
3 (ze NR 2)	0,100	0,01002
3 (ze NR 3)	0,100	0,01004

### Limit detekce a stanovitelnosti

Limit detekce byl vypočítán dle poměru signálu kalibračního standardu o nejnižší koncentraci k šumu matrice vzorku (fyziologický roztok). Hodnota šumu byla odečítána v úseku retenčního času kofeinu, tj. 3,6 až 4,2 minut. K výpočtu bylo použito deset hodnot.

## 2.5 Test penetrace kůže

### 2.5.1 Kontrola těsnosti difuzních komor

Po usazení membrán Strat-M do difuzní komory typu 1 byla akceptorová část komory naplněna nasyceným roztokem methylenové modři. Zkompletované difuzní komory byly vloženy do kádinek naplněné ultra-čistou vodou. Objem vody v kádinkách byl před vložením komory cca 400 ml. Po vložení bylo aplikováno množství 1 ml nasyceného roztoku methylenové modři na membránu. Komory byly v kádinkách s vodou ponechány po dobu 72 hodin.

### 2.5.2 Příprava kožních preparátů

#### Kožní preparát typu A

Kůže byla extrahována skalpelem z prasete v oblasti břicha. Po extrakci byl odstraněn skalpelem subkutánní tuk. Takto připravená kůže byla zabalena do alobalu a zamražena při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před začátkem experimentu byla ponechána na laboratorním stole při teplotě  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byly z kůže vyraženy pomocí raznice a kladiva terčíky o průměru 25 mm.



**Obrázek 11** - Fotografie extrahované prasečí kůže [22]



**Obrázek 12** - Fotografie raznice k přípravě terčíků kožních preparátů [22]

## Kožní preparát typu B

Kožní preparát z lidské kůže byl připraven rozmražením kůže za laboratorní teploty po dobu cca 60 minut. Po rozmražení byla kůže pomocí dermatomu seříznuta na požadovanou tloušťku cca 300  $\mu\text{m}$ . Jednotlivé terčíky byly vystříženy nůžkami, průměr terčíku byl přibližně 25 mm.

### 2.5.3 Příprava difuzních komor k experimentu

Mezi donorovou a akceptorovou část komory byl upevněn kožní preparát nebo membrána. Spojení obou částí bylo zajištěno klemou (v případě použití difuzních komor typu 1) nebo gumičkami (v případě použití difuzních komor typu 2).

Každá difuzní komora byla naplněna akceptorovou kapalinou po rysku na definovaný objem udaný výrobcem. Samotné naplnění probíhalo ve dvou krocích. V prvním kroku byla difuzní komora v ruce otočena o cca 45° tak, aby vzorkovací ramínko bylo v poloze svisle vzhůru. V druhém kroku byla zasunuta vzorkovacím ramínkem jehla injekční stříkačky s akceptorovou kapalinou. Po zasunutí jehly byla difuzní komora naplňována akceptorovou kapalinou z injekční stříkačky. Po naplnění prostoru difuzní komory k vzorkovacímu ramínku (hladina akceptorové kapaliny sahala po okraj vzorkovacího ramínka) byla difuzní komora otáčena plynule do vodorovné polohy. V této poloze se pokračovalo v plnění akceptorovou kapalinou do doby, než hladina dosáhla rysky.

Difuzní komora naplněná akceptorovou kapalinou byla ihned umístěna do vyhřívané lázně či termobloku.

### 2.5.4 Popis experimentů

Po uplynutí nezbytně dlouhé doby k vytemperování akceptorové kapaliny na požadovanou teplotu, byl pipetou nadávkován roztok testovací látky.

V určených časových intervalech (viz tabulka 7) byl pomocí injekční stříkačky s jehlou odebírán vzorek akceptorové kapaliny k analýze. Samotný odběr vzorku byl proveden zasunutím jehly vzorkovacím ramínkem na dno akceptorové části difuzní komory a plynulým vytažením pístu injekční stříkačky po rysku na požadovaný objem.

**Tabulka 7** - Časový harmonogram vzorkování akceptorové kapaliny

Odběr číslo	0*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Čas [min]	0	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440

0\* - nadávkování testovací látky

### **2.5.5 Čištění difuzních komor**

Po skončení experimentu byla každá komora rozebrána (uvolněním klemu či sundáním gumiček) a vyprázdněna od akceptorové kapaliny. Všechny části difuzní komory byly umístěny do kádinky se směsí ethanol, aceton a voda v přibližném poměru 1:1:1. Následně byla kádinka s obsahem umístěna do ultrazvuku po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byly všechny součásti difuzní komory vyjmuty a postupně omyty třikrát ultra-čistou vodou, acetonem a ethanolem. Po omytí byly všechny části umístěny do sušárny (teplota uvnitř sušárny byla nastavena na 115 °C).

### **2.5.6 Porovnání dávkování testovací látky**

Jedním ze sledovaných kritérií testování byl dávkovaný objem roztoku testovací látky, při zachování konstantního množství na jednotku plochy membrány. Porovnání dávkovaného objemu bylo testováno na difuzních komorách typu 1 za použití membrány Strat-M.

Při testování se vycházelo ze dvou různých koncentrací a to konkrétně z roztoku o koncentraci 4 g/l a 177 mg/l. Plocha membrány činila 1,77 cm<sup>2</sup>. Tudíž byl v jednom testu aplikován na povrch membrány objem 45 µl roztoku o koncentraci 4 g/l a v druhém testu 1000 µl roztoku o koncentraci 177 mg/l. Po přepočtu na absolutní množství aplikované látky na jednotku plochy dostaneme vždy 100 µg/cm<sup>2</sup>.

### **2.5.7 Porovnání vlivu obsluhy na výsledek experimentu**

Dalším kritériem testování bylo porovnání vlivu obsluhy na výsledek experimentu. Kompletní experiment prováděli dva různí pracovníci. Pracovník č. 1 je považován za zkušenou obsluhu experimentu. Pracovník č. 2 prováděl experiment poprvé, byl pouze teoreticky proškolen. Analýzu vzorků z obou experimentů prováděl pracovník č. 1.

### **2.5.8 Výroba nového přítlačného systému a jeho porovnání**

Během některých experimentů se při použití membrány Strat-M vyskytl problém s těsností difuzních komor. Netěsnosti se projevovaly menším únikem akceptorové kapaliny a jejím krystalizováním na vnějších hranách donorové a akceptorové části komory. V některých případech do akceptorové části vnikal vzduch, který tvořil pod membránou bublinu zabraňující toku testovací látky do akceptorové kapaliny.

V průběhu prací byla navržena experimentální klema, která dovoľovala regulovat přítlak donorové a akceptorové části komor pomocí šroubů. Na 3D tiskárně bylo vyrobeno deset kusů klem pro experimentální porovnání s originální klemou standardně dodávanou společně s difuzní komorou typu 1.

### **2.5.9 Stanovení přesnosti dávkování testovací látky**

#### **Objem 45 $\mu$ l**

Pístovou pipetou bylo nasáto 45  $\mu$ l ultra-čisté vody. Celý objem pipety byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Po ustálení váhy byla hodnota zapsána. Tímto způsobem bylo postupně naváženo třicet hodnot pomocí tří špiček stejného typu, které byly náhodně vybrány.

#### **Objem 1000 $\mu$ l**

Postup probíhal stejně jako v předchozím případě, pouze se pipetoval objem 1000  $\mu$ l.

### **2.5.10 Stanovení přesnosti odběru vzorků**

Injekční stříkačkou bylo z kádinky vždy odebráno 500  $\mu$ l ultra-čisté vody. Celý objem injekční stříkačky byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Po ustálení váhy byla hodnota zapsána. Tímto způsobem bylo postupně naváženo třicet hodnot pomocí tří různých vzorků injekčních stříkaček stejného typu, které byly náhodně vybrány.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

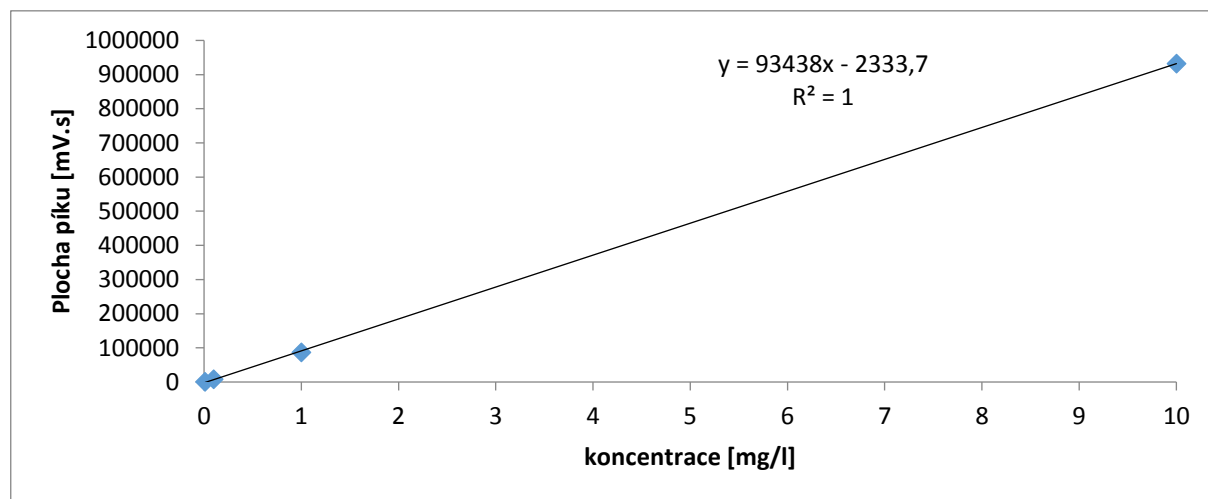
#### 3.1 Validace

##### 3.1.1 Linearita

Linearita byla vyhodnocena na základě ploch píků v závislosti na teoretické (vypočtené) koncentraci všech změřených kalibračních roztoků. Ze získaných hodnot byla vygenerována rovnice grafu a koeficient determinace  $R^2$ , který má hodnotu 1.

**Tabulka 8** - Přehled hodnot kalibrační řady

Kalibrační roztok	CS1	CS2	CS3	CS4
Koncentrace [mg/l]	0,01	0,1	1	10
Plocha píku [mV.s]	768	8231	87356	932411



**Graf 5** - Kalibrační přímka - linearita

### 3.1.2 Opakovatelnost nástřiku

Opakovatelnost nápichu byla spočítána ze směrodatné odchylky a průměrné hodnoty plochy píků z osmi nápichů roztoků CS<sub>2</sub>.

**Tabulka 9** - Vyhodnocení opakovatelnosti nápichu

Nápich č.	Plocha [mV·s]
1	9273
2	9308
3	9204
4	9197
5	9276
6	9216
7	9347
8	9340
Průměr	9270
SD	59,7
RSD [%]	0,640

### 3.1.3 Správnost metody

Správnost metody byla vyhodnocena z poměru skutečné koncentrace k teoretické koncentraci vyjádřena jako procento (tzv. výtěžnost).

**Tabulka 10** - Vyhodnocení přesnosti metody

Roztok	Koncentrace 10,00 mg/l			Koncentrace 1,000 mg/l			Koncentrace 0,01000 mg/l		
	Konc. teor.	Konc. skut.	Výtěžnost	Konc. teor.	Konc. skut.	Výtěžnost	Konc. teor.	Konc. skut.	Výtěžnost
ze ZR číslo	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]	[mg/l]	[%]
1	9,94	9,93	99,9	0,994	0,986	99,2	0,00994	0,00976	98,2
2	10,02	9,95	99,3	1,002	1,010	101,0	0,01002	0,00913	91,1
3	10,04	9,98	99,4	1,004	0,987	98,3	0,01004	0,00985	98,1
Průměr	---	9,95	---	---	0,994	---	---	0,00958	---
SD	---	0,0262	---	---	0,014	---	---	0,00039	---
RSD [%]	---	0,264	---	---	1,37	---	---	4,09	---
Průměrná výtěžnost	---	---	99,5	---	---	99,4	---	---	95,8



### 3.1.4 Limit detekce a stanovitelnosti

Limit detekce a stanovitelnosti byl vyhodnocen na základě poměru signálu k šumu. Výsledek byl získán výpočtem  $RF_h$  faktoru z odezvy nejméně koncentrovaného kalibračního roztoku a průměrné hodnoty plochy píků šumu.

