

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

studijní obor: farmacie



**Transkarbam 12 a transdermální průnik
kofeinu z oleokrémů. 1.**

**Transkarbam 12 and caffeine transdermal
permeation from oleocrems. 1.**

Diplomová práce

Autor: Jana Štiková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavel Berka

Hradec Králové, květen 2009

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Jana Štiková

Děkuji Mgr. Pavlovi Berkovi za cenné rady a odborné vedení při vypracování mé diplomové práce.

Poděkování za podporu během studia patří rodičům a všem mým blízkým, především Pavle a Petrovi.

ABSTRAKT

V teoretické části práce byl zpracován přehled problematiky transdermální aplikace léčiv a s ní související problematiky propustnosti kožní bariéry. Následně byly stručně shrnuty dosavadní poznatky o akcelerantech transdermální permeace, zejména pak transkarbamech a jejich vývoji na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy.

Na tuto část navazují výsledky permeačních pokusů prováděných na prasečí kůži *in vitro*. V nich byla hodnocena akcelerační aktivita různých koncentrací Transkarbamu 12 (T12) na permeaci kofeinu z oleokrémů s obsahem 60% vodné fáze.

Pro krémy s 0%; 0,3%; 0,5%; 0,7% a 1% T12 byly zjištěny následující hodnoty průměrných fluxů kofeinu **J_r**: $7,88 \pm 1,52 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; $9,34 \pm 1,62 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; $10,89 \pm 2,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; $11,29 \pm 3,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ a $11,09 \pm 2,21 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

Klíčová slova: transdermální aplikace léčiv, kožní bariéra, akceleranty transdermální permeace, Transkarbam 12.

The transdermal application of active substances and the related topic - skin barrier permeability were reviewed in theoretical part of this work. Present knowledge in transdermal permeation enhancers was then summarized shortly, with emphasis on Transkarbams and their development on the Faculty of Pharmacy of the Charles University.

The results of the *in vitro* permeation experiments through full thickness pig ear skin are presented in the following experimental part. The acceleration effect of various concentrations of Transkarbam 12 (T12) on caffeine permeation from oleocrems containing 60% aqueous phase is evaluated.

The following values of mean fluxes of caffeine **J_r** were found $7,88 \pm 1,52 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; $9,34 \pm 1,62 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; $10,89 \pm 2,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; $11,29 \pm 3,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ and $11,09 \pm 2,21 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ for creams containing from creams containing 0%; 0,3%; 0,5%; 0,7% and 1% T12, respectively.

Keywords: transdermal administration of active substances, skin barrier, transdermal permeation enhancers, Transkarbam 12.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 CÍL PRÁCE	8
3 TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 Transdermální aplikace léčiv	9
3.2 Anatomie a fyziologie kůže	9
3.2.1 Epidermis – pokožka	10
3.2.1.1 Kožní bariéra.....	13
3.2.2 Dermis (corium) – škára	15
3.2.3 Tela subcutanea – podkožní vazivo	15
3.3 Možné cesty průniku xenobiotik do organismu.....	16
3.4 Ovlivnění propustnosti kožní bariéry	16
3.5 Akceleranty transdermální permeace	17
3.5.1 Požadavky na akceleranty transdermální permeace	17
3.5.2 Mechanismus účinku akcelarantů transdermální permeace.....	18
3.5.3 Přehled akcelarantů transdermální permeace	18
3.6 Vývoj akcelarantů transdermální permeace na Faf UK v HK ...	20
3.6.1 Transkarbamy.....	23
3.6.2 Pseudoceramidy	24
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 Suroviny a materiál	25
4.2 Přístroje	26

4.3 Biologický materiál.....	26
4.4 Složení a příprava krémů.....	27
4.5 Permeační pokusy	29
4.6 Podmínky HPLC stanovení kofeinu	29
4.7 Příprava kalibračních roztoků	29
4.8 Výsledky měření.....	30
5 DOKUMENTACE	31
6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	87
7 ZÁVĚRY	95
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	96
9 ZDROJE	97

1 ÚVOD

Transdermální aplikace léčiv má řadu výhod, ale zároveň naráží na různé těžkosti. Jako příklad výhody oproti perorálnímu podání lze uvést to, že nedochází k částečné metabolizaci léčiva v játrech (po jeho vstřebání z gastrointestinálního traktu), dále je zamezeno jeho interakci s potravinami a jinými léčivy, existuje možnost rychlého ukončení působení látky... Oproti aplikaci parenterální je zase aplikace transdermální snazší, nejsou k ní nutné další pomůcky a nemusí být prováděna zdravotnickým pracovníkem. Mezi nevýhody patří hlavně fakt, že značné množství léčiv není schopné přes kůži v dostatečné míře proniknout. Kůže totiž pomáhá chránit organismus vůči chemickým a mechanickým vlivům, přičemž za bariérovou funkci kůže je zodpovědná především nejsvrchnější vrstva pokožky – stratum corneum.

Propustnost kožní bariery je však možné fyzikálně nebo chemicky ovlivnit. Mezi druhý jmenovaný způsob patří významná skupina farmaceutických pomocných látek – akceleračních transdermální permeace (penetrace), jejichž hlavním mechanismem účinku je interakce s lipidy intercelulárního prostoru stratum corneum.

Problematika akceleračních transdermální permeace se řeší na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové přibližně 20 let. Konkrétně se jí zabývá tým okolo doc. PharmDr. Alexandra Hrabálka, CSc. a doc. RNDr. Pavla Doležala, CSc., přičemž tento tým je jediný v České republice, který má k dispozici původní sloučeniny. Podle dosavadních výsledků výzkum v této oblasti se ukazuje jako nadějná látka, která nese označení TRANSKARBAM 12 (T12).

Předkládaná diplomová práce se zabývá hodnocením akceleračního účinku T12, přičemž krémy sloužící k tomuto účelu, jsou prakticky použitelné, nikoliv modelové. Permeační pokusy byly prováděny na kožních štěpech samic *Sus scrofa f. domestica*. Jako marker byl použit kofein, který jako látka střední polaritě dobře prochází kůží, nemá tendenci se v ní kumulovat, je dostatečně stabilní a dobře se stanovuje.

2 CÍL PRÁCE

1. Získat experimentální podklady z permeačních pokusů.
2. Na základě experimentálních podkladů ověřit koncentrační závislost permeačního účinku transkarbamu 12 v oleokrému s obsahem 60 % vody.
3. Porovnat výsledky s výsledky k nimž došla ve své diplomové práci (vedené taktéž Mgr. Pavlem Berkou) Pavla Dvořáková, která se zabývala stejnou problematikou, pouze s tím rozdílem, že při práci používala oleokrémem obsahující 30 % vody (koncentrace T12 byly totožné).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Transdermální aplikace léčiv

V případě léků aplikovaných na kůži musíme důsledně rozlišovat léky *dermální* s léčivými účinky působícími na kůži a v kůži a léky *transdermální*, které mají vyvolat systémový účinek poté co překonají kožní bariéru a proniknou do podkoží ke krevním kapilám. Transdermální léky se cíleně sestavují tak, aby se léčiva po překonání kůže dostala do krevního oběhu v celém žádaném množství. Na druhé straně průnik dermálního léku do krve je nežádoucí.¹

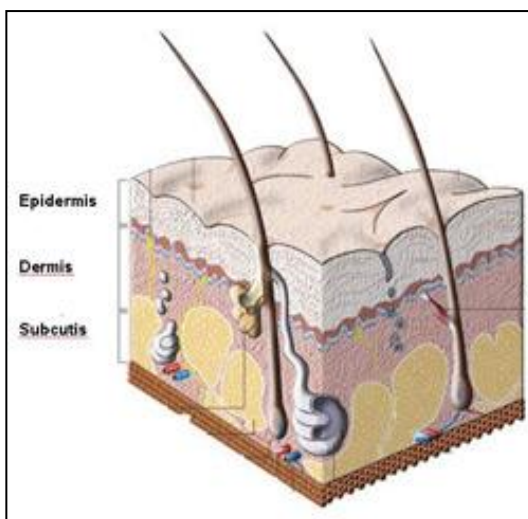
Transdermální podání léčiv má řadu výhod, mezi něž patří např. zamezení first-pass efektu při metabolizaci léčiva v játrech a gastrointestinálním traktu, omezení jeho vedlejších účinků, snížení kolísání terapeutických hladin léčiva v krvi, možnost rychlého ukončení podání léčiva a v neposlední řadě zvýšení compliance pacienta. Jen velmi malé množství léčiv je však schopné pronikat kůží v dostatečné míře tak, aby léčivo dosáhlo systémově aktivních hladin.²

3.2 Anatomie a fyziologie kůže

Kůže, cutis (řec. derma) tvoří ochranný kryt těla. Ohraničuje tělo od vnějšího prostředí a chrání vnitřní orgány těla před mechanickým, fyzikálním a chemickým poškozením. Ochrannou funkci umožňuje mnohvrstevná struktura kůže, tvořená bílkovinnými, tukovým a vodnými složkami. Jejich vhodnou kombinací dermální tkáň získává pevnost. Kůže odolává tlaku až 0,176 MPa. Při tloušťce 1–4 milimetry a ploše od 1,5 do 2 m² má kůže hmotnost od 3,6 do 6 kg. Vlastní epidermis má hmotnost asi 0,45 kg. Nízká tepelná vodivost kůže umožňuje tělu přizpůsobit se i extrémním změnám teploty. Kůže svou kyselou reakcí kolem pH 5,5 tvoří bariéru proti mikroorganismům a brání jejich růstu. Výjimku však tvoří její trhliny, ústí potních žláz a vlasových folikulů. Kůže je prostupná pro vzdušný kyslík a oxid uhličitý. Účastní se tak dýchání. Prostřednictvím periferních cév a potních žláz se podílí na regulaci tepla organismu.