**Tabulka 11** - Vyhodnocení šumu

Nápich č.	Výška odezvy [mV]
1	19
2	12
3	18
4	18
5	17
6	19
7	32
8	19
9	29
10	24
Průměr	20,7
SD	5,96
RSD [%]	28,8

**Tabulka 12** - Výpočet odezvového faktoru  $RF_h$

Kalibrační roztok	Koncentrace [mg/l]	výška odezvy [mV]	$RF_h$ [mg/l/mV]
CS1	0,01	81	0,000123

**Tabulka 13** - Výpočet LOD a LOQ

LOD	3 krát průměrná hodnota šumu . $RF_h$	0,00767 mg/l
LOQ	10 krát průměrná hodnota šumu . $RF_h$	0,0256 mg/l

### 3.1.5 Použité vzorce

Výpočet relativní směrodatné odchylky (4):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

Kde  $RSD$  je relativní směrodatná odchylka,  $SD$  je výběrová směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je průměr.

Výpočet výběrové směrodatné odchylky (5):

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} (\sum_{i=1}^N x_i^2 - N\bar{x}^2)} \quad (5)$$

Kde  $SD$  je výběrová směrodatná odchylka,  $N$  je počet měření,  $x$  jsou naměřené hodnoty a  $\bar{x}$  je průměr naměřených hodnot.

Výpočet průměru (6):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (6)$$

Kde  $\bar{x}$  je aritmetický průměr,  $n$  je počet naměřených hodnot a  $x$  jsou naměřené hodnoty.

Výpočet odezvového faktoru (7):

$$RF_h = \frac{c}{H} \quad (7)$$

Kde  $RF_h$  [mg/l/mV] je odezvový faktor,  $c$  [mg/l] je koncentrace analytu a  $H$  [mV] je výška odezvy analytu.

### 3.1.6 Souhrn

Metoda z hlediska linearity, opakovatelnosti nápicu, přesnosti a správnosti vyhovuje přijatým referenčním hodnotám.

**Tabulka 14** - Souhrn parametrů validace

Parametr	Referenční hodnota	Naměřená hodnota	Potvrzení
Linearita	$\geq 0,99$	1,00	ANO
Opakovatelnost nápicu	$\leq 2 \%$	0,64 %	ANO
Přesnost	$\leq 2 \%$	0,264%; 1,37 %; 4,09 %	NE
Správnost	80 - 120 %	99,5 %; 99,4 %; 95,8 %	ANO
LOD	---	0,00767 mg/l	ANO
LOQ	0,0100 mg/l	0,0256 mg/l	NE

## 3.2 Test penetrace kůže

### 3.2.1 Použité vzorce

Pro grafickou prezentaci výsledků bylo potřeba přepočítat koncentraci z analyzovaných vzorků na kumulativní množství v závislosti na ploše. K přepočtům byly použity tyto kroky.

Převod koncentrace na absolutní množství testovací látky v akceptorové části komory byl proveden dle rovnice (8):

$$m_{akc} = \frac{C_{analýza} \cdot V_{komora}}{V_{vztažený\ objem}} \quad (8)$$

Kde  $m_{akc}$  [mg] je absolutní množství analytu v akceptorové části difuzní komory,  $C_{analýza}$  [mg/l] je koncentrace vzorku vypočtena z rovnice regrese kalibrační přímky,  $V_{komora}$  [l] je objem difuzní komory a  $V_{vztažený\ objem}$  [l] je objem, na který je vztažena jednotka koncentrace.

Výpočet absolutního odebraného množství testovací látky z akceptorové části komory byl proveden dle rovnice (9):

$$m_{odebrané} = \frac{m_{akc} \cdot V_{odebrané}}{V_{komora}} \quad (9)$$

Kde  $m_{odebrané}$  [mg] je množství odebraného analytu,  $m_{akc}$  [mg] je množství analytu v akceptorové části difuzní komory,  $V_{odebrané}$  [l] je objem vzduchu akceptorové kapaliny, který byl odebrán a  $V_{komora}$  [l] je objem difuzní komory.

Výpočet kumulativního množství byl proveden dle rovnice (10):

$$Q_m = m_{akc} + \sum_{i=m}^n m_{odebrané_m} + m_{odebrané_{m+1}} + \dots + m_{odebrané_{n-1}} \quad (10)$$

Kde  $Q_m$  [mg] je kumulativní množství,  $m_{akc}$  [mg] je absolutní množství analytu v akceptorové části difuzní komory a  $m_{odebrané}$  [mg] je množství odebraného analytu.

Vztažení kumulativního množství na jednotku plochy bylo provedeno dle rovnice (11):

$$\frac{Q_m}{S} = \frac{Q_m}{S_{donor}} \quad (11)$$

Kde  $Q_m/S$  [mg/cm<sup>2</sup>] je kumulativní množství vztažené na jednotku plochy donorové části difuzní komory,  $Q_m$  [mg] je kumulativní množství a  $S_{donor}$  [cm<sup>2</sup>] je plocha donorové části difuzní komory.

K vypočítání hodnot flux a lag time byl použit software SAMPA.

### 3.2.2 Souhrnné výsledky

**Tabulka 15** - Souhrnné výsledky ze všech provedených testů

Pracovník	Difuzní komora a přítlačný systém	Kožní preparát	Dávka	Flux	RSD	Lag time	RSD	RSD odběrů
Číslo	Typ	Typ	[μl/cm <sup>2</sup> ]	[μg/cm <sup>2</sup> /h]	[%]	[min]	[%]	[%]
1	1, klema typu A	A	25	0,55	37,8	251	39,7	88,7
2	1, klema typu A	Strat-M	25	1,35	36,4	26,9	115	47,8
1	1, klema typu B	Strat-M	25	3,41	44,6	137	29,7	34,7
1	1, klema typu B	Strat-M	25	2,40	59,2	45,0	79,5	49,1
1	1, klema typu A	Strat-M	560	0,29	53,9	67,5	23,0	16,1
1	1, klema typu A	Strat-M	560	0,52	25,3	328	72,2	19,1
1	2, gumičky	A	25	2,06	35,7	257	15,6	41,3
1	2, gumičky	B	25	2,74	40,2	56,0	11,0	34,0
1	2, gumičky	Strat-M	25	7,40	117	37,3	101	76,1

### 3.2.3 Porovnání difuzních komor

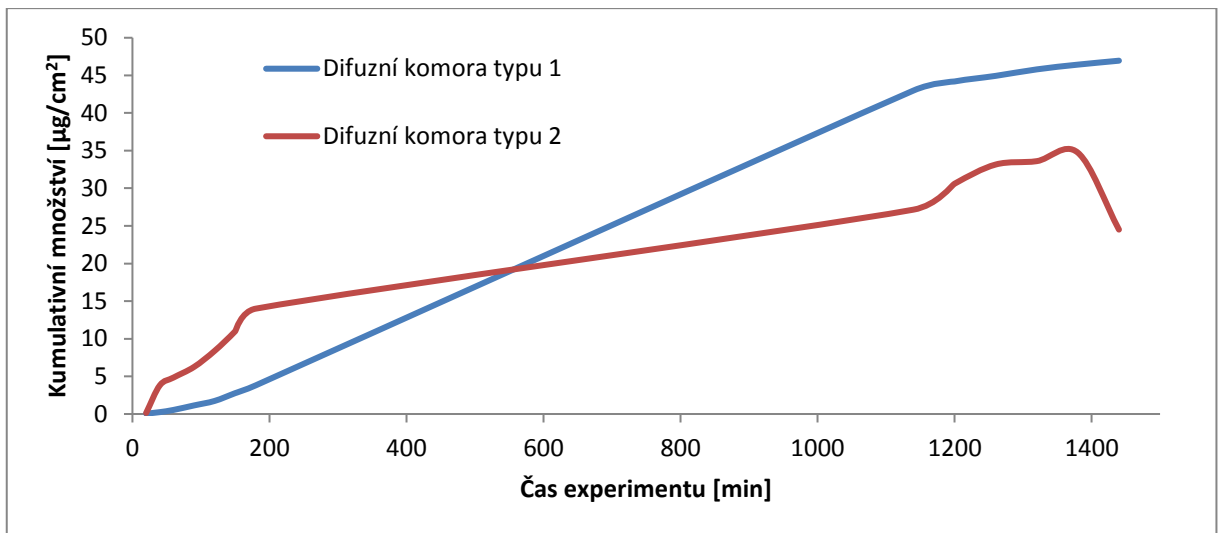
Porovnávání difuzních komor probíhalo za použití membrány a kožního preparátu zhotoveného z prasečí kůže.

Podmínky a použité vybavení při testování vhodnosti difuzních komor typu 1 a typu 2:

Membrána:	Strat-M
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 µl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	Typ A a typ B
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	10

Graf 6 znázorňuje porovnání dvou typů difuzních komor za použití membrány. V případě difuzních komor typu 1 nedošlo během experimentu k abnormálnímu chování, které by zásadně ovlivnilo výsledek testování. Pouze jedna difuzní komora vykazovala netěsnost (vniknutí vzduchu pod membránu v akceptorové části komory) ihned po započetí experimentu. Tu se nepodařilo v průběhu testu odstranit. Jedna komora vykazovala větší hodnotu fluxu oproti zbytku difuzních komor, což mohlo být zapříčiněno odchylkou v dávkování testovací látky na membránu. Při pohledu na křivku difuzní komory typu 1 se dá říci, že její průběh je naprosto ideální a odpovídá předpokladům pro metodu testování látek s konečnou dávkou.

Naopak při pohledu na křivku difuzní komory typu 2 je patrný nestandardní průběh. Ten byl způsoben netěsností difuzních komor. Netěsnosti způsobovaly únik akceptorové kapaliny (a tím způsobenou ztrátu analytu, který prošel membránou) a vnikání vzduchu, který se hromadil pod membránou a zabraňoval tak průniku roztoku testovací látky. Nedá se také vyloučit únik roztoku testovací látky z donorové části difuzní komory a jeho průtok okolo membrány do akceptorové části. Difuzní komory, které protékaly, byly z testování vyřazeny, resp. vzorkování v definovaném časovém intervalu bylo přerušeno, vzorek se odebral až na konci experimentu pro numerické potvrzení anomálního chování.

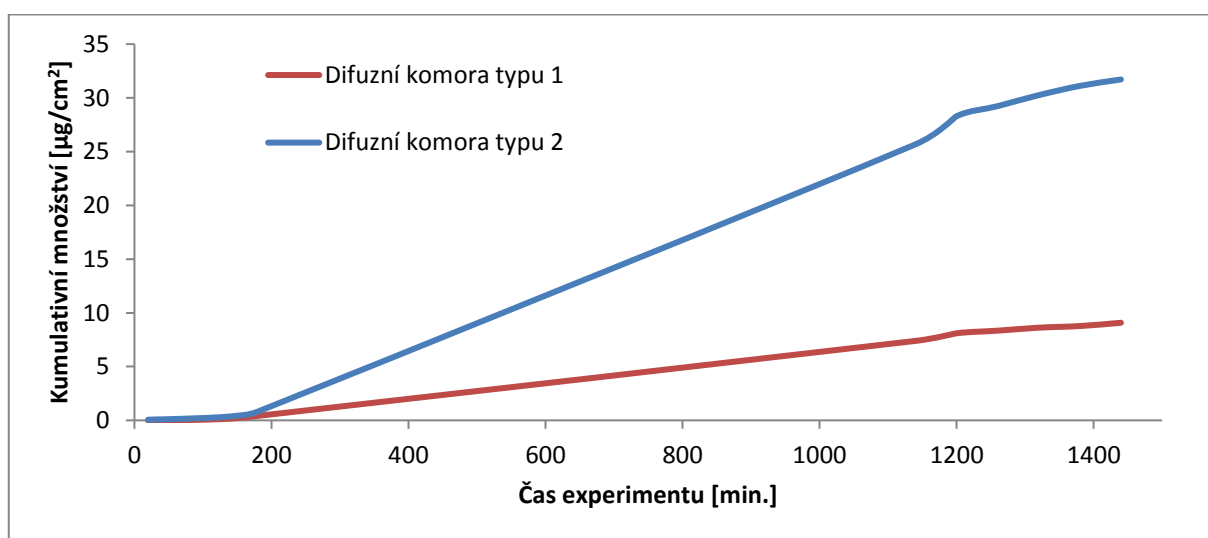


**Graf 6** - Grafické porovnání difuzních komor za použití membrány Strat-M

Podmínky a použité vybavení při testování vhodnosti difuzních komor typu 1 a typu 2:

Kožní preparát:	Prasečí kůže
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 µl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	Typ A a typ D
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	10

Graf 7 znázorňuje porovnání dvou typů difuzních komor za použití kožního preparátu zhotoveného z prasečí kůže. Při pohledu na obě křivky je patrný téměř ideální průběh. Jediný rozdíl mezi křivkami difuzní komory A a difuzní komory B je sklon křivky v intervalu 180 až 1140 minut. Rozdíl může být zapříčiněn kožním preparátem. V den rozmrazení kůže se testovali difuzní komory typu 1. Komory typu 2 se ověřovali o tři dny později. Kůže se znovu nezamrazovala, byla pouze umístěna do lednice a mohlo tak dojít k fyziologickým změnám v její struktuře. Rozdíl vykazuje tedy i vypočtený průměrný tok pro difuzní komoru typu 1, který je 0,554 µg/cm<sup>2</sup>/h a pro difuzní komoru typu 2 je průměrný flux testovací látky 2,06 µg/cm<sup>2</sup>/h, při velice podobných „zpožděních“ (lag time) 251 minut a 257 min.