Kůže (obr.1) se skládá ze tří vrstev: nej povrchnější je epidermis – pokožka, představující vlastní parenchym kožní, pod ní je corium – škára, která je podpůrnou intersticiální tkání, a nejhloběji je tela subcutanea – podkožní vazivo.¹

Hranice mezi škárou a pokožkou jsou nerovné, neboť škára vybíhá vůči pokožce četnými hrbolky (papillae), do nichž se zanořují hmatová tělíska i cévní klíčky.³



Obr. 1: Stavba kůže⁴

3.2.1 Epidermis – pokožka

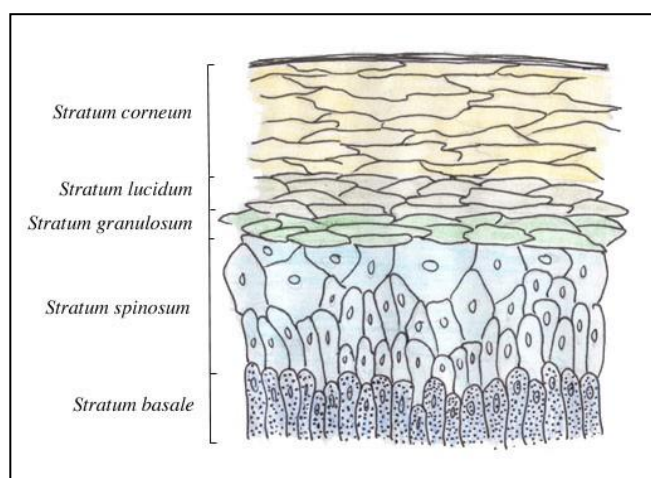
Je povrchová vrstva kůže, co do stavby ji tvoří epitel vrstevnatý dlaždicový, v povrchových vrstvách zrohovatělý.

Mimo základní buňky – keratinocyty (v různém stadiu jejich vývoje) obsahuje i jiné (tzv. symbiotické) buňky: melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.

Buňky epidermis vytvářejí vrstvy (obr. 2). **Stratum germinativum** je vrstva zárodečná, rozlišují se v ní další dvě vrstvy: **stratum basale** (cylindricum) – jedna vrstva vyšších cylindrických (kubických) buněk při bazální membráně, v níž jedine probíhá buněčné dělení a vznik nových buněk; **stratum spinosum** – navazuje na stratum basale, buňky se v něm ve 2-5 vrstvách směrem k povrchu oplošťují. Dalšími vrstvami epidermis směrem k povrchu jsou **stratum granulosum** obsahující 1–3 vrstvy buněk, kde se v buňkách začínají vytvářet zrna keratohyalinu (což je prekurzor keratinu, uložený ve formě submikroskopických granul mezi tonofilamenty keratinocytů). Buňky postupují k povrchu, diferencují se a pak podléhají buněčné smrti, po ztrátě jádra se mění ve **stratum lucidum**, což je tenká vrstva nápadnější v tlustší epidermis na dlani nebo na chodidle. Buňky této vrstvy obsahují eleidin (což je další prekurzor keratinu obalující tonofilamenta). Stratum lucidum přechází přesnou hranicí ve **stratum corneum**, tato vrstva je složena z plně zrohovatělých buněk, jsou to *bezjaderné*

keratinocyty (někdy označované jako rohové buňky – *korneocyty*), v kůži jsou pevně sestaveny v 15–25 vrstvách (na chodidle až ve 100 vrstvách) a jsou to vlastně odumřelé buňky.⁵ Buňky uložené nejhlouběji přiléhají na sebe velmi těsně a tvoří kompaktní vrstvu (*stratum corneum conjunctum*), zatímco buňky na povrchu jsou uloženy volně a lehce se od sebe odlupují (*stratum corneum disjunctum*).¹

Bazální vrstva epidermis má stálou populaci germinálních buněk. Nové keratinocyty potřebují asi 14 dnů, aby se vyvinuly do buněk *stratum granulosum* a dalších 14 dní, aby se dostaly k povrchu *stratum corneum* a odlouply se.⁶

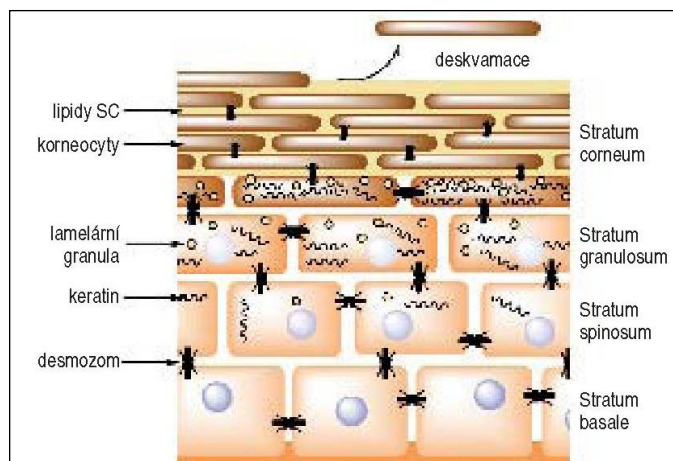


Obr. 2: Vrstvy epidermis⁷

Keratin, jímž jsou buňky ve *stratum corneum* vyplněny, je *vláknitá bílkovina*, specifický produkt keratinocytů. (V konečné fázi keratinizace jsou degradovány buněčné organely a keratinová vlákna se spojují do svazků, která zcela vyplní vnitřek korneocytu.)

Keratinocyty jsou buňky, jež mimo typická buněčná organela mají nápadný cytoskelet, který tvoří keratinová tonofilamenta, jež jsou prekuzory vlastního keratinu. Táhnou se ve svazcích buňkou a jsou upnutá do desmosomů buněčné membrány. Desmosomy, které představují místa pevného spojení se sousedními buňkami, jsou průběžně odbourávány a nově vytvářeny (jinak by se buňky v epidermis nemohly posunovat a postupovat směrem k povrchu). V povrchnější vrstvě *stratum spinosum* se vytvářejí oválná lamelární granula (Odlandova tělíčka) – jsou vyplněna stohy lipidických disků. V pozdní fázi diferenciaci keratinocytu (na rozhraní *stratum granulosum* a *stratum corneum*) tělíčka migrují k vnější části buňky, kde se jejich

membrána spojí s plazmatickou membránou a lipidy jsou uvolněny do mezibuněčného prostoru. Zde dojde k metabolizaci prekurzorů lipidů pomocí současně uvolněných enzymů, jednotlivé disky fúzí a vytváří soubor lipidových lamel, zcela vyplňující mezibuněčné prostory – lipidovou matrix (obr. 3).^{5,8}



Obr. 3: Stavba pokožky⁸

Melanocyty jsou kulaté buňky s nepravidelnými, velmi dlouhými výběžky, kterými pronikají mezi buňky stratum basale a stratum spinosum. Jejich konce zasahují do invaginací na povrchu keratinocytů. Melanocyty jsou připojeny k bazální lamině systémem hemidesmosomů. Mezi melanocyty a sousedními keratinocyty nejsou desmosomy vyvinuty. Funkcí melanocytů je syntéza melaninu, pigmentu vznikajícího z tyrosinu oxidovaného tyrosin oxidasou na dihydroxyfenylalanin (DOPA) a metabolizovaného dále až na melanin. Ten se dostává do granul, kde prodělavá několik vývojových stádií. Konečným stadiem je vznik melanosomu. Zralé melanosomy jsou předávány cytoplasmatickými výběžky keratinocytům ve stratum basale a stratum spinosum (cytokrinní sekrece). V cytoplasmě keratinocytů se melaninová granula usadí v oblasti nad jádrem, chrání jej tak (při dělení buňky) před škodlivým účinkem UV záření (290–320 nm). Buňky, do nichž byl melanin umístěn, se nazývají melanofory.⁶

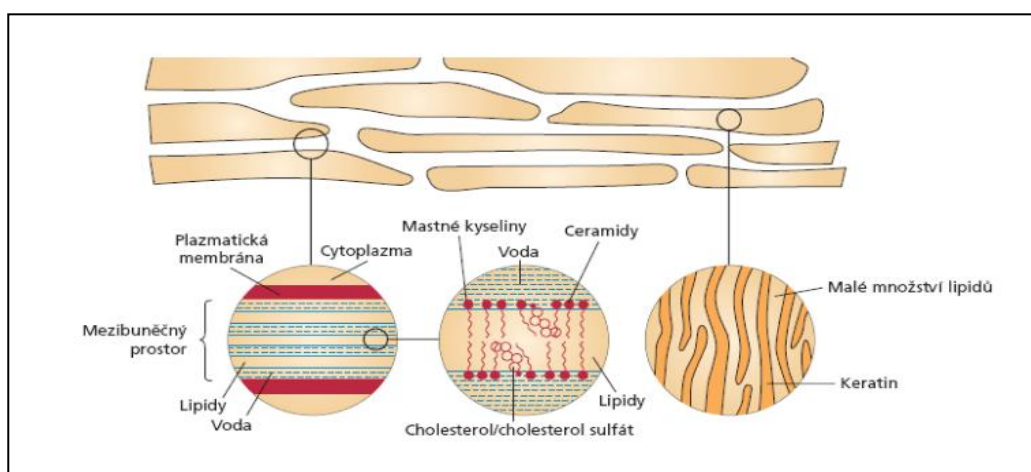
Langerhansovy dendritické buňky jsou ve stratum spinosum, patří do monocyto-makrofágového systému. Podílí se na prezentaci antigenu T lymfocytům a jsou to konečná diferenciacní stadia vývoje monocytů. Na svém povrchu nesou molekuly HLA I. a II. třídy a molekulu CD1.^{6,9}

Merkelovy buňky se vyskytují v kůži tlustého typu (planta pedis nebo manus). Tvarově se blíží keratinocytům. Jde pravděpodobně o mechanoreceptory, i když jiní autoři se domnívají, že patří do skupiny buněk neuroendokrinních.⁶

K pokožce patří i útvary, které z ní vznikají – deriváty epidermis – **chlupy, nehty a kožní žlázy**. Chlupy, jsou keratinové útvary, které vyrůstají cyklicky a nepravidelně z vchlípenin epidermis, označovaných jako vlasové folikuly. Kožní žlázy se dělí na dvě hlavní skupiny – mazové žlázy a potní žlázy.⁵

3.2.1.1 Kožní bariéra

Kožní bariéra (obr. 4) se nachází v dolní části stratum corneum. Jedná se o bikompartmentový systém, tvořený korneocyty a extracelulární lipidovou matrix. Elias přirovnal podobu stratum corneum k cihlové zdi, kdy *korneocyty* jsou jako cihly a *lipidové lamely* působí jako cement nebo malta. Strukturální integrita stratum corneum je udržována přítomností modifikovaných desmosomů, takzvaných korneodesmosomů. Korneodesmosomy udržují korneocyty pospolu a poskytují stratum corneum pevnost a schopnost odolávat posuvným silám. Rozšířením Eliasova modelu „cihel a malty“ o korneodesmosomy vznikl moderní model struktury stratum corneum, ve kterém jsou korneodesmosomy přirovnávány k železným tyčím, jež procházejí skrze otvory v cihlách, aby dodaly cihlové zdi pevnost. Stratum corneum má průměrně 20 vrstev korneocytů.¹⁰



Obr. 4: Kožní bariéra¹⁰

Pro pochopení bariérové funkce *stratum corneum* je nezbytné znát detailně jeho chemické složení, neboť to určuje především jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou příčinou a podstatou jeho chování. Zároveň nám toto poznání umožní pokusit se cíleně zasáhnout tyto struktury kůže s cílem ovlivnit je a bariérovou funkci dočasně pozměnit.

Stratum corneum je složeno ze 75–80% proteinů, 5–15% lipidů a zbytek tvoří další organické sloučeniny a voda, včetně přirozených zvlhčujících faktorů (aminokyseliny, močovina, laktamy aj.), které udržují kůži měkkou, poddajnou a vláčnou. Proteiny jsou obsaženy především v korneocytech (asi 70% α -keratinu a přibližně 10% β -keratinu), a asi 15% proteinů představuje jiné peptidické struktury, včetně kožních enzymů. Korneocyty jsou vysoce nerozpustné a velmi rezistentní k působení chemikálií. Keratin je vzhledem k vysoké hustotě disulfidových můstků ve vodě zcela nerozpustný a spolehlivě odolává kyselinám, solím (odolává i vodě Mrtvého moře, což je 30% roztok solí) a slabým zásadám.

Intercelulární prostor stratum corneum je vyplněn směsí specifických lipidů s malým množstvím vody. Tyto lipidy tvoří lamely, které jsou složeny z několika dvojrstev a jsou uspořádány tak, že směřují svou hydrofobní částí dovnitř a hydrofilní, tvořenou hydroxylovými a karbonylovými skupinami vně, do vodního prostředí. Lamely jsou tvořeny přibližně z 50% ceramidy, 25% cholesterolem, 10% volnými mastnými kyselinami. Zbytek tvoří organické estery cholesterolu, cholesterol sulfát a glukosylceramidy. Zajímavé je, že v těchto lamelách nejsou přítomny fosfolipidy. Ceramidy tvoří nejdůležitější a nejspecifičtější část lipidů stratum corneum. Jsou tvořeny bazickými nenasycenými alkoholy sfingosinem, fytosfingosinem nebo 6-hydroxysfingosinem, které jsou, jak z názvu vyplývá, amidickou vazbou připojeny k mastné kyselině s délkou řetězce nejčastěji 24 uhlíky, která může být nesubstituovaná, popřípadě se může jednat o α -, či ω -hydroxykyselinu. Z hlediska stavby lamel a jejich organizace hrají významnou roli ceramidy, ve kterých je sfingosin (nebo jeho derivát) navázán na ω -hydroxykyselinu s 30–34 uhlíky, jejíž hydroxyl je esterifikován kyselinou linolovou. Tento typ ceramidu tvoří jakousi matici, okolo které se organizují ostatní ceramidy, ve kterých je kyselinová část tvořena kyselinami s 20–24 uhlíky. Z mastných kyselin jsou ve stratum corneum přítomny především kyselina behenová (C_{22}) a lignocerová (C_{24}), v menší míře pak palmitová, stearová aj.

Významnou složkou lipidové matrix je cholesterol, který je rovněž často obsažen v biologických membránách, ve stratum corneum funguje jako stabilizátor lipidických struktur. Díky tomuto složení a uspořádání se ze stratum corneum stává vrstva mimořádně odolná vůči chemickým a fyzikálním vlivům, vrstva, která se svou velmi nízkou propustností vymyká jakékoliv jiné biologické membráně.^{11,12}

3.2.2 Dermis (corium) – škára

Střední vrstvu kůže tvoří silná, odolná a pružná škára. Je bohatá na nervy, cévy i mazové a potní žlázy. Stejně jako pokožka je i škára nejtlustší na dlaních a chodidlech. Tvoří ji převážně vlákna *kolagenu*, vznikajícího v buňkách zvaných fibroblasty. Jde o jeden z nejpevnějších proteinů zjištěných v přírodě, který dodává kůži trvanlivost a pružnost. Některé fibroblasty produkují také další protein, *elastin*, který je s kolagenem příbuzný, je však pružnější. Kolagen a elastin dovolují, aby se kůže snadno napínala a poté se mohla rychle vrátit do původního stavu a tvaru. Kolagen také tvoří základ jizevnaté tkáně, která se tvoří při hojení pokožky řeznými ranami nebo odřeninami.

Vrstvy škóry jsou dvě: **stratum papillare** – povrchová vrstva – přiléhá k epidermis, proti které vybíhá ve vyvýšené papily. Obsahuje kromě sítí vláken i větší množství vazivových buněk a je protkána sítí kapilár. **Stratum reticulare** – hlubší vrstva – obsahuje méně buněk a husté svazky kolagenních fibril, méně fibril elastických.