**Graf 7** - Grafické porovnání difuzních komor za použití kožního preparátu typu A

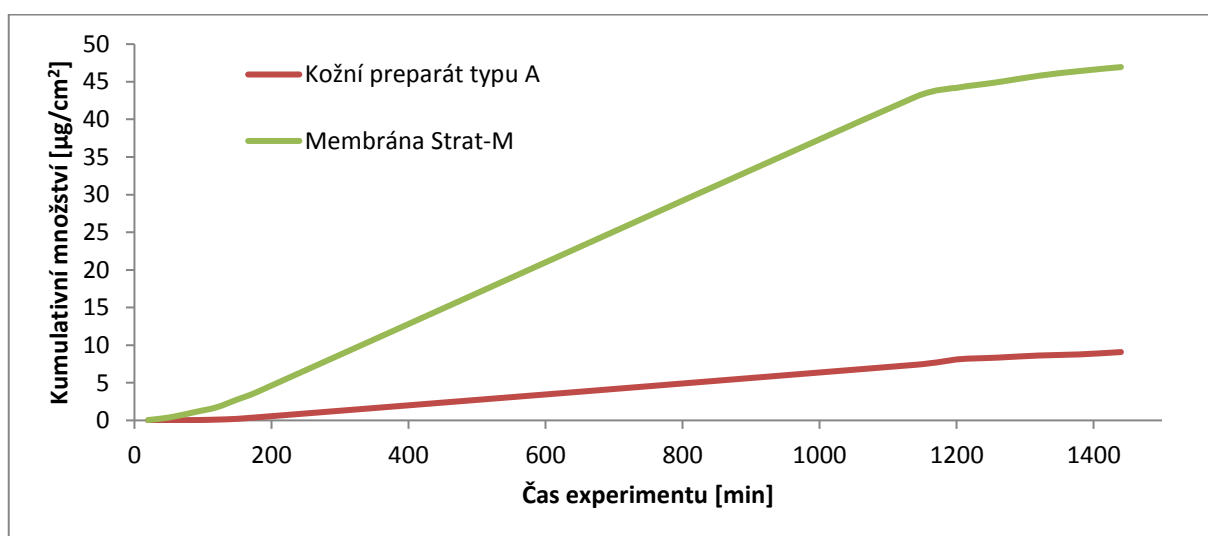
### 3.2.4 Porovnání kožních preparátů a jejich náhrad

Porovnávání kožních preparátů a jejich náhrad probíhalo za použití difuzních komor typu 1 a typu 2.

Podmínky a použité vybavení při testování vhodnosti kožního preparátu typu A a membrány Strat-M:

Difuzní komora:	Typ 1
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 μl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	Typ A a typ D
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	10

Graf 8 znázorňuje porovnání kožního preparátu typu A a membrány Strat-M za použití difuzní komory typu 1. Při pohledu na křivky kožního preparátu typu A a membrány Strat-M se dá říci, že jejich průběhy jsou naprosto ideální a odpovídá předpokladům pro metodu testování látek s konečnou dávkou. Jediný rozdíl je ve strmosti křivek tzn. v maximální absorpční rychlosti, která je u membrány 3,41 μg/cm<sup>2</sup>/h proti 0,554 μg/cm<sup>2</sup>/h u kůže, v tomto případě 7x vyšší a zpoždění téměř dvakrát kratší, tj. v případě membrán 137 minut proti 251 minut u prasečí kůže.



**Graf 8** - Grafické porovnání kožního preparátu typu A a membrány - difuzní komora typ 1



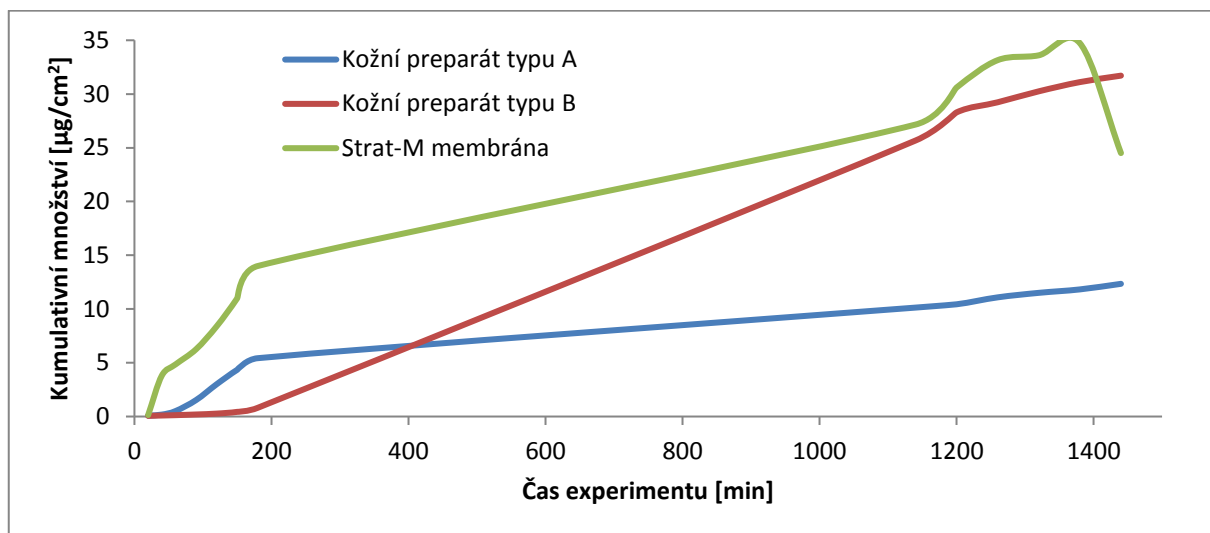
Podmínky a použité vybavení při testování vhodnosti kožních preparátů typu A, B a membrány Strat-M:

Difuzní komora:	Typ 2
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 µl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	typ B a typ D
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	10

Graf 9 znázorňuje porovnání kožních preparátů typu A, B a membrány Strat-M za použití difuzní komory typu 2. Tento typ difuzních komor se ukázal vhodný zejména pro kožní preparáty. Při testech s membránou Strat-M docházelo k velmi nestandardnímu chování. To se projevovalo jako netěsnost difuzních komor. Netěsnosti způsobovaly únik akceptorové kapaliny (a tím způsobenou ztrátu analytu, který prošel membránou) a vnikání vzduchu, který se hromadil pod membránou a zabraňoval tak průniku roztoku testovací látky. Nedá se také vyloučit únik roztoku testovací látky z donorové části difuzní komory a jeho průtok okolo membrány do akceptorové části. Difuzní komory, které protékaly, byly z testování vyřazeny, resp. vzorkování v definovaném časovém intervalu bylo přerušeno, vzorek se odebral až na konci experimentu pro numerické potvrzení anomálního chování.

Při detailním pohledu na křivku pro kožní preparát typu B lze pozorovat v bodě 180 minut inflexní bod, který mění sklon křivky. Podobné anomálie mají příčinu ve vniknutí vzduchu do akceptorové části difuzní komory a vytvoření vzduchové bubliny pod kožním preparátem. Při experimentu však nebyla zpozorována žádná vzduchová bublina.

Získané výsledky pro membránu Strat-M zde nebudou porovnávány s kožními preparáty typu A a B z důvodů rozdílných souborů dat. Mezi lidskou a prasečí kůží v tomto pokusu byl největší rozdíl zejména v hodnotě zpoždění, který je u lidské kůže 4,5krát kratší (257 min prasečí a 56 minut lidská). Toky pro oba typy kožních preparátů prasečí  $2,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  a lidská  $2,74 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  jsou v rozmezích  $2,24 \pm 1,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ , které vyplynulo z porovnávacího mezilaboratorního testu pro lidskou kůži [28].



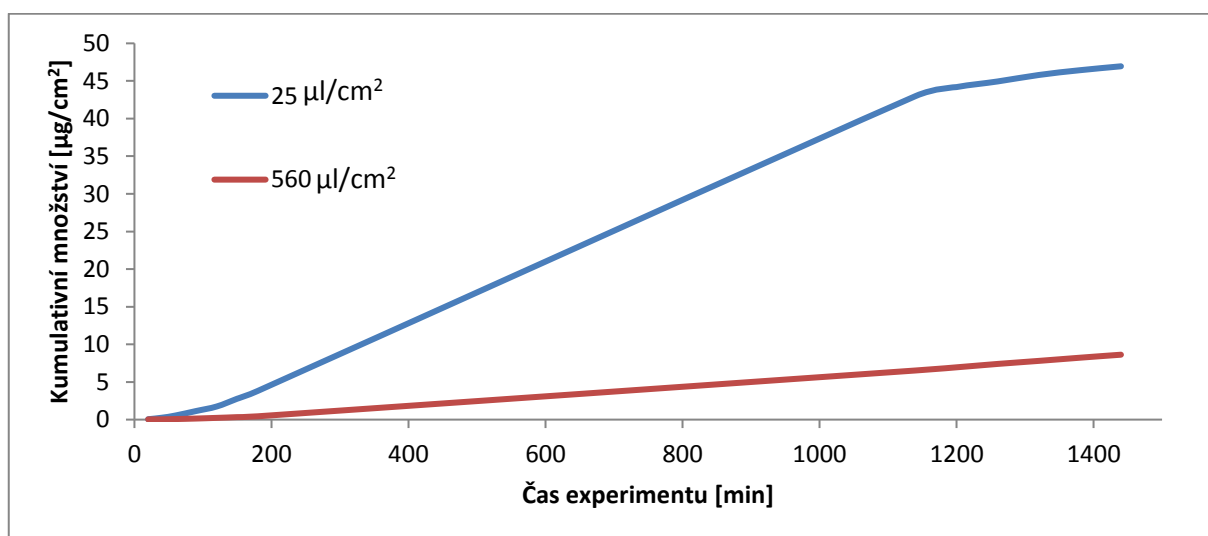
**Graf 9** - Grafické porovnání různých kožních preparátů a membrány - difuzní komora typ 2

### 3.2.5 Porovnání dávkování testovací látky

Podmínky a použité vybavení při testování vhodné dávky testovací látky:

Difuzní komora:	Typ 1
Membrána:	Strat-M
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 µl/cm <sup>2</sup> a 560 µl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l a 177 mg/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	typ A
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	10

Graf 10 znázorňuje porovnání dvou rozdílných koncentrací a dávek. Pro dávku 25 µl/cm<sup>2</sup> je průměrný flux testovací látky 3,41 µg/cm<sup>2</sup>/h a průměrný lag time 137 minut. Průměrné RSD fluxu je 44,6 % a průměrné RSD lag time 29,7 %. Průměrná hodnota RSD z jednotlivých časových bodů odběru vzorku je 34,7 %. Pro dávku 560 µl/cm<sup>2</sup> je průměrný flux testovací látky 0,515 µg/cm<sup>2</sup>/h a průměrný lag time 328 minut. Průměrné RSD fluxu je 25,3 % a průměrné RSD lag time 72,7 %. Průměrná hodnota RSD z jednotlivých časových bodů odběru vzorku je 19,1 %. Z těchto výsledků je vidět, že penetrace z menšího objemu probíhá rychleji i s menším zpožděním. Rozdíl ve směrnici obou křivek je zapříčiněn rozdílnou koncentrací roztoků testovací látky. Hlavní hnací silou je zde gradient koncentrací testované látky pod a nad membránou, resp. rozdíl koncentrací testované látky v akceptorové a donorové části komory.