V dermis se vyskytuje řada speciálních nervových zakončení různých typů, např. Meissnerova tělíska (hmatová tělíska umožňující dotykové čítí), Krauseho tělíska (smyslová tělíska – receptory chladu), Ruffiniho tělíska (smyslové tělíska – receptory tepla) a Vater-Paciniho lamelózní tělíska (receptory tahu a tlaku).^{5,13,14}

3.2.3 Tela subcutanea – podkožní vazivo

Nejhlouběji uloženou vrstvou kůže je podkožní vazivo, připojené k dolní části škóry. Stejně jako keratinocyty syntetizují pro pokožku rohovitý keratin a fibroblasty dodávají pro škáru kolagen, syntetizují speciální buňky nazývané lipocyty pro subkutánní tkáň lipidy čili tuky.

Tato vrstva kůže pomáhá chránit svalstvo, kostni i vnitřní orgány před nárazy a funguje jako izolace i zdroj energie v dobách nedostatku.¹³

3.3 Možné cesty průniku xenobiotik do organismu

I když je kůže, jak již bylo výše zmíněno, mimořádně odolnou bariérou, je zřejmé, že v ní můžeme najít místa, která by přicházela v úvahu jako možné cesty průniku xenobiotik do organismu. Jedná se zejména o průnik *potní žlázou*, *mazovou žlázou*, *transfolikulární*, *intercelulární* a *transcelulární*. Všechny tyto cesty v sobě skrývají určitá úskalí.

Dá se říct, že průnik *potní žlázou* přichází v úvahu pouze pro značně hydrofilní látky, kterých je mezi léčivy pouze minimální množství. I tak je však k zabezpečení absorpce léčiva nutné zajistit jeho obrovský koncentrační spád.

Průnik *mazovou žlázou* je problematický taktéž, ovšem z opačného důvodu. Vzhledem k tomu, že základním požadavkem na léčiva je určitá, nepříliš vysoká lipofilita (logP 3–4), je zřejmé, že takové látky se budou v prostředí tukové žlázy snadno kumulovat. Jejich přestup z lipofilního prostředí do organismu tak bude značně problematický, stejně jako *průnik transfolikulární*. K těmto omezením je nutné ještě přičíst relativně velmi malou plochu pórů i vývodů mazových žlázek.

Z těchto důvodů v úvahu připadají jako nejpravděpodobnější zbývající dvě cesty průniku léčiva do organismu. Cesta *transcelulární* (přes korneocyty) a cesta *intercelulární* (přes lipidové lamely).

Transcelulární průnik léčiv do kůže a kůži je obtížný. Může být např. usnadněn tehdy, jestliže dokážeme zvýšit množství vody obsažené ve stratum corneum. To je možné díky tomu, že korneocyty obsahují značné množství hydrofilních aminokyselin obsahujících funkční skupiny schopné vodu vázat (např. -COOH, -NH₂, -OH). Tak dojde k botnání korneocytů, k „nasávání“ vody do intercelulárního prostoru, tím k rozvolnění a snížení viskozity lipidů a také k částečnému porušení integrity lipidových lamel.

Poněkud realizovatelnějším se stal v posledních asi 20 letech průnik *intercelulární*, neboť díky poznání molekulární podstaty lipidů stratum corneum, bylo možné vyvinout látky, které cíleně působí na tyto struktury – akceleranty transdermální permeace (penetrace).¹¹

3.4 Ovlivnění propustnosti kožní bariéry

Ovlivnit kůži jako bariéru ve smyslu zvýšit její propustnost směrem „dovnitř“ je v principu možné jak fyzikálně, tak působením chemických sloučenin.¹¹

Fyzikální metody: zlepšení permeace se může dosáhnout vytvořením širších hydrofilních otvor (pórů) pomocí slabého elektrického proudu – elektroporace, nebo terapeuticky používaného ultrazvuku – sonoporace.

Mezi další fyzikální metody patří taktéž využití iontoforézy. Iontoforéza je fyzikální metoda (jedná se o neinvazivní metodu), při níž pomocí stejnosměrného proudu procházejí neporušeným povrchem kůže ionizované látky. Používá se obvykle proud o napětí 15–30 mA.^{1,15,16}

Nevýhoda těchto způsobů transdermální aplikace je zřejmá – vždy je nutné použít relativně složité (a tedy finančně náročné) zařízení pro aplikaci.

Z tohoto důvodu se jeví jako schůdnější ovlivnit kůži chemicky, to znamená aplikovat na ni léčivo společně s látkou, která dočasně sníží její bariérovou funkci. Takové látky existují již asi 25 let a vžil se pro ně název akceleranty transdermální permeace.¹¹

3.5 Akceleranty transdermální permeace

Problém špatného průniku léčiv přes kůži je možné řešit použitím farmaceutických pomocných látek – akceleraťů transdermální permeace. Akceleranty transdermální permeace jsou chemicky velmi různorodou skupinou látek, která reverzibilně snižuje bariérové vlastnosti kůže a umožňuje tak průnik léčiva.¹⁷

3.5.1 Požadavky na akceleranty transdermální permeace

Ačkoliv mnoho chemických látek bylo hodnoceno jako urychlovače permeace v lidské či zvířecí kůži, dodnes se žádná nezdá být ideální.

Nejvíce se požadují tyto vlastnosti akceleraťů transdermální permeace: měly by být netoxické, nedráždivé a nealergizující; měly by působit rychle a trvání účinku by mělo být předvídatelné i reprodukovatelné; neměly by vykazovat vlastní farmakologickou aktivitu uvnitř organismu, tj. neměly by se vázat na receptory; jejich účinek by měl být jednosměrný, tzn. umožnit léčivům vstup do těla a nedovolit únik endogenních látek z těla; po jejich odstranění z kůže musí dojít k rychlé obnově bariérových vlastností kůže; musí být kompatibilní s léčivými, mast'ovými základy a ostatními složkami lékové formy.¹⁸

V neposlední řadě musí být snadno vyrobitelné a neměly by být příliš nákladné.¹¹

3.5.2 Mechanismus účinku akceleraantů transdermální permeace

Soudí se, že mechanismus účinku akceleraantů spočívá v jednom ze tří následujících efektů, popřípadě v jejich kombinaci:

- a) účinkem akceleraantu dochází k rozrušení organizované struktury lipidů v intercelulárních prostorech kůže, zejména její povrchové, rohové vrstvy (stratum corneum),
- b) akceleraant interaguje s intracelulárními proteiny kůže,
- c) akceleraant optimalizuje hodnotu rozdělovacího koeficientu léčiva mezi léčivým přípravkem a kožními membránami.

Působení akceleraantů na stratum corneum shrnul Barry již v roce 1987 do těchto základních bodů:

- a) všechny urychlovače transdermální penetrace desintegrují lipidové vrstvy kůže a tak zvyšují jejich fluiditu. Méně rigidní struktura kůže je pak pro léčiva propustnější,
- b) některé akceleraanty interagují s intracelulárními proteiny stratum corneum, především s α -keratinem. Nabobtnalými buňkami potom polární léčiva procházejí lépe,
- c) difúzní odpor rohové vrstvy je do značné míry ovlivněn její hydratací. V hydratované kůži jsou mezibuněčné prostory méně viskózní, voda kompetuje na vazebných místech membrán a jejich difúzní odpor klesá.¹⁹

3.5.3 Přehled akceleraantů transdermální permeace

Podle chemické struktury se rozlišují tyto urychlovače kožní permeace a penetrace: **Alkylsulfoxidy** – nejznámější z této skupiny je dimethylsulfoxid. Mechanismus účinku spočívá v tom, že díky své polaritě interaguje s hydrofilními skupinami lipidů, vytváří s nimi vodíkové vazby, solvatační obal a rozrušuje organizované vrstvy lipidů v intercelulárním prostoru. Rozšíření hydrofilní oblasti v tomto prostoru pak usnadňuje průnik hlavně hydrofilním látkám. V poslední době se od používání dimethylsulfoxidu upouští pro jeho vlastní farmakologické účinky.

Alkoholy – alkoholy splňují jednu z podmínek, kterým obvykle mají urychlovače transdermální permeace vyhovovat. Jsou totiž výbornými rozpouštědly léčivých látek. Účinek ethanolu spočívá pravděpodobně na delipidizaci kůže. Uplatňují se dále hlavně alkoholy nižší, s počtem uhlíků do šesti, ale i alkoholy vyšší od dekanolu po linolcylalkohol. Zatímco hydrofilní alkoholy působí pouze mechanismem zvyšování

rozpuštěnosti léčivé látky a následným zvyšováním koncentračního spádu, jejich difúzibilní formy, vyšší lipofilní alkoholy extrahují lipidy a proteiny ze stratum corneum.

Dioly a acetal – tato známá rozpouštědla nemají výrazné vlastnosti urychlovačů, spíše účinnější urychlovače v jejich aktivitě vhodně doplňují. Nejpoužívanější z této skupiny jsou propylenglykol, 1,3-butandiol, 2,3-butandiol a 2-methyl-2,4-pentandiol.

Alifatické kyseliny a jejich estery – tuto skupinu látek je třeba považovat za urychlovače méně účinné. Dobře prozkoumáno je působení kyseliny olejové, undecylenové, linolenové a ikosapentaenové. Mechanismus účinku esterů nižších i vyšších alifatických kyselin není dobře znám. Do úvahy přichází jako rozpouštědlo dobře známý 2-propylmiristát, který je urychlovačem jen ve spojení s 2-propanolem.

Deriváty hydroxykyselin – v experimentu se dokázaly pozitivní výsledky s hexadecyllaktátem a dodecyllaktátem. Urychlovače tohoto typu jsou použitelné v nosních a vaginálních lécích.

Amidy kyselin – i když dimethylformamid a dimethylacetamid jsou vynikající rozpouštědla, jako akceleranty ztrácejí význam, protože jejich účinnost je nižší než dimethylsulfoxidu.

Deriváty močoviny – mechanismus účinku močoviny se zakládá na hydrataci rohové vrstvy pokožky, po delším působení na keratolytickém efektu. Účinek zvyšuje přísada propylenglykolu. Akcelerační účinek mají deriváty 2-imidazolinonu, konkrétně 1-dodecyl-3-methyl-2-imidazolinon.

Ketony – nižší alifatické ketony působí jako rozpouštědla lipidů. Lipofilnější mají větší rozpouštěcí schopnost, ale jsou dráždivé. Ze skupiny makrocyclických ketonů je nejméně aktivním urychlovačem cyklopentadekanon.

Terpeny – patří sem chemická individua i směsi těchto látek – přírodní silice. Nejúčinnější jsou askaridol a eukalyptol. Působí pravděpodobně narušením organizovaných lipidních struktur a interakcí s intercelulárními proteiny.

Deriváty sacharidů – jako urychlovače absorpce léčiv z vodných roztoků je použitelný 2-hydroxypropyl-D-cyklodextrin. Tenzidy, estery sacharosy mají jako urychlovače výhodu, že jsou málo toxické a nedráždí kůži. Určité zkušenosti jsou s dodecylesterem.

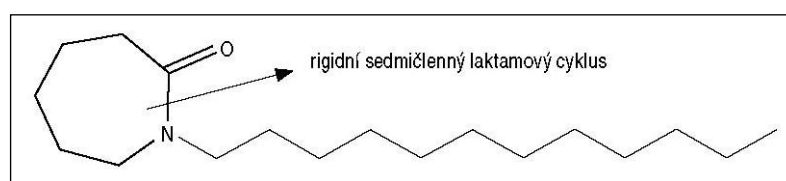
Aminokyseliny a jejich deriváty – L-aminokyseliny jsou urychlovače permeace a penetrace mnohých léčivých látek, zejména steroidů. Mechanismus jejich účinku spočívá pravděpodobně v ovlivnění keratinové složky kůže. Jejich účinnost je závislá na

aktuální hodnotě pH vehikula, v němž jsou dispergovány. Důležitými deriváty jsou sloučeniny odvozené od Ω -aminokyselin. Sem lze zařadit značné množství struktur dosud publikovaných akceleračních látek. Zároveň je můžeme považovat za akceleranty v současné době nejstudovanější a také neúčinnější. Nejpočetnější je skupina cyklických derivátů aminokyselin-laktamů. Nejvýznamnější se ukázaly ϵ -laktamy z nichž N-dodecyl- ϵ -kaprolaktam – AZONE[®] – 1-dodecyl-2-azepanon, byl patentovaný v USA v roce 1976.

Aminy – jako urychlovače permeace a penetrace se využily cyklické aminy označované za ananloga Azonu: 1-dodecylazetidín, 1-dodecylpyrrolidín, 1-dodecylpiperidín. Strukturně zajímavými urychlovači jsou oxidy aminů.²⁰

3.6 Vývoj akceleračních látek transdermální permeace na FaF UK v Hradci Králové²¹

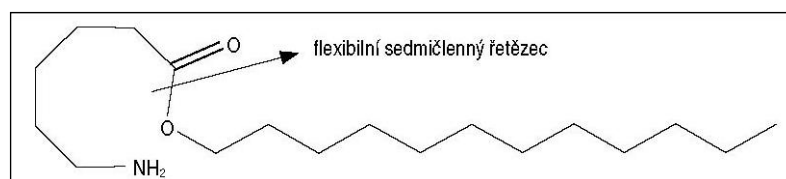
Problematika akceleračních látek transdermální permeace je na FaF UK řešena od roku 1989 a tato fakulta je doposud jediným pracovištěm v ČR, na kterém probíhá základní výzkum v této oblasti farmaceutické chemie a farmaceutické technologie. Podle dosud publikovaných perspektivních akceleračních látek zde byla vytipována struktura původní skupiny látek, u které se daly tyto vlastnosti očekávat, přičemž jako předloha posloužil AZONE[®] (obr. 5).



Obr. 5: Azone

Nejprve bylo přistoupeno k náhradě laktamové (amidické) skupiny za isosterní skupinu esterovou a díky této úpravě rigidní cyklickou strukturu vycházející z ϵ -kaprolaktamu zaměnit za strukturu lineární, která bude mnohem flexibilnější. Předpokládalo se totiž, že tato náhrada povede k dokonalejší interakci s intercelulárními lipidy rohové vrstvy epidermis, stratum corneum (SC) – hypotetickým místem působení akceleračních látek transdermální permeace. Tímto způsobem vznikla již v roce 1989 první série látek – lipofilních esterů 6-aminohexanové kyseliny (EAK), u kterých byla

skutečně zjištěna pozoruhodná akcelerační aktivita (obr. 6). Látky tohoto typu překonávaly Azon až 40krát.

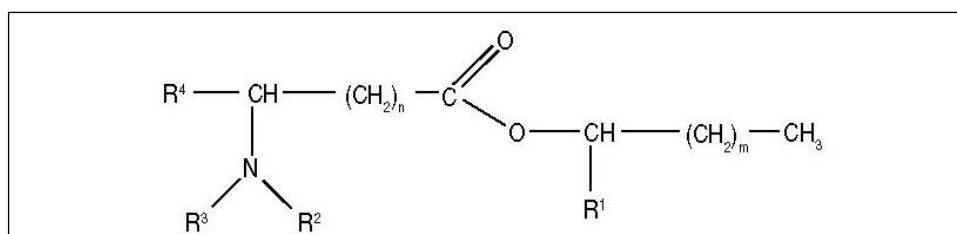


Obr. 6: Ester EAK

Vzhledem k vysoké aktivitě prvních připravených sloučenin bylo přistoupeno k obměnám struktury. Záměrem bylo připravit sérii látek, na základě jejichž biologické aktivity bude možné stanovit první a základní vztahy mezi strukturou a účinkem.

Tyto změny bylo možno teoreticky provést na několika místech molekuly, jak je patrné z obrázku 7.

- Změny znamenaly:
- 1) Změnit délku spojovacího řetězce mezi karboxylovou a aminovou skupinou ($n = 4, 5, 6$).
 - 2) Změnit délku alifatického řetězce v alkoholické části esteru ($m = 4 - 14$).
 - 3) Změnit tvar alifatického řetězce v alkoholické části esteru ($R^1 = -H$ nebo C_1-C_4 alkyl).
 - 4) Zjistit vliv substituce na aminoskupině (R^2 a $R^3 = -H$, methyl-, ethyl-, acyl-).
 - 5) Zjistit vliv lokalizace aminoskupiny na alkylovém řetězci aminokyseliny ($R^4 = -H$, methyl-).



Obr. 7: Zamýšlené strukturální obměny aktivní molekuly

Za účelem odpovědět si na otázku, jak se na akceleračním účinku projeví změna délky řetězce ω -aminokyseliny, byly připraveny estery kyseliny 7-aminoheptanové a 8-aminooktanové. Z výsledků bylo patrné, že tato změna struktury při zachování

stejně délky alkylových řetězců v alkoholové části esterů (tady alkoholy C₈–C₁₂) nepřinesla zvýšení aktivity, ale naopak její prudký pokles. Estery 8-aminooktanové kyseliny postrádaly aktivitu téměř úplně.