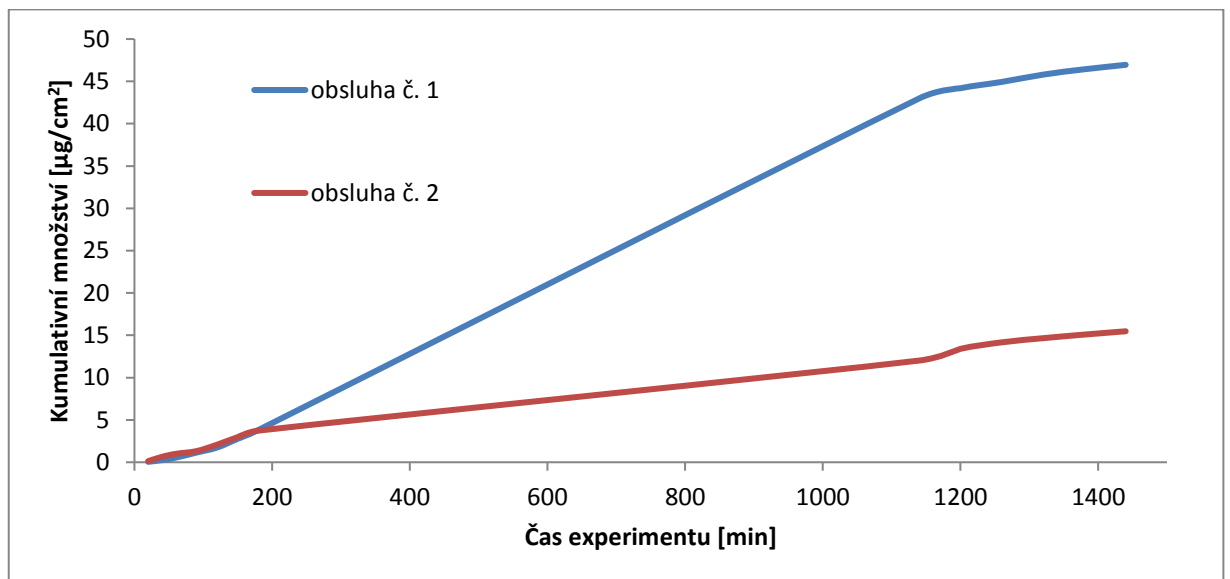
Graf 10 - Grafické porovnání různých aplikovaných objemů k ploše membrány

### 3.2.6 Porovnání vlivu obsluhy

Podmínky a použité vybavení při testování vlivu pracovníka na výsledek experimentu:

Difuzní komora:	Typ 1
Membrána:	Strat-M
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 µl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	typ A a typ B
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	10

Graf 11 znázorňuje porovnání vlivu pracovníka, který experiment provádí. Experiment provedli dva pracovníci nezávisle na sobě. Křivka pracovníka č. 1 má poměrně ideální průběh. Z výsledků obou pokusů, které jsou uvedené v tabulce 15, vyplývá, že obsluha difuzních komor vyžaduje delší zácvik.



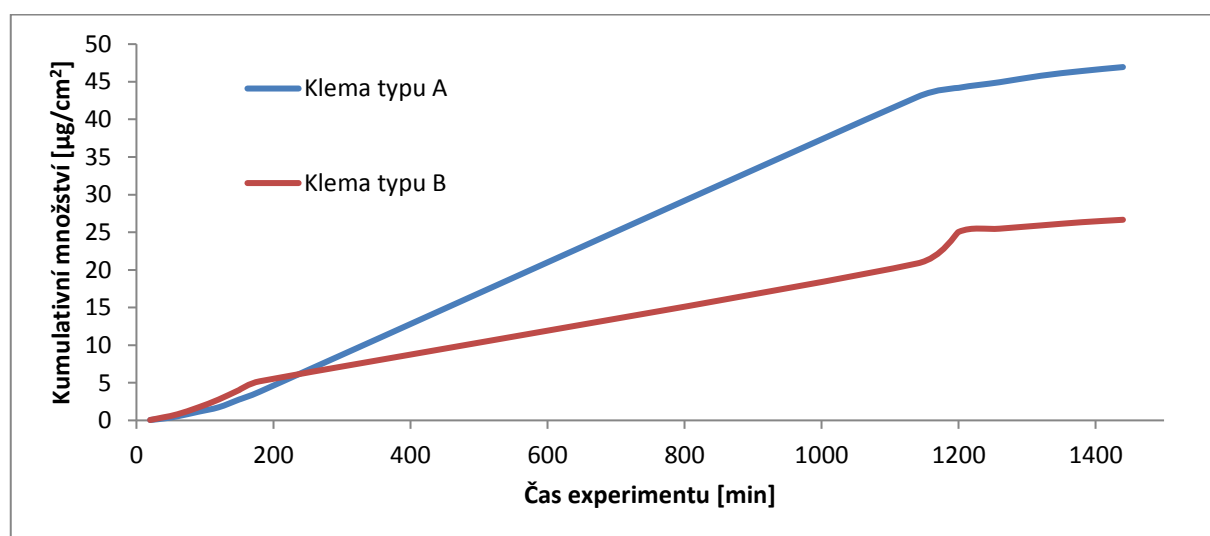
Graf 11 - Vliv obsluhy na výsledek testování

### 3.2.7 Porovnání přítlačného systému

Podmínky a použité vybavení při testování přítlačných systémů:

Difuzní komora:	Typ 1
Membrána:	Strat-M
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	25 μl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	4 g/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	typ A
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	5

Graf 12 znázorňuje porovnání přítlačných systémů a jejich vliv na experiment. Cílem pokusu s 3D klemou bylo dosáhnout větší těsnosti difuzních komor typu 1. Navržená klema neumožňovala zasunutí více než pěti zkompletovaných difuzních komor do termobloku. Bohužel problémy s netěsností a vnikáním vzduchu do akceptorové části difuzních komor se tímto nevyřešily. Nové 3D klemy (klema typu B) jsou utahována šrouby a nelze vyloučit, že u některých difuzních komor byl přítlak tak silný, že vnitřní hrana akceptorové části difuzní komory fyzicky nepoškodila tenkou svrchní vrstvu membrány, která je tvořena syntetickými lipidy. Na vývoji 3D klemy se bude ještě pokračovat.

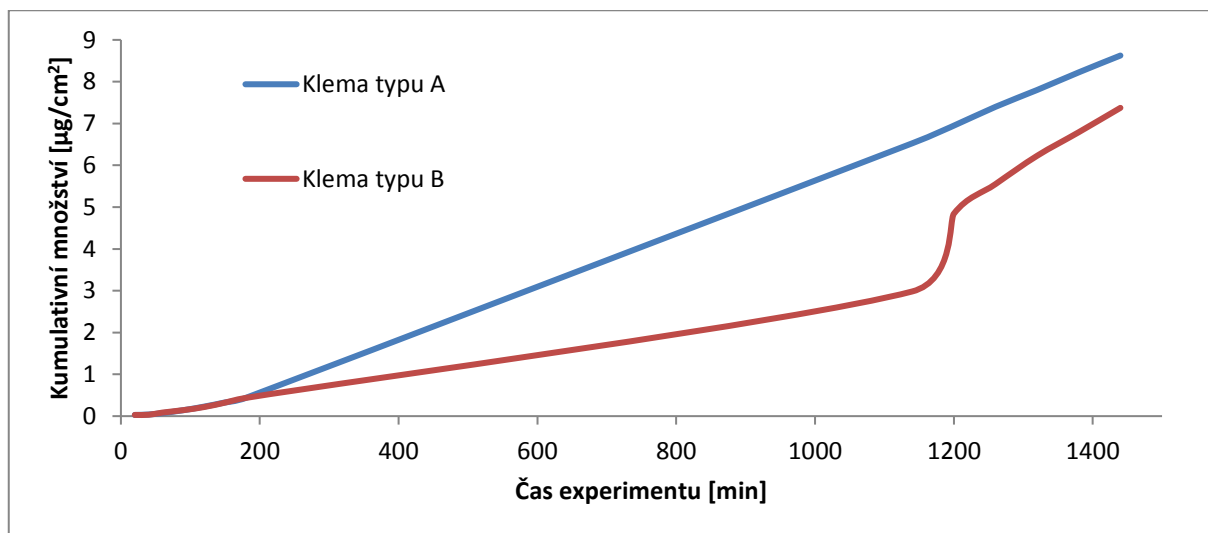


Graf 12 - Porovnání klemy, dávkovaný objem testovací látky 25 μl/cm<sup>2</sup>

Experiment byl za stejných podmínek a parametrů zopakován. Lišil se pouze dávkovaným objemem roztoku testovací látky při zachování konstantního množství (viz bod 3.2.3). Podmínky a použité vybavení při testování přítlačných systémů byly:

Difuzní komora:	Typ 1
Membrána:	Strat-M
Plocha:	1,77 cm <sup>2</sup>
Aplikovaný objem:	560 μl/cm <sup>2</sup>
Koncentrace roztoku testovací látky:	177 mg/l
Rychlost míchání:	400 ot/min
Odběrová stříkačka:	typ A
Teplota akceptorové kapaliny:	32°C
Počet replikací v jednom testu:	5

Graf 13 znázorňuje porovnání přítlačných systémů a jejich vliv na experiment. Z průběhu křivek i při této dávce je patrné, že použití klemy s utažením pomocí šroubů nepomohlo vyřešit problémy s občasnou netěsností komor při použití membrány. Průnik vzduchu do většiny komor zřejmě vedl k snížení průměrného toku téměř na polovinu ve srovnání s klemou dodanou původně výrobcem.



Graf 13 - Porovnání klem, dávkovaný objem testovací látky 560 μl/cm<sup>2</sup>

### 3.2.8 Stanovení přesnosti dávkování testovací látky

Pístovou pipetou bylo z kádinky vždy nasáto (do první polohy pístu) 45  $\mu$ l ultra-čisté vody. (Tabulka 16). Celý objem pipety byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Nejvyšší naměřená odchylka dávkování roztoku testovací látky vyjádřená jako RSD je 0,830 %.

**Tabulka 16** - Stanovení přesnosti dávkování testovací látky, objem 25  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>

Opakování č.	Špička č.		
	1 [mg]	2 [mg]	3 [mg]
1	44,3	44,0	44,2
2	44,1	44,5	44,2
3	44,1	45,3	45,0
4	44,5	44,8	44,6
5	44,6	44,7	45,0
6	44,6	44,6	44,8
7	44,5	44,8	44,1
8	45,3	44,4	44,6
9	44,1	45,2	44,8
10	44,7	44,5	44,9
Průměr	44,5	44,7	44,6
Medián	44,5	44,7	44,7
Min	44,1	44,0	44,1
Max	45,3	45,3	45,0
Rozpětí	1,23	1,26	0,880
SD	0,366	0,371	0,325
RSD [%]	0,823	0,830	0,727

Pístovou pipetou bylo z kádinky vždy nasáto (do první polohy pístu) 1000  $\mu\text{l}$  ultra-čisté vody. (Tabulka 17). Celý objem pipety byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Nejvyšší naměřená odchylka dávkování roztoku testovací látky vyjádřená jako RSD je 1,63 %.

**Tabulka 17** - Stanovení přesnosti dávkování testovací látky, objem 1000  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

Opakování č.	Špička č.		
	1 [mg]	2 [mg]	3 [mg]
1	0,998	0,992	0,969
2	1,01	1,01	1,00
3	1,00	1,00	1,02
4	0,998	0,986	0,995
5	0,995	1,00	0,993
6	1,00	0,997	0,967
7	1,00	0,993	1,00
8	0,999	0,998	1,01
9	0,996	0,992	0,996
10	1,02	0,996	0,993
Průměr	1,00	0,996	0,994
Medián	1,00	0,997	0,996
Min	0,995	0,986	0,967
Max	1,02	1,01	1,02
Rozpětí	0,0250	0,0240	0,0530
SD	0,00763	0,0064	0,0162
RSD [%]	0,762	0,646	1,630

Experimentálně bylo zjištěno, že odchylka vzniklá dávkováním má nízký vliv na celkovou přesnost výsledku experimentu. V případě dávkování 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  i 560  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  roztoku testovací látky byla pod dvě procenta, což je zcela přijatelné a výsledek nijak zásadně neovlivní.



### 3.2.9 Stanovení přesnosti odběru vzorků

Injekční stříkačkou typu A bylo z kádinky vždy odebráno 500  $\mu$ l ultra-čisté vody. (Tabulka 18). Celý objem injekční stříkačky byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Nejvyšší naměřená odchylka dávkování roztoku testovací látky vyjádřená jako RSD je 1,50 %.