Souběžně s touto fází prací probíhalo prověření vlivu délky alkoholické části molekuly. Byly připraveny estery EAK s alkoholy C₇ až C₁₆. Výsledek byl neočekávaný, protože kromě výrazně zvonovité závislosti délky řetězce na aktivitě se projevil také jasný vliv „sudého a lichého“ řetězce. Estery s lichým počtem uhlíků měly nápadně nižší aktivitu, než estery s počtem uhlíků sudým. Nejvyšší aktivita byla zjištěna u oktyl-, decyl- a dodecylesterů EAK.

Dále bylo přistoupeno k podstatně náročnější etapě syntéz, tedy k přípravě esterů s rozvětvenými alkoholy. Problém spočíval v tom, že celou řadu rozvětvených alkoholů bylo nutné syntetizovat. Výsledky testů ukázaly, že rozvětvení snižuje akcelerační aktivitu a toto snížení je prakticky úměrné stupni rozvětvení. Současně s rozvětvením byl sledován i vliv uspořádání a tvaru alkoholické části esterů. Nakonec byl vysloven jednoznačný závěr – cyklizace vede k úplnému vymizení akcelerační aktivity.

Jako předposlední varianta obměny struktury, byla vyzkoušena substituce primární aminoskupiny, zejména se prověřoval vliv její bazicity. Proto byla připravena série acylovaných decyl- a dodecylesterů EAK – tedy nejaktivnějších sloučenin ze všech, které byly do té doby připraveny. Výsledek byl opět jednoznačný – acylace (tedy ztráta bazicity) aminoskupiny vede k vymizení aktivity. Naopak její alkylace vedla k mimořádnému vzestupu aktivity. O. Farsa v rámci své dizertace připravil řadu sloučenin, ve kterých byl bazický dusík součástí cyklu a také tato změna vedla k relativně účinným urychlovačům. Aktivita byla ovšem vázána na jednotlivé sloučeniny a nepodařilo se připravit větší sérii takto substituovaných sloučenin s podobnou akcelerační účinností.

Poslední fázi prověřování prvotních závislostí vztahů struktury a účinku provedl A. Kroutil ve své diplomové práci, ve které připravil sérii esterů 6-aminoheptanové kyseliny (viz. obrázek 7 – $n = 4$, $m = 6-10$, $R^1, R^2, R^3 = -H$, $R^4 = -CH_3$). Tyto sloučeniny téměř úplně postrádaly jakýkoliv náznak urychlení průniku modelového léčiva přes neporušenou lidskou kůži.

Prvotní vztahy mezi strukturou a účinkem v této skupině látek bylo možno na základě provedených syntéz zformulovat takto: 1) Vzdálenost aminoskupiny od karbonylu musí být tvořena pětiuhlíkatým řetězcem. 2) Esterovou část musí tvořit alkyl

se sudým počtem uhlíků o délce C_8 až C_{12} . 3) Aminoskupiny musí být bazická a terminální.

Přelom ve výzkumu akceleraantů tohoto typu přineslo zjištění, že aktivní sloučeniny neexistují ve formě aminoesterů, ale ve formě **solí** karbamových kyselin.

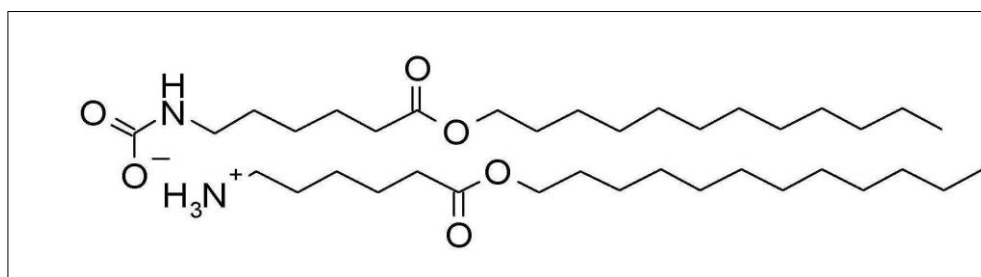
Počítačovým modelováním byl získán pravděpodobný tvar molekuly, která dostala název Transkarbam 12. Podrobným studiem fyzikálních a spektrálních vlastností tohoto akceleraantu byla jeho značně neobvyklá struktura potvrzena a zároveň byla zjištěna další místa v molekule, která je možné strukturně obměnit. Transkarbamy se s určitostí vyplatí i nadále podrobně studovat, neboť disponují velmi výhodnými vlastnostmi.

3.6.1 Transkarbamy

S cílem získat flexibilní obměnu molekuly Azonu a zároveň připravit biodegradabilní akceleraant byly připraveny na Faf UK estery 6-aminohexanové kyseliny, jejichž stabilizací oxidem uhličitým vznikly symetrické soli karbamových kyselin, nazvané Transkarbamy.

Modelovou hydrolyzou za použití prasečí esterázy bylo zjištěno, že Transkarbam se snadno metabolizuje na kys. ϵ -aminokapronovou a laurylalkohol, což jsou látky se známou toxicitou a běžně používané v medicíně, resp. v kosmetice.¹¹

Transkarbam 12 – 5-(dodecyloxykarbonyl)pentylammonium-(dodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát, **T12** – je velmi účinný urychlovač transdermální penetrace (obr. 8).²²



Obr.8: Transkarbam 12²³

Bylo jednoznačně prokázáno, že transkarbamy interagují s lipidickými složkami stratum corneum, neboť jejich strukturální podobnost s ceramidy, které jsou významnou složkou těchto lipidů jim to umožňuje.²⁴

3.6.2 Pseudoceramidy

V současné době na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové skupina kolem doc. PharmDr. Alexandra Hrabálka, CSc. a doc. RNDr. Pavla Doležala, CSc., pracuje nejen na vývoji sloučenin s vlastnostmi urychlovačů, ale též na vývoji látek s vlastnostmi opačnými, jejichž úlohou je omezit průnik nežádoucích látek do kůže. Samostatnou kapitolu ve výzkumu pak představují tzv. pseudoceramidy – jednoduché (jak strukturně, tak synteticky) analogy přirozených ceramidů. Tyto látky by mohly nalézt uplatnění při léčbě či mírnění příznaků různých kožních chorob spojených s nedostatkem fyziologických ceramidů, neboť jak bylo experimentálně prokázáno, jsou schopny chybějící ceramidy v kůži doplnit a regenerovat její bariérovou funkci.²⁵

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny a materiál

SUROVINY	VÝROBCE (či DODAVATEL)
Abil WE 09	Goldschmidt, Darmstadt, Německo
Acetonitril pro HPLC	AlliedSignal, Seelze, Německo
Azid sodný p.a.	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Diazolidinylurea (95%)	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Ethylhexylkarbonát	Goldschmid, Darmstadt, Německo
Chlorid sodný ČL 2005	Lachema, Brno, ČR
Izopropylmyristát	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Kofein ČL 2005	Kulich, Hradec Králové, ČR
Kyselina chlorovodíková 35%, p.a.	Penta Ing. Petr Švec, Praha, ČR
Kyseliny mravenčí p.a.	Kulich, Hradec Králové, ČR
Methanol pro HPLC	AlliedSignal, Seelze, Německo
Stearan hlinitý ČL 2005	Kulich, Hradec Králové, ČR
Transkarbam 12	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Trometamol (TRIS)	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Vazelína bílá	Kulich, Hradec Králové, ČR
Voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Voda pro HPLC	FaF UK, Hradec Králové, ČR

Výše uvedené komerčně dostupné látky odpovídaly deklarované jakosti podle daných norem výrobců, resp. dodavatelů. Abil WE 09 je směsí polyglyceryl-4-isostearátu, CetylPEG/ PPG-10/1 dimethiconu a hexyl-laurátu. Transkarbam 12 byl syntetizován na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové doc. PharmDr. Alexandrem Hrabálkem, CSc.

4.2 Přístroje

PŘÍSTROJE	VÝROBCE
Analytické váhy	Sartorius, Göttingen, Německo
Digitální pH-metr GRYF 209L	Elektronké přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Elektronická míchačka	Variomag Labortechnik, München, Německo
Franzovy cely	FaF UK, Hradec Králové, ČR
HPLC sestava Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Kombinovaná lednice s marazničkou	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha, ČR
Předvážky Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Předvážky Kern 440-53N	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Ultratermostat Haake L	Haake, Berlín, Německo
Ultrazvuková lázeň	Tesla, Vráble, ČR

Sestava pro HPLC od Agilent Technologies 1200 Series se skládala z isokratické pumpy G1390A, degaseru G1379B, autosampleru G1329A, termostatu G1316A a UV/VIS detektoru G1314B.