**Tabulka 18** - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu A

Odběr č.	Stříkačka č.		
	1 [mg]	2 [mg]	3 [mg]
1	498	479	506
2	505	488	489
3	499	490	502
4	502	472	499
5	499	493	497
6	502	490	502
7	501	490	491
8	500	498	487
9	503	492	486
10	508	485	489
Průměr	502	488	495
Medián	501	490	494
Min	498	472	486
Max	508	498	506
Rozpětí	10,4	26	20,3
SD	3,1	7,3	7,2
RSD [%]	0,61	1,50	1,46

Injekční stříkačkou typu B bylo z kádinky vždy odebráno 500  $\mu$ l ultra-čisté vody. (Tabulka 19). Celý objem injekční stříkačky byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Nejvyšší naměřená odchylka dávkování roztoku testovací látky vyjádřená jako RSD je 6,34 %.

**Tabulka 19** - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu B

Odběr č.	Stříkačka č.		
	1 [mg]	2 [mg]	3 [mg]
1	577	523	523
2	546	523	507
3	475	530	543
4	490	509	484
5	488	520	525
6	506	517	535
7	522	553	530
8	493	501	524
9	548	517	500
10	504	503	546
Průměr	515	520	522
Medián	505	519	525
Min	475	501	484
Max	577	553	546
Rozpětí	102,0	52	62,0
SD	32,6	14,9	19,5
RSD [%]	6,34	2,86	3,73

Injekční stříkačkou typu C bylo z kádinky vždy odebráno 500  $\mu$ l ultra-čisté vody. (Tabulka 20). Celý objem injekční stříkačky byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Nejvyšší naměřená odchylka dávkování roztoku testovací látky vyjádřená jako RSD je 6,15 %.

**Tabulka 20** - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu C

Odběr č.	Stříkačka č.		
	1 [mg]	2 [mg]	3 [mg]
1	509	515	511
2	504	499	512
3	498	489	479
4	496	527	498
5	512	489	507
6	534	501	488
7	495	494	529
8	532	592	512
9	520	490	495
10	493	502	503
Průměr	509	510	503
Medián	507	500	505
Min	493	489	479
Max	534	592	529
Rozpětí	41,0	103	50,0
SD	15,1	31,3	14,2
RSD [%]	2,96	6,15	2,81

Injekční stříkačkou typu D bylo z kádinky vždy odebráno 500 µl ultra-čisté vody. (Tabulka 21). Celý objem injekční stříkačky byl vypuštěn do vytárované kádinky na analytické váze. Nejvyšší naměřená odchylka dávkování roztoku testovací látky vyjádřená jako RSD je 3,44 %.

**Tabulka 21** - Stanovení přesnosti odběru vzorků akceptorové kapaliny stříkačkou typu D

Odběr č.	Stříkačka č.		
	1 [mg]	2 [mg]	3 [mg]
1	483	481	497
2	443	482	474
3	489	469	517
4	495	496	513
5	494	489	498
6	504	494	474
7	498	495	488
8	494	489	482
9	489	469	496
10	487	482	490
Průměr	488	485	493
Medián	492	486	493
Min	443	469	474
Max	504	496	517
Rozpětí	61,0	27	43,0
SD	16,8	9,9	14,5
RSD [%]	3,44	2,04	2,95

Odběr konstantního objemu vzorku akceptorové kapaliny může mít vliv na přesnost konečného výsledku. Chyba se projeví hlavně po matematickém zpracování dat a to konkrétně v přepočtu naměřených koncentrací na kumulativní množství. Při tomto výpočtu se vždy definuje odebrané množství testovací látky mimo difuzní komoru, tím dochází ke kumulaci jednotlivých odchylek.

### 3.2.10 Kontrola těsnosti difuzních komor

Kontrola těsnosti komor měla probíhat spektrofotometricky, bohužel se kontrolní medium (ultra-čistá voda) zakalilo. To bránilo měření, proto byl test vyhodnocen vizuálně a doložen fotodokumentací.

Na obrázku 13 se nachází difuzní komory typu 1 s klemou typu A. V prvních třech kádinkách zleva lze pozorovat lehce namodralé zbarvení média.



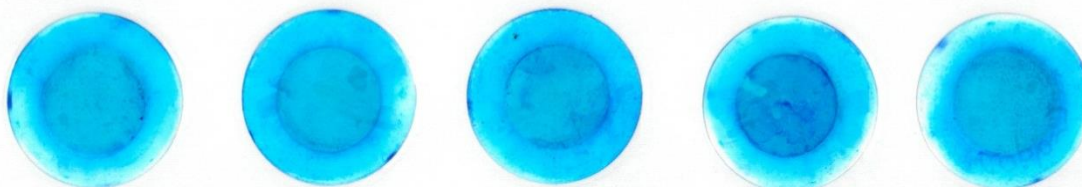
**Obrázek 13** - Testování těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu A [22]

Na obrázku 14 jsou difuzní komory typu A s klemou typu B na konci experimentu. Nebyl zde zpozorován modrý odstín média.



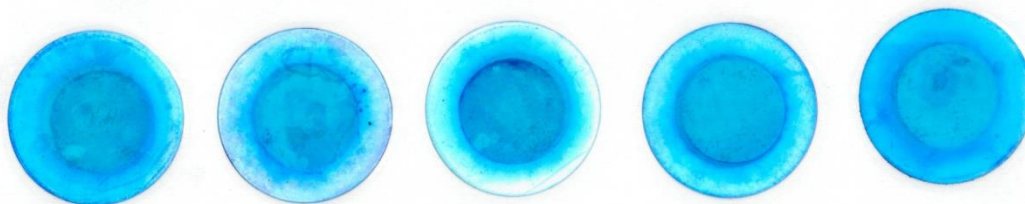
**Obrázek 14** - Testování těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu B [22]

Po vyprázdnění a rozebrání difuzních komor byly vyjmuty membrány a následně byly naskenovány pro další vizuální porovnání. Na obrázku 15 jsou membrány pocházející z difuzních komor opatřené klemou typu A. Za předpokladu dokonalé těsnosti by okraj membrány neměl být zbarven. Všechny membrány byly na okraji zbarveny.



**Obrázek 15** - Membrány Strat-M použité při kontrole těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu A [22]

Na obrázku 16 jsou membrány pocházející z difuzních komor opatřené klemou typu B. Za předpokladu dokonalé těsnosti by okraj membrány neměl být zbarven. Všechny membrány byly na okraji zbarveny, ale při vizuálním srovnání s obrázkem 15 je patrné, že jedna membrána oproti všem ostatním není na okraji silně zbarvena.



**Obrázek 16** - Membrány Strat-M použité při kontrole těsnosti difuzních komor typu 1 s klemou typu B [22]

## 4 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce bylo detailně rozebráno využití experimentu v praxi, legislativní rámec podporující upřednostnění použití testů *in vitro* před testy prováděnými *in vivo*. Dále bylo detailně popsáno provedení experimentu kožní penetrace dle nejrůznějších doporučení. V závěru teoretické práce je zpracována stručná rešerše zaměřená na analýzu látek s různou schopností penetrace, které se nejčastěji používají v mezilaboratorních testech. Zmíněna je zde i problematika validace metod k analýze látek pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie.

V experimentální části diplomové práce byl popsán průběh validace metody pro stanovení kofeinu pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie. Dále byl popsán průběh experimentů, při nichž se porovnávaly statické vertikální difuzní komory dle Franze, kožní preparáty a jejich náhrady, těsnost komor za použití dvou typů klem, vliv obsluhy na výsledek experimentu, odchylka dávkování testovací látky a přesnost odběru vzorků akceptorové kapaliny za použití čtyř typů injekčních stříkaček. V závěru experimentální části diplomové práce je popsána také metodika vizuální kontroly těsnosti difuzních komor.

Cílem experimentů bylo porovnat difuzní komory z hlediska přesnosti metody. Byly otestovány dva typy difuzních komor, komerční a vyrobené místním sklářem. Tyto komory byly porovnány z několika hledisek. Jedním z pohledů byla kompatibilita difuzních komor s kožními preparáty a jejich náhradami. Při použití náhrady tradičních kožních preparátů v podobě membrány Strat-M se objevil velký problém s těsností difuzních komor typu 2. Nejenom, že do difuzních komor pronikal vzduch, ale netěsnosti byly tak velké, že při manipulaci s nimi protékala akceptorová kapalina ven z akceptorové části difuzní komory. V tomto případě se jako vhodnější jeví difuzní komora typu 1, kde se problémy s těsností objevily také, ale projevovaly se pouze vnikáním vzduchu do akceptorové části komory a menším únikem akceptorové kapaliny. Únik byl však pomalejší a akceptorová kapalina tak stačila krystalizovat na vnějším rozhraní akceptorové a donorové části difuzní komory. Další sledovanou problematikou bylo porovnání vhodnosti komor z hlediska přesnosti provedení experimentu, při kterém se použil kožní preparát a to konkrétně typu A tj. prasečí kůže z břicha. Při těchto experimentech se problémy s těsností difuzních komor již neobjevily. Z numerických hodnot je patrné, že nejlépe dopadla difuzní komora typu 1.

Dalším cílem bylo vybrat vhodný biologický model nebo jeho náhradu. Do vyřešení problému s netěsnostmi difuzních komor při použití membrány nelze zodpovědně toto rozhodnutí učinit. Pokusy s kožními preparáty poskytly výsledky srovnatelné s literaturou, co se týče toku. Rozptyl výsledků se s hodnotami RSD mezilaboratorního testu však nedá porovnat z důvodu rozdílného počtu dat a nedostatku opakovaných pokusů. V průměru se při použití 10 komor RSD odběrů pohybuje mezi 35-45%. Takovouto variabilitu výsledků lze přisoudit problémům s těsností difuzní komory během experimentů. Je celkem pravděpodobné, že větší vliv na přesnost výsledků má těsnost komor než např. fyziologická variabilita kožních preparátů. Bohužel se tento zásadní nedostatek nepovedl během experimentů odstranit. Kožní preparáty typu B (tj. lidská kůže) byly testovány pouze na difuzních komorách typu 2, každopádně hodnota RSD fluxu 40,2 % je skoro totožná s hodnotou dosaženou s kožním preparátem typu A (tj. prasečí kůže) na difuzních komorách typu 2. Přitom příspěvek dávkování nebude významný.



## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SEMPLE, S. Dermal exposure to chemicals in the workplace: just how important is skin absorption?. *Occupational and Environmental Medicine* [online]. 2004, **61**(4), 376-382 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1136/oem.2003.010645. ISSN 1351-0711.  
Dostupné z: <http://oem.bmj.com/cgi/doi/10.1136/oem.2003.010645>
- [2] ANDERSON, Stacey E. a B. Jean MEADE. Potential Health Effects Associated with Dermal Exposure to Occupational Chemicals. *Environmental Health Insights* [online]. 2014, **81** [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.4137/EHI.S15258. ISSN 1178-6302.  
Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/EHI.S15258>
- [3] BUIST, Harrie, Peter CRAIG, Ian DEWHURST et al. Guidance on dermal absorption. *EFSA Journal* [online]. 2017, **15**(6) [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4873. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4873>
- [4] BROWN, J. R. a J. L. THORNTON. Percivall Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum. *Occupational and Environmental Medicine* [online]. 1957, **14**(1), 68-70 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1136/oem.14.1.68. ISSN 1351-0711.  
Dostupné z: <http://oem.bmj.com/cgi/doi/10.1136/oem.14.1.68>
- [5] KOTINGOVÁ, Lenka. *Kinetika vybraných látek při dermální expozici: (Polycyklické aromatické uhlovodíky)*. Hradec Králové, 2015. Disertační práce. Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- [6] *SECTION 4: HEALTH EFFECTS TEST NO. 428 SKIN ABSORPTION: IN VITRO METHOD: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. S.1* [online]. b.r. [cit. 2019-05-07].
- [7] TICHÝ, Miloň, Zdeněk ROTH, Karel BLÁHA a Andrew WORTH. Alternativní metody testování toxicity chemických látek *in silico*. *Chemické listy* [online]. b.r., , 675-681 [cit. 2019-05-07]. ISSN 1213-7103.  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_10\\_675-681.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_675-681.pdf)
- [8] HRABÁLEK, Alexandr, Pavel DOLEŽAL, Zdeňka ŠKLUBALOVÁ, Oldřich FARSA a Aleš KREBS. AKCELERANTY TRANSDERMALNI PENETRACE. *Chemické listy* [online]. 1999, (93) [cit. 2019-05-07]. ISSN 1213-7103.
- [9] *Směrnice Rady 76/768/EHS o sblížení právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků*. In: . Brusel, 2003.
- [10] *Zákon na ochranu zvířat proti týrání*. In: . Praha, 2008, ročník 2008, číslo 409.

- [11] HUBKA, Tomáš. *In vitro test kožní penetrace jako alternativní test toxicity*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [12] 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. 2019-05-07]. DOI: 10.1159/000375321. ISSN 1660-5527. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/375321>
- [13] DUGARD, P H, M WALKER, S J MAWDSLEY a R C SCOTT. Absorption of some glycol ethers through human skin *in vitro*. *Environmental Health Perspectives* [online]. 1984, **57**, 193-197 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1289/ehp.8457193. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.8457193>
- [14] KUZNETSOVA, E. G., V. A. RYZHIKOVA, L. A. SALOMATINA, V. A. TUKMACHEV a V. I. SEVASTIANOV. MICRONEEDLES AS A WAY TO INCREASE THE TRANSDERMAL INSULIN DELIVERY. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs* [online]. 2017, **18**(4), 87-92 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-4-87-92. ISSN 2412-6160. Dostupné z: <https://journal.transpl.ru/vtio/article/view/704>
- [15] Vertical Diffusion Cell Test System. In: *Copley scientific* [online]. b.r. [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: [https://www.copleyscientific.com/images/ww/side/\\_resized/67-01-A\\_288\\_0\\_0\\_0\\_362\\_404.jpg](https://www.copleyscientific.com/images/ww/side/_resized/67-01-A_288_0_0_0_362_404.jpg)
- [16] NG, Shiow-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. 2019-05-07]. DOI: 10.1208/s12249-010-9522-9. ISSN 1530-9932. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-010-9522-9>
- [17] V9-CA Stirrer. In: *Permegear* [online]. b.r. [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <https://permegear.com/wp-content/uploads/2015/07/v9ca01stirrer-thumb.jpg>
- [18] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), . *Dermal exposure assessment: A summary of EPA approaches*. [online]. 2007. Springfield, USA, 2007 [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: [https://ofmpub.epa.gov/eims/eimscomm.getfile?p\\_download\\_id=469581](https://ofmpub.epa.gov/eims/eimscomm.getfile?p_download_id=469581)

- [19] EMD MILLIPORE, . *Test without Limits!: Overcome the barriers to predicting diffusion in human skin* [online]. In: . b.r., s. 6 [cit. 2019-05-07].
- [20] SIMON, Alice, Maria Inês AMARO, Anne Marie HEALY, Lucio Mendes CABRAL a Valeria Pereira DE SOUSA. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin *with in vivo-in vitro* correlation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **512**(1), 234-241 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.08.052. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731630802X>
- [21] ZAJICEK, Robert, Eva MATOUSKOVA, Ludomir BROZ, Richard KUBOK, Petr WALDAUF a Radana KÖNIGOVA. New biological temporary skin cover Xe-Derma® in the treatment of superficial scald burns in children. *Burns* [online]. 2011, **37**(2), 333-337 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.burns.2010.07.009. ISSN 03054179. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417910001920>
- [22] HUBKA, Tomáš. *Vlastní fotografická dokumentace*. 2019.
- [23] HICKMAN, James. Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices. *Journal of Rare Diseases Research & Treatment* [online]. 2016, **1**(3), 46-52 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.29245/2572-9411/2016/3.1026. ISSN 25729411. Dostupné z: <http://www.rarediseasesjournal.com/articles/transepithelialendothelial-electrical-resistance-teer-theory-and-applications-for-microfluidic-bodyonachip-devices.html>
- [24] LEHMAN, Paul A., Kacie BEATCH, Sam G. RANEY a Thomas J. FRANZ. The Tritiated Water Skin Barrier Integrity Test: Considerations for Acceptance Criteria with and Without <sup>14</sup>C-Octanol. *Pharmaceutical Research* [online]. 2017, **34**(1), 217-228 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/s11095-016-2057-3. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-016-2057-3>
- [25] NETZLAFF, Frank, Karl-Heinz KOSTKA, Claus-Michael LEHR a Ulrich F. SCHAEFER. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells *in vitro*. Limitations shown by transport data testing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2006, **63**(1), 44-50 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.10.009. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641105002973>

- [26] HEYLINGS, Jon R., Diane J. DAVIES a Rebecca BURTON. Dermal absorption of testosterone in human and pig skin *in vitro*. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018, **48**, 71-77 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.12.014. ISSN 08872333.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233317303806>
- [27] SCHREIBER, S., A. MAHMOUD, A. VUIA et al. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicology in Vitro* [online]. 2005, **19**(6), 813-822 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.04.004. ISSN 08872333.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233305000652>
- [28] 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. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.yrtph.2004.02.004. ISSN 02732300.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230004000145>
- [29] 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. 2019-05-07].  
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>
- [30] TODO, Hiroaki, Takeshi OSHIZAKA, Wesam KADHUM a Kenji SUGIBAYASHI. Mathematical Model to Predict Skin Concentration after Topical Application of Drugs. *Pharmaceutics* [online]. 2013, **5**(4), 634-651 [cit. 2019-05-08].  
DOI: 10.3390/pharmaceutics5040634. ISSN 1999-4923.  
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1999-4923/5/4/634>
- [31] 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. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.07.017. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233317302035>
- [32] KIM, CHINHAN, JONGWON SHIM, SANGHOON HAN a IHSEOP CHANG. *The skin-permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient*. [online]. 6. 2002, **2002**(53), 363-374 [cit. 2019-04-08]. ISSN 1468-2494. PMID: 12512013. Dostupné z: <https://europepmc.org/abstract/med/12512013>

- [33] SCHÄFER-KORTING, Monika, Udo BOCK, Armin GAMER et al. Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study. *Alternatives to Laboratory Animals* [online]. 2019, **34**(3), 283-294 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1177/026119290603400312. ISSN 0261-1929.  
Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290603400312>
- [34] LEE, Cheon Koo, Takahiro UCHIDA, Kazuhisa KITAGAWA, Akira YAGI, Nak-Seo KIM a Shigeru GOTO. Skin Permeability of Various Drugs with Different Lipophilicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1994, **83**(4), 562-565 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1002/jps.2600830424. ISSN 00223549.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915494365>
- [35] HEARD, Charles M., Sarah JOHNSON, Gary MOSS a Chris P. THOMAS. *In vitro* transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, Paullinia Cupana. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2006, **317**(1), 26-31 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.02.042. ISSN 03785173.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851730600189X>
- [36] ATRUX-TALLAU, Nicolas, Fabrice PIROT, Françoise FALSON, Michael S. ROBERTS a Howard I. MAIBACH. Qualitative and quantitative comparison of heat separated epidermis and dermatomed skin in percutaneous absorption studies. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2007, **299**(10), 507-511 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/s00403-007-0789-y. ISSN 0340-3696.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00403-007-0789-y>
- [37] AKOMEAH, Franklin, Tahir NAZIR, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2004, **21**(2-3), 337-345 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.ejps.2003.10.025. ISSN 09280987.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098703003014>
- [38] TRAUER, Sindy, Alexa PATZELT, Nina OTBERG et al. Permeation of topically applied caffeine through human skin - a comparison of *in vivo* and *in vitro* data. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2009, **68**(2), 181-186 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x. ISSN 03065251.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x>

- [39] *Determination of Caffeine in Coffee Products: DIN 20481*. USA: Agilent technologies, 2016.
- [40] LASWICK, Patty Hall a John A. LASWICK. Caffeine and benzoic acid in soft drinks. *Journal of Chemical Education* [online]. 1972, **49**(10) [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1021/ed049p708. ISSN 0021-9584.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed049p708>
- [41] BELAY, Abebe, Kassahun TURE, Mesfin REDI a Araya ASFAY. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry* [online]. 2008, **108**(1), 310-315 [cit. 2019-05-07].  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.024. ISSN 03088146.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607010308>
- [42] SINGH, D.K. a Archana SAHU. Spectrophotometric determination of caffeine and theophylline in pure alkaloids and its application in pharmaceutical formulations. *Analytical Biochemistry* [online]. 2006, **349**(2), 176-180 [cit. 2019-05-07].  
DOI: 10.1016/j.ab.2005.03.007. ISSN 00032697.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269705001922>
- [43] PABLA, Dimple a Hossein ZIA. A Comparative Permeation/Release Study of Different Testosterone Gel Formulations. *Drug Delivery* [online]. 2008, **14**(6), 389-396 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1080/10717540701203075. ISSN 1071-7544.  
Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717540701203075>
- [44] LU, Wangding, Huafei LUO, Yubo WU, Zhuangzhi ZHU a Hao WANG. Preparation and characterization of a metered dose transdermal spray for testosterone. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2013, **3**(6), 392-399 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.10.003. ISSN 22113835.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383513000944>
- [45] KIM, Mi-Kyeong, Hong ZHAO, Chi-Ho LEE a Dae-Duk KIM. Formulation of a reservoir-type testosterone transdermal delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, **219**(1-2), 51-59 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00631-7. ISSN 03785173.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301006317>

- [46] DEGIM, I. Tuncer, W. John PUGH a Jonathan HADGRAFT. Skin permeability data: anomalous results. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1998, **170**(1), 129-133 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00113-6. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517398001136>
- [47] BODÉL, S., B. BAERT, M. VANGELE, J. LAMBERT, C. BURVENICH, G. SLEGEERS a B. SPIEGELEER. Stability of the OECD model compound benzoic acid in receptor fluids of Franz diffusion cells. *Pharmazie* [online]. Gent, Belgium, 2007, (62), 470-471 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1691/ph.2007.6.6307. Dostupné z: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/govi/00317144/v62n6/s16.pdf?expires=1557197353&id=0000&titleid=75007325&checksum=098C3D030CE25D6EB6CA7F85F3172620>
- [48] MACPHERSON, Sara E., Curtis N. BARTON a Robert L. BRONAUGH. Use of *in Vitro* Skin Penetration Data and a Physiologically Based Model to Predict *in Vivo* Blood Levels of Benzoic Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 1996, **140**(2), 436-443 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1006/taap.1996.0240. ISSN 0041008X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X96902409>
- [49] ARVAN, Kh. L. a G. A. KORSUNOVSKII. Variation of the absorption spectrum of methylene blue in the presence of its leuco form. *Journal of Applied Spectroscopy* [online]. 1972, **17**(4), 1364-1366 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1007/BF00940387. ISSN 0021-9037. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00940387>
- [50] ÉPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 2004, **38**(4), 212-228 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c. ISSN 0091-150X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:PHAC.0000038422.27193.6c>
- [51] SAPUTRI, Febrina Amelia a Muchtaridi MUCHTARIDI. ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF CAFFEINE IN GREEN COFFEE BEANS (*COFFEA ARABICA* L.) FROM THREE DISTRICTS OF WEST JAVA, INDONESIA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *International Journal of Applied Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(6), 103-106 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.22159/ijap.2018v10i6.28551. ISSN 0975-7058. Dostupné z: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijap/article/view/28551>

- [52] Aşçı, Bürge, Şule DINÇ ZOR a Özlem AKSU DÖNMEZ. Development and Validation of HPLC Method for the Simultaneous Determination of Five Food Additives and Caffeine in Soft Drinks. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2016, **2016**, 1-8 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1155/2016/2879406. ISSN 1687-8760.  
Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2016/2879406/>
- [53] VDC type C. In: *Copley scientific* [online]. UK, b.r. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: [https://www.copleyscientific.com/images/ww/side/\\_resized/69-01-A\\_288\\_0\\_0\\_0\\_361\\_458.jpg](https://www.copleyscientific.com/images/ww/side/_resized/69-01-A_288_0_0_0_361_458.jpg)



## 6 PŘÍLOHY

**Příloha A** - Difuzní komora typu A s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 560  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha B** - Difuzní komora typu A s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha C** - Difuzní komora typu A s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , test proveden pracovníkem č. 2

**Příloha D** - Difuzní komora typu A, klema typu B, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha E** - Difuzní komora typu A, klema typu B, dávkovaný objem testovací látky 560  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha F** - Difuzní komora typu B s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha G** - Difuzní komora typu B s kožním preparátem typu B, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha H** - Difuzní komora typu B s kožním preparátem typu A, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha I** - Difuzní komora typu A s kožním preparátem typu A, dávkovaný objem testovací látky 25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$