4.3 Biologický materiál

Pro permeační pokusy byly jak model podobný lidské kůži použity štěpy prasečích kůží. Tento materiál byl výhradně získáván ze samic prasete domácího *Sus scrofa f. domestica*. Kůže byla preparována pouze z vnější strany ušních boltců. Boltce potetované, zarudlé či jinak poškozené byly vyřazeny. Boltce kanců se nepoužívají, protože díky hormonu testosteronu je pozměněn metabolismus i celková struktura kůže.

Postup spočívá v očištění povrchu celého boltce a zbavení štětín. Poté byla pomocí skalpelu kůže z vnější strany boltce stažena, přičemž nesmělo dojít k jejímu

proříznutí. Následně byly stažené kůže několikanásobně omyty ve fyziologickém roztoku, čímž došlo k dokonalému odkrvení bez jakékoliv změny struktury celé pokožky. Takto připravený materiál byl použit pro další přípravu štěpů kůže.

Jedná se o přípravu štěpu, který je plnohodnotnou kůží v celé její tloušťce. Skládá se jak z vrchní části (stratum corneum), pokožky i podkoží. Postup spočívá v konzervaci (zastavení všech enzymatických procesů), zbavení přebytečné vody, označení, zatavení do polyethylenové folie a uchovávání při teplotách nižších než -20 °C v mrazničce. Roztok ke konzervaci byl připraven rozpuštěním azidu sodného (NaN₃) ve fyziologickém roztoku.

4.4 Složení a příprava krémů

K ověření koncentrační závislosti účinku transkarbamu 12 byly připraveny oleokrémy s 60 % vody. Jednotlivé krémy se lišily koncentrací transkarbamu 12 (v procentech k celkové hmotnosti finálního krému). Konkrétně se jedná o tyto koncentrace T12: 0; 0,3; 0,5; 0,7; 1 %.

Složení oleokrémů s obsahem 60 % vody (rozpis na 100 g):

SUROVINY	základ bez T12	základ s 0,3 % T12	základ s 0,5 % T12	základ s 0,7 % T12	základ s 1 % T12
Aluminium stearicum	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Abil WE 09	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Isopropylum myristicum	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0
Ethylhexylcarbonatum	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Vaselinum album	16,0	15,7	15,5	15,3	16,0
T12	0	0,3	0,5	0,7	1,0
Coffeinum	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
TRIS pufr pH 7,1	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Příprava oleokrému s 60 % vodné fáze

A. Vodná fáze

1. Příprava tromethamolového (TRIS) pufru pH 7,1 (s 0,6 % diazolidinylurey)
2. Dispergace příslušného množství kofeinu v TRIS pufru za laboratorní teploty, event.do 35 °C (dostatečné; max. 45 °C)

B. Lipofilní fáze

1. Důkladné rozetření stearanu hlinitého v isopropylmyristátu
2. Vpravení vazelíny a ethylhexylkarbonátu a temperance na 45 °C
3. Vpravení T12
4. Vpravení Abilu WE 09 a promísení všech součástí

C. Preemulgace za obyčejné teploty

Postupné přidávání hydrofilní fáze (A) k lipofilní fázi (B) za stálého míchání v třence s těrku

D. Homogenizace

Závěrečné promíchání krému pomocí ručního ponorného mixéru

Složení TRIS pufru pH 7.1 s konzervační přísadou

Trometamolium	24,0
Diazolidinylurea	6,0
Acidum hydrochloricum	q.s.
Aqua purificata	ad 1000,0

Příprava pufru:

1. Rozpuštění trometamolu asi v 900 ml vody
2. Změření pH za stálého míchání (pH asi 12,3)
3. Přidání diazolidinylurey (konc. 0,6% hmot.; hodnota pH klesne)
4. Úprava pH na 7,1 pomocí koncentrované HCl
5. Doplnění pufru (pH 7,1) na konečný objem 1000,0 ml (v odměrné baňce)

4.5 Permeační pokusy

Permeační pokusy byly prováděny za použití modifikovaných Franzových cel, jež byly umístěny do termostátované vodní lázně temperované na 32 °C. Tyto cely byly naplněny akceptorovým médiem (izotonizovaným TRIS pufrem pH 7,1 o teplotě 32 °C) a jednotlivé vzorky kůže byly fixovány mezi dvěma destičkami z plexiskla. Nanášení vzorku (donoru) bylo prováděno hmotnostně pomocí analytických vah. Nanášením donoru se rozumí umístění 1,4 g krému do přesně vymezeného prostoru o známé ploše (2 cm²). Objem akceptorové fáze činil přibližně 18,0 ml.

Vzorky akceptorové fáze byly v množství 0,6 ml odebírány v předem stanovených časových intervalech, tzn. za 10; 14; 18; 24; 34; 40; 48 hodin (od „startovacího času“). Odebrané množství akceptorové fáze bylo vždy doplněno novým akceptorovým médiem tak, aby byl objem v celách doplněn na původní. Při konečných výpočtech bylo doplnění akceptorové fáze zohledněno při výpočtu korigovaných konečných koncentrací kofeinu.

4.6 Podmínky HPLC stanovení kofeinu

Množství kofeinu v odebraných vzorcích bylo stanoveno pomocí HPLC. Mobilní fáze o složení voda:methanol 75:25 okyselená 0,2% kyseliny mravenčí byla pumpována rychlostí 1 ml/min přes kolonu Agilent Eclipse XDB-C18 (velikost částic 5 µm, délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, S/N USKH025859). Objem vzorku dávkovaného autosamplerem na kolonu činil 20 µl, detekce byla prováděna UV spektrofotometricky při vlnové délce 272 nm, retenční čas se pohyboval na úrovni 4,9 min.

4.7 Příprava kalibračních roztoků

Základní roztok byl připraven rozpuštěním 30 mg kofeinu ve 100 ml akceptorové fáze v odměrné baňce. Jeho ředěním akceptorovou fází na analytických vahách byly připraveny další kalibrační roztoky o koncentracích 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,9375 a 0,46875 mg/100ml.

Přesná koncentrace každého kalibračního roztoků byla stanovena pomocí HPLC a to nejméně třikrát v průběhu jedné sekvence autosampleru. Z takto získaných dat byla pomocí lineární regrese v softwaru Agilent ChemStation sestrojena kalibrační křivka (viz. graf 3 v části VÝSLEDKY A DISKUZE).

4.8 Výsledky měření

Všechny potřebné údaje z permeačních pokusů jsou zaneseny v protokolech v části 5 – DOKUMENTACE.

Výsledky permeačních pokusů vyjádřené formou fluxu (J) kofeinu jsou prezentovány v části 6 – VÝSLEDKY A DISKUZE.

5 DOKUMENTACE

Protokol 1

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,7$

Kůže: 11.1.2008

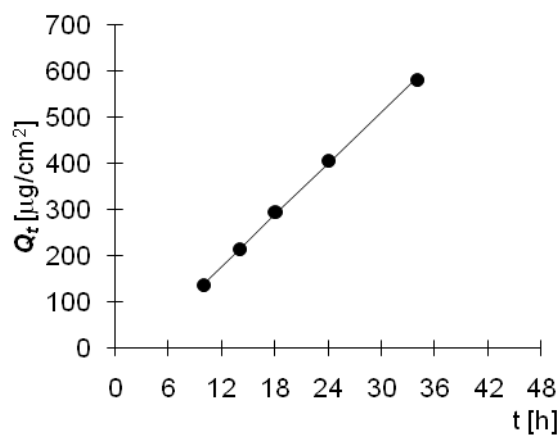
Donor: 0,0%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,454	0,6	1,454	271,9	135,9
14	2,238	0,6	2,284	427,2	213,6
18	3,070	0,6	3,144	587,8	293,9
24	4,255	0,6	4,356	814,5	407,3
34	6,086	0,6	6,226	1 164,2	582,1
40	6,632	0,6	6,832	1 277,6	638,8
48	7,230	0,6	7,449	1 393,0	696,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	135,9	140,5
14	213,6	214,9
18	293,9	289,4
24	407,3	401,0
34	582,1	587,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 18,60753$
Abs. člen	$q = -45,5835$
Korelační koef.	$r = 0,999561$