**Příloha J** - Ukázka chromatogramu kofeinu o koncentraci 10 mg/l

**Příloha A** - Difuzní komora typu A s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 560 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ]v jednotlivých časových bodech [min.]												Flux [µg/cm <sup>2</sup> /min.]	Flux [µg/cm <sup>2</sup> /h]	Lag time (min.)	
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380				1440
1	0,0250	0,0373	0,0639	0,129	0,205	0,292	0,382	6,30	6,74	7,31	7,78	8,33	8,65	0,00899	0,539	485
2	0,0340	0,0411	0,0769	0,156	0,256	0,363	0,481	7,60	8,09	8,61	9,17	9,73	10,3	0,00976	0,586	386
3	0,0262	0,0324	0,060	0,133	0,217	0,314	0,425	7,01	7,48	7,97	8,37	8,66	8,95	0,00756	0,454	206
4	0,0442	0,0406	0,0768	0,149	0,236	0,333	0,431	7,03	7,41	7,69	7,85	8,08	8,33	0,00802	0,481	159
5	0,0275	0,0499	0,0796	0,162	0,252	0,358	0,472	7,51	7,98	8,50	9,04	9,58	10,1	0,00898	0,539	313
6	0,0305	0,0446	0,077	0,147	0,231	0,325	0,444	7,11	7,57	8,01	8,43	8,88	9,40	0,00780	0,468	232
7	0,0262	0,0448	0,073	0,134	0,217	0,311	0,409	7,21	7,71	8,26	8,74	9,29	9,87	0,00928	0,557	378
8	0,0251	0,0429	0,0699	0,126	0,196	0,284	0,371	6,90	7,42	8,02	8,56	9,15	9,77	0,01320	0,792	898
9	0,0332	0,0348	0,0686	0,136	0,212	0,311	0,406	6,90	7,14	7,42	7,65	7,94	8,13	0,00775	0,465	164
10	0,0111	0,0299	0,0746	0,148	0,260	0,391	0,550	1,68	1,94	2,20	2,43	2,59	2,73	0,00455	0,273	62,0
Průměr	0,0283	0,0398	0,0720	0,142	0,228	0,328	0,437	6,53	6,95	7,40	7,80	8,22	8,63	0,00859	0,515	328
Medián	0,0268	0,0409	0,0738	0,142	0,224	0,320	0,428	7,02	7,45	7,99	8,40	8,77	9,17	0,00850	0,510	273
Min	0,0111	0,0299	0,0600	0,126	0,196	0,284	0,371	1,68	1,94	2,20	2,43	2,59	2,73	0,00455	0,273	62,0
Max	0,0442	0,0499	0,0796	0,162	0,260	0,391	0,550	7,60	8,09	8,61	9,17	9,73	10,3	0,0132	0,792	898
Rozpětí	0,0331	0,0200	0,0196	0,0366	0,0643	0,107	0,180	5,92	6,15	6,41	6,74	7,14	7,57	0,00865	0,519	836
SD	0,00844	0,00620	0,00636	0,0122	0,0224	0,0336	0,0531	1,74	1,80	1,88	1,95	2,07	2,21	0,00217	0,130	237
RSD [%]	29,8	15,6	8,82	8,59	9,82	10,2	12,1	26,7	25,9	25,4	25,1	25,2	25,6	25,3	25,3	72,2

**Příloha B** - Difuzní komora typu A s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ] v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,0322	0,296	0,718	1,18	1,63	2,05	2,46	9,46	9,64	9,80	9,93	10,1	10,2	0,0137	0,822	34,0
2	0,0333	0,251	0,513	0,993	1,47	2,35	3,23	48,8	49,7	50,6	51,4	52,0	52,6	0,0604	3,62	153
3	0,0685	0,286	0,507	0,879	1,25	2,02	2,79	37,3	38,2	38,8	39,6	40,1	40,7	0,0450	2,70	139
4	0,0463	0,229	0,458	0,834	1,21	1,98	2,76	47,8	49,2	50,1	51,0	51,7	52,5	0,0638	3,83	166
5	0,0502	0,249	0,531	1,05	1,57	2,46	3,35	55,0	56,2	57,0	58,0	58,6	59,4	0,0767	4,60	161
6	0,0524	0,209	0,415	0,828	1,24	1,93	2,61	46,8	48,0	48,6	49,7	50,5	51,0	0,0607	3,64	168
7	0,0357	0,209	0,644	1,97	3,30	5,72	8,14	29,6	31,7	33,2	34,7	35,7	36,3	0,0310	1,86	116
8	0,0620	0,266	0,562	1,02	1,48	2,15	2,82	40,8	42,3	43,0	43,9	44,6	45,3	0,0521	3,13	146
9	0,0513	0,244	0,479	0,901	1,32	1,93	2,54	45,4	46,9	47,7	48,7	49,5	50,2	0,0566	3,40	167
10	0,0623	0,268	0,616	1,76	2,90	5,15	7,40	68,9	70,1	70,6	71,1	71,4	71,3	0,108	6,48	121
Průměr	0,0494	0,251	0,544	1,14	1,74	2,77	3,81	43,0	44,2	44,9	45,8	46,4	47,0	0,0568	3,41	137
Medián	0,0507	0,250	0,522	1,01	1,48	2,10	2,80	46,07	47,4	48,1	49,2	50,0	50,6	0,0585	3,51	150
Min	0,0322	0,209	0,415	0,828	1,21	1,93	2,46	9,46	9,64	9,80	9,93	10,1	10,2	0,0137	0,822	34,0
Max	0,0685	0,296	0,718	1,97	3,30	5,72	8,14	68,9	70,1	70,6	71,1	71,4	71,3	0,108	6,48	168
Rozpětí	0,0364	0,0867	0,304	1,15	2,09	3,80	5,68	59,4	60,5	60,8	61,2	61,3	61,1	0,0943	5,66	134
SD	0,0127	0,0293	0,0923	0,400	0,739	1,42	2,11	15,8	15,9	16,0	16,1	16,1	16,1	0,0253	1,52	40,7
RSD [%]	25,8	11,7	17,0	35,0	42,5	51,2	55,4	36,6	36,0	35,5	35,1	34,7	34,4	44,6	44,6	29,7

**Příloha C** - Difuzní komora typu A s membránou Strat-M, pracovník č. 2, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ]v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,163	1,09	2,19	2,68	4,00	5,11	6,79	23,3	26,1	27,7	28,6	29,4	30,0	0,0420	2,52	0,00
2	0,147	0,587	0,660	0,732	1,33	1,59	1,91	7,26	7,62	7,99	8,31	8,59	8,75	0,0175	1,05	0,00
3	0,150	0,692	1,27	1,76	3,19	4,29	5,35	18,2	19,3	20,5	21,3	21,9	22,4	0,0193	1,16	42,7
4	0,0972	0,347	0,412	0,493	1,00	3,38	4,63	13,3	14,9	15,7	16,2	16,6	17,0	0,0152	0,912	91,2
5	0,236	0,889	1,01	1,19	2,32	3,16	3,76	11,6	13,2	14,1	14,5	14,9	15,3	0,0241	1,45	38,7
6	0,0546	0,209	0,238	0,244	0,230	0,223	0,857	3,39	5,20	5,66	5,98	6,32	6,71	0,0152	0,912	0,00
7	0,116	0,609	0,867	1,18	2,13	3,05	3,85	12,8	13,8	14,3	14,8	15,2	15,5	0,0232	1,39	57,9
8	0,134	0,598	1,33	2,33	2,86	3,29	3,59	4,52	5,12	5,28	5,31	5,40	5,43	0,0267	1,60	0,00
9	0,128	0,595	0,846	0,989	1,47	2,71	3,19	13,7	15,3	16,4	17,0	17,5	18,1	0,0156	0,936	28,3
10	0,132	0,764	1,11	1,54	2,22	2,87	3,44	11,9	13,3	14,1	14,6	15,1	15,5	0,0258	1,55	10,3
Průměr	0,136	0,638	0,993	1,31	2,07	2,97	3,74	12,0	13,4	14,2	14,7	15,1	15,5	0,0225	1,35	26,9
Medián	0,133	0,604	0,938	1,18	2,18	3,10	3,67	12,4	13,6	14,2	14,7	15,1	15,5	0,0213	1,28	19,3
Min	0,0546	0,209	0,238	0,244	0,230	0,223	0,857	3,39	5,12	5,28	5,31	5,40	5,43	0,0152	0,912	0,00
Max	0,236	1,09	2,19	2,68	4,00	5,11	6,79	23,3	26,1	27,7	28,6	29,4	30,0	0,042	2,52	91,2
Rozpětí	0,182	0,879	1,95	2,44	3,77	4,89	5,93	19,9	21,0	22,4	23,3	24,0	24,6	0,0268	1,61	91,2
SD	0,047	0,249	0,547	0,778	1,11	1,34	1,66	6,01	6,44	6,83	7,05	7,23	7,39	0,00818	0,491	31,0
RSD [%]	34,5	39,1	55,1	59,2	53,6	45,2	44,4	50,1	48,0	48,2	48,1	48,0	47,8	36,4	36,4	115

**Příloha D** – Difuzní komora typu A, klema typu B, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ]v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,110	0,560	1,12	2,52	4,35	6,51	8,70	27,0	28,0	28,1	28,5	28,8	28,9	0,06830	4,10	52,9
2	0,0190	0,325	0,638	1,30	2,15	3,17	4,22	4,22	18,0	18,5	18,8	19,1	19,5	0,02200	1,32	33,2
3	0,0658	0,447	0,913	1,77	2,45	3,12	3,65	12,4	13,4	13,7	14,0	14,2	14,4	0,02170	1,30	11,5
4	0,0497	0,386	0,689	1,43	2,34	3,39	3,98	14,1	15,2	15,5	15,8	16,1	16,4	0,02460	1,48	24,3
5	0,0221	0,362	0,705	1,56	2,55	3,99	5,43	46,6	50,6	51,5	52,5	53,4	54,0	0,06340	3,80	103
Průměr	0,0533	0,416	0,814	1,72	2,77	4,04	5,20	20,9	25,0	25,5	25,9	26,3	26,7	0,0400	2,40	45,0
Medián	0,0497	0,386	0,705	1,56	2,45	3,39	4,22	14,1	18,0	18,5	18,8	19,1	19,5	0,0246	1,48	33,2
Min	0,0190	0,325	0,638	1,30	2,15	3,12	3,65	4,22	13,4	13,7	14,0	14,2	14,4	0,0217	1,30	11,5
Max	0,1100	0,560	1,12	2,52	4,35	6,51	8,70	46,6	50,6	51,5	52,5	53,4	54,0	0,0683	4,10	103
Rozpětí	0,0910	0,236	0,484	1,22	2,20	3,39	5,04	42,4	37,2	37,8	38,5	39,2	39,7	0,0466	2,80	91,5
SD	0,0372	0,0921	0,202	0,482	0,896	1,43	2,07	16,5	15,4	15,6	15,9	16,1	16,3	0,0237	1,42	35,8
RSD [%]	69,8	22,1	24,8	28,1	32,4	35,3	39,8	79,3	61,4	61,1	61,2	61,3	61,1	59,2	59,2	79,5

**Příloha E** - Difuzní komora typu A, klema typu B, dávkovaný objem testovací látky 560 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ]v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux [µg/cm <sup>2</sup> /min.]	Flux [µg/cm <sup>2</sup> /h]	Lag time (min.)
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440			
1	0,0260	0,0303	0,105	0,166	0,236	0,326	0,433	3,49	4,77	5,36	5,90	6,31	6,81	0,0037	0,219	69,7
2	0,0270	0,0314	0,114	0,123	0,189	0,274	0,360	3,36	4,96	5,48	6,07	6,57	7,05	0,0092	0,550	84,2
3	0,0364	0,0424	0,0608	0,152	0,206	0,292	0,428	1,97	5,50	6,46	7,45	8,29	9,26	0,0051	0,305	42,8
4	0,0243	0,0282	0,0660	0,136	0,266	0,407	0,567	2,94	3,85	4,56	5,22	5,78	6,29	0,0040	0,238	75,4
5	0,0287	0,0333	0,0816	0,141	0,193	0,314	0,391	3,15	5,11	5,88	6,49	7,01	7,46	0,0023	0,140	65,2
Průměr	0,0285	0,0331	0,0855	0,143	0,218	0,323	0,436	2,98	4,84	5,55	6,23	6,79	7,37	0,00484	0,291	67,5
Medián	0,0270	0,0314	0,0816	0,141	0,206	0,314	0,428	3,15	4,96	5,48	6,07	6,57	7,05	0,00397	0,238	69,7
Min	0,0243	0,0282	0,0608	0,123	0,189	0,274	0,360	1,975	3,85	4,56	5,22	5,78	6,29	0,00234	0,140	42,8
Max	0,0364	0,0424	0,114	0,166	0,266	0,407	0,567	3,49	5,50	6,46	7,45	8,29	9,26	0,00917	0,550	84,2
Rozpětí	0,0122	0,0142	0,0533	0,043	0,0767	0,132	0,207	1,51	1,65	1,90	2,22	2,52	2,97	0,00683	0,410	41,4
SD	0,00472	0,00549	0,0235	0,0164	0,0324	0,0510	0,0790	0,601	0,614	0,700	0,822	0,951	1,13	0,00261	0,157	15,5
RSD [%]	16,6	16,6	27,4	11,4	14,9	15,8	18,1	20,2	12,7	12,6	13,2	14,0	15,4	53,9	53,9	23,0

**Příloha F** - Difuzní komora typu B s membránou Strat-M, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ] v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,0751	0,618	0,898	1,12	---	---	---	---	---	---	---	---	3,43	---	---	---
2	0,0298	0,661	1,37	2,05	2,43	5,64	7,69	21,3	21,4	28,0	28,1	30,6	21,1	0,0651	3,91	68,5
3	0,0751	0,967	2,63	4,67	5,76	8,84	11,10	32,9	36,9	37,5	38,3	39,6	40,7	0,0589	3,53	97,5
4	0,0871	0,744	3,37	5,03	6,65	9,59	12,10	24,7	27,7	31,5	33,1	33,8	36,9	0,0776	4,66	27,2
5	0,0848	0,551	1,52	2,99	4,09	5,94	---	---	---	---	---	---	6,57	---	---	---
6	0,180	14,6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	28,5	---	---	---
7	0,139	0,925	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,96	---	---	---
8	0,220	16,2	23,5	25,40	28,00	29,90	32,70	40,1	45,0	46,5	47,4	47,9	49,0	0,415	24,9	0,00
9	0,192	1,54	3,43	5,89	8,59	11,3	13,4	34,6	37,0	38,1	36,9	38,4	38,7	0,0837	5,02	18,7
10	0,283	1,29	2,07	2,94	3,22	5,75	7,01	9,4	15,6	17,3	17,8	18,1	18,2	0,0393	2,36	12,0
Průměr	0,137	3,81	4,85	6,26	8,39	11,0	14,0	27,2	30,6	33,2	33,6	34,7	24,5	0,123	7,40	37,3
Medián	0,113	0,946	2,35	3,83	5,76	8,84	11,6	28,8	32,3	34,5	35,0	36,1	24,8	0,0714	4,28	23,0
Min	0,0298	0,551	0,898	1,12	2,43	5,64	7,01	9,39	15,6	17,3	17,8	18,1	1,96	0,0393	2,36	0,00
Max	0,283	16,2	23,50	25,4	28,0	29,9	32,7	40,1	45,0	46,5	47,4	47,9	49,0	0,415	24,9	97,5
Rozpětí	0,253	15,6	22,6	24,3	25,6	24,3	25,7	30,7	29,4	29,2	29,6	29,8	47,0	0,376	22,5	97,5
SD	0,0799	6,13	7,59	7,90	8,90	8,62	9,49	11,1	11,0	10,0	10,0	10,1	16,9	0,144	8,63	37,6
RSD [%]	58,5	161	157	126	106	78,4	67,8	40,8	36,0	30,2	29,9	28,9	68,8	117	117	101

**Příloha G** - Difuzní komora typu B s kožním preparátem typu B, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ] v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,0643	0,173	0,540	1,47	2,73	3,79	4,71	9,46	10,4	11,1	11,6	11,5	11,4	0,0377	2,26	52,3
2	0,0588	0,0973	0,350	1,19	2,23	3,13	4,46	7,61	7,29	7,18	8,75	8,99	8,90	0,0376	2,26	61,9
3	0,0751	0,165	0,574	1,65	3,19	4,56	5,48	10,1	9,00	10,8	11,3	9,85	11,6	0,0458	2,75	52,7
4	0,0970	0,150	0,373	1,07	2,02	2,99	3,82	9,12	7,87	7,77	9,13	9,33	10,6	0,0319	1,91	58,1
5	0,114	0,171	0,410	1,35	2,75	4,07	5,31	10,8	8,72	10,5	12,0	13,1	13,6	0,0460	2,76	62,0
6	0,107	0,134	0,249	0,675	1,22	1,74	2,45	5,98	6,91	7,43	7,42	7,17	7,65	0,0178	1,07	51,9
7	0,109	0,216	0,555	1,42	2,51	3,50	4,33	9,75	9,97	11,5	12,0	12,0	12,4	0,0321	1,93	44,8
8	0,169	0,431	0,800	2,19	5,20	7,27	8,65	12,4	15,1	15,1	15,4	16,4	15,9	0,0758	4,55	57,3
9	0,0357	0,0913	0,470	1,80	3,70	5,66	7,32	13,7	15,7	15,8	16,7	17,0	17,0	0,0656	3,94	65,3
10	0,0372	0,172	0,759	2,51	4,48	6,77	7,73	12,4	13,5	13,8	10,8	12,8	14,4	0,0669	4,01	53,2
Průměr	0,0866	0,180	0,508	1,53	3,00	4,35	5,43	10,1	10,4	11,09	11,50	11,83	12,34	0,0457	2,74	56,0
Medián	0,0861	0,168	0,505	1,45	2,74	3,93	5,01	9,93	9,49	10,93	11,47	11,76	11,99	0,0418	2,51	55,3
Min	0,0357	0,0913	0,249	0,675	1,22	1,74	2,45	5,98	6,91	7,18	7,42	7,17	7,65	0,0178	1,07	44,8
Max	0,169	0,431	0,800	2,51	5,20	7,27	8,65	13,67	15,7	15,8	16,7	17,0	16,97	0,0758	4,55	65,3
Rozpětí	0,133	0,340	0,551	1,83	3,98	5,53	6,20	7,68	8,77	8,59	9,24	9,85	9,33	0,0580	3,48	20,5
SD	0,0407	0,0956	0,176	0,536	1,19	1,75	1,93	2,32	3,20	3,08	2,84	3,17	2,95	0,0184	1,10	6,13
RSD [%]	47,0	53,1	34,6	35,0	39,5	40,2	35,5	22,9	30,7	27,8	24,7	26,8	23,9	40,2	40,2	11,0



**Příloha H** - Difuzní komora typu B s kožním preparátem typu A, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ] v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,00	0,00	0,00	0,100	0,211	0,331	0,562	20,0	21,1	21,3	21,5	23,2	24,2	0,0240	1,44	245
2	0,0465	0,0807	0,168	0,209	0,339	0,589	0,876	36,5	38,5	38,1	39,1	39,6	39,7	0,0548	3,29	230
3	0,00764	0,0583	0,0816	0,123	0,189	0,343	0,556	24,6	26,8	27,9	28,8	29,5	29,6	0,0321	1,93	276
4	0,133	0,187	0,239	0,357	0,442	0,595	1,32	27,9	29,5	30,6	32,6	34,0	34,3	0,0319	1,91	226
5	0,104	0,154	0,214	0,340	0,421	0,569	1,06	11,6	20,0	21,2	23,3	23,5	24,5	0,0211	1,27	231
6	0,150	0,200	0,236	0,334	0,414	0,562	1,21	25,1	27,4	29,8	30,5	31,7	31,9	0,0297	1,78	240
7	0,0360	0,0507	0,0647	0,0965	0,156	0,279	0,622	20,2	22,1	23,1	23,4	23,9	24,4	0,0261	1,57	256
8	0,0553	0,0780	0,0993	0,158	0,240	0,491	0,887	40,6	43,1	43,8	44,8	45,2	45,8	0,0574	3,44	252
9	0,0400	0,0702	0,0838	0,107	0,174	0,381	0,615	27,0	29,0	29,8	30,3	30,6	31,3	0,0368	2,21	255
10	0,0471	0,0705	0,0924	0,0986	0,135	0,209	0,404	23,2	25,4	26,7	28,2	29,9	31,4	0,0302	1,81	363
Průměr	0,0620	0,0949	0,128	0,192	0,272	0,435	0,811	25,7	28,3	29,2	30,3	31,1	31,7	0,0344	2,06	257
Medián	0,0468	0,0743	0,0959	0,141	0,226	0,436	0,749	24,9	27,1	28,9	29,6	30,3	31,4	0,0311	1,86	249
Min	0,00	0,00	0,00	0,097	0,135	0,209	0,404	11,6	20,0	21,2	21,5	23,2	24,2	0,0211	1,27	226
Max	0,150	0,200	0,239	0,357	0,442	0,595	1,32	40,6	43,1	43,8	44,8	45,2	45,8	0,0574	3,44	363
Rozpětí	0,150	0,200	0,239	0,261	0,307	0,386	0,916	29,0	23,1	22,6	23,3	22,0	21,6	0,0363	2,18	137
SD	0,0506	0,0641	0,0814	0,110	0,120	0,143	0,309	8,26	7,42	7,20	7,25	7,12	6,96	0,0123	0,737	40,0
RSD [%]	81,6	67,5	63,6	57,2	44,0	32,9	38,0	32,2	26,2	24,6	24,0	22,9	21,9	35,7	35,7	15,6

**Příloha I** - Difuzní komora typu A s kožním preparátem typu A, dávkovaný objem testovací látky 25 µl/cm<sup>2</sup>

Komora č.	Kumulativní množství vztažené na plochu [µg/cm <sup>2</sup> ] v jednotlivých časových bodech [min.]													Flux	Flux	Lag time
	20	40	60	90	120	150	180	1140	1200	1260	1320	1380	1440	[µg/cm <sup>2</sup> /min.]	[µg/cm <sup>2</sup> /h]	(min.)
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0497	0,205	0,462	11,0	12,1	12,4	12,8	13,0	13,3	0,0138	0,828	237
2	0,0143	0,0392	0,0788	0,123	0,291	0,571	1,04	9,56	10,5	10,7	11,0	10,9	11,4	0,0114	0,684	126
3	0,0075	0,0159	0,0253	0,0575	0,0799	0,102	0,228	10,4	11,2	11,6	12,0	12,3	12,7	0,0134	0,804	280
4	0,00	0,0131	0,0223	0,0445	0,0545	0,0645	0,156	3,62	3,99	4,11	4,37	4,45	4,63	0,00427	0,256	250
5	0,00	0,00	0,0174	0,0412	0,0598	0,0680	0,102	5,59	6,18	6,40	6,59	6,74	6,90	0,00735	0,441	293
6	0,00	0,00621	0,00960	0,0150	0,0163	0,0747	0,263	5,71	6,25	6,42	6,89	6,93	7,25	0,00687	0,412	260
7	0,00	0,000	0,00	0,00621	0,00836	0,0501	0,201	7,91	8,95	9,27	9,56	9,91	10,2	0,0105	0,630	326
8	0,00	0,00	0,0132	0,0540	0,180	0,358	0,609	7,75	8,33	8,54	8,44	8,88	9,06	0,00936	0,562	156
9	0,00	0,00	0,00621	0,118	0,286	0,566	1,040	9,55	10,5	10,7	11,0	10,9	11,4	0,0114	0,684	128
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0106	0,0452	2,80	3,00	3,29	3,55	3,70	3,94	0,00406	0,244	454
Průměr	0,00218	0,00744	0,0173	0,0459	0,103	0,207	0,415	7,39	8,10	8,34	8,62	8,77	9,08	0,00924	0,554	251
Medián	0,00	0,00	0,0114	0,0429	0,0572	0,0884	0,246	7,83	8,64	8,91	9,00	9,40	9,63	0,00993	0,596	255
Min	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0106	0,045	2,80	3,00	3,29	3,55	3,70	3,94	0,00406	0,244	126
Max	0,0143	0,0392	0,0788	0,123	0,291	0,571	1,04	11,0	12,1	12,4	12,8	13,0	13,3	0,0138	0,828	454
Rozpětí	0,0143	0,0392	0,0788	0,123	0,291	0,560	0,995	8,20	9,10	9,11	9,25	9,30	9,36	0,00974	0,584	328
SD	0,00486	0,0127	0,0235	0,0449	0,110	0,215	0,369	2,85	3,13	3,16	3,20	3,21	3,29	0,00349	0,210	100
RSD [%]	223	170	136	97,6	108	104	89,0	38,6	38,6	37,9	37,1	36,6	36,2	37,8	37,8	39,7

**Příloha J** - Ukázka chromatogramu kofeinu o koncentraci 10 mg/l