Protokol 2

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,1$

Kůže: 11.1.2008

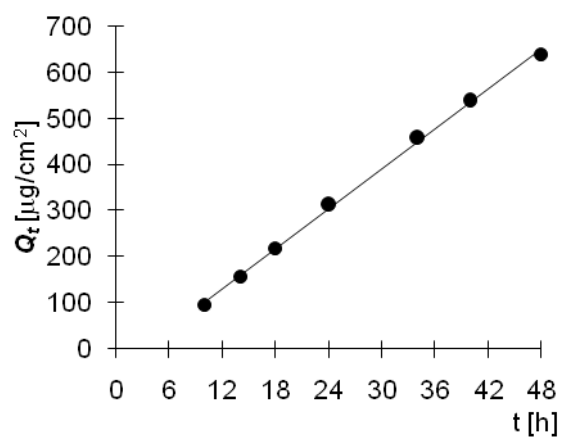
Donor: 0,0%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,179	0,6	1,179	189,8	94,9
14	1,888	0,6	1,932	311,0	155,5
18	2,634	0,6	2,706	435,6	217,8
24	3,791	0,6	3,892	626,6	313,3
34	5,550	0,6	5,695	917,0	458,5
40	6,484	0,6	6,696	1 078,1	539,1
48	7,675	0,6	7,925	1 275,9	638,0

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	94,9	94,9
14	155,5	155,5
18	217,8	217,8
24	313,3	313,3
34	458,5	458,5
40	539,1	539,1
48	638,0	638,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 14,43785$
Abs. člen	$q = -42,4756$
Korelační koef.	$r = 0,99915$



Protokol 3

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,4$

Kůže: 11.1.2008

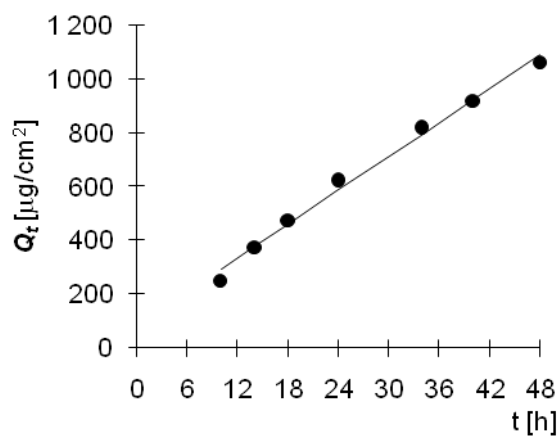
Donor: 0,0%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	3,069	0,6	3,069	503,3	251,7
14	4,444	0,6	4,557	747,3	373,6
18	5,609	0,6	5,776	947,3	473,6
24	7,400	0,6	7,612	1 248,3	624,2
34	9,727	0,6	10,005	1 640,9	820,4
40	10,832	0,6	11,198	1 836,5	918,2
48	12,506	0,6	12,916	2 118,2	1 059,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	251,7	292,5
14	373,6	376,3
18	473,6	460,2
24	624,2	586,0
34	820,4	795,6
40	918,2	921,3
48	1059,1	1089,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 20,96045
Abs. člen	q = 82,90222
Korelační koef.	r = 0,995468



Protokol 4

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,6$

Kůže: 11.1.2008

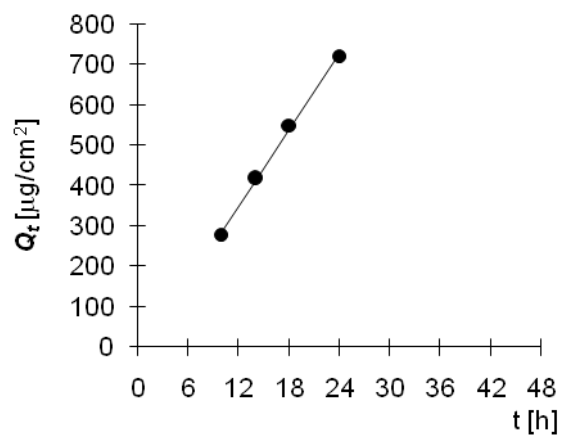
Donor: 1,0%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	2,990	0,6	2,990	556,1	278,1
14	4,405	0,6	4,501	837,3	418,6
18	5,738	0,6	5,883	1 094,2	547,1
24	7,534	0,6	7,723	1 436,6	718,3
34	9,606	0,6	9,855	1 833,0	916,5
40	10,585	0,6	10,903	2 028,0	1 014,0
48	11,598	0,6	11,950	2 222,7	1 111,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	278,1	286,8
14	418,6	412,2
18	547,1	537,5
24	718,3	725,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 31,34466
Abs. člen	q = -26,6618
Korelační koef.	r = 0,998749



Protokol 5

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,6$

Kůže: 11.1.2008

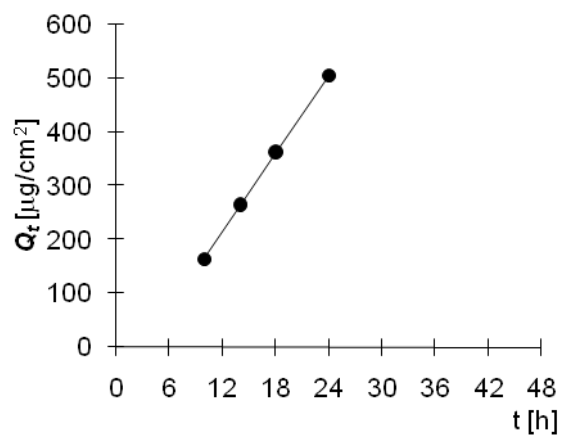
Donor: 1,0%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,772	0,6	1,772	329,6	164,8
14	2,794	0,6	2,851	530,2	265,1
18	3,806	0,6	3,898	725,1	362,5
24	5,289	0,6	5,415	1 007,1	503,6
34	6,707	0,6	6,882	1 280,0	640,0
40	7,391	0,6	7,613	1 416,0	708,0
48	8,440	0,6	8,685	1 615,5	807,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	164,8	166,9
14	265,1	263,6
18	362,5	360,3
24	503,6	505,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 24,17187
Abs. člen	q = -74,8233
Korelační koef.	r = 0,999881



Protokol 6

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,8$

Kůže: 11.1.2008

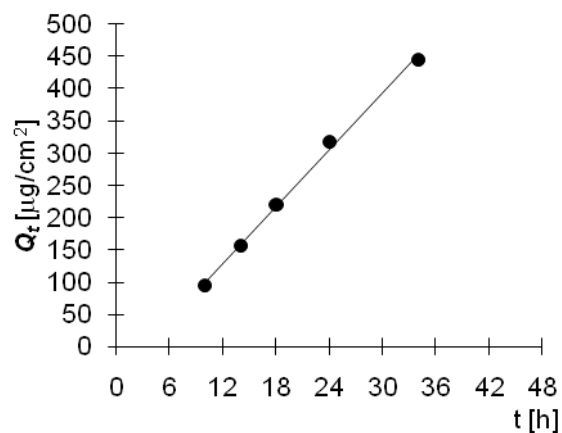
Donor: 1,0%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,005	0,6	1,005	188,9	94,5
14	1,629	0,6	1,661	312,2	156,1
18	2,284	0,6	2,337	439,4	219,7
24	3,295	0,6	3,370	633,5	316,8
34	4,621	0,6	4,729	889,0	444,5
40	5,276	0,6	5,427	1 020,3	510,1
48	6,323	0,6	6,497	1 221,4	610,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	94,5	99,4
14	156,1	158,2
18	219,7	216,9
24	316,8	305,1
34	444,5	451,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 14,68696
Abs. člen	q = -47,4313
Korelační koef.	r = 0,998496



Protokol 7

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,8$

Kůže: 11.1.2008

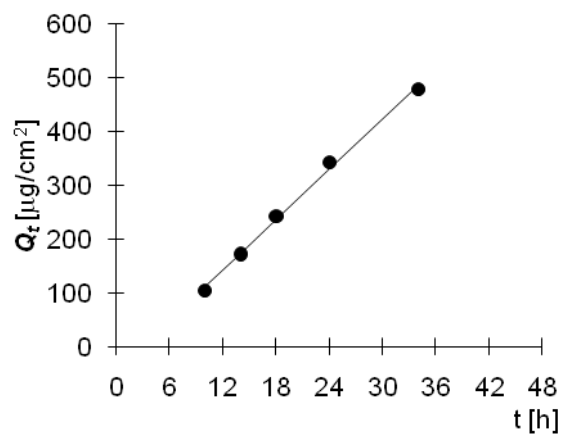
Donor: 0,5%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,104	0,6	1,104	207,6	103,8
14	1,790	0,6	1,825	343,1	171,5
18	2,519	0,6	2,578	484,6	242,3
24	3,555	0,6	3,637	683,8	341,9
34	4,968	0,6	5,084	955,7	477,9
40	5,535	0,6	5,697	1 071,0	535,5
48	6,492	0,6	6,674	1 254,6	627,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	103,8	111,1
14	171,5	173,6
18	242,3	236,2
24	341,9	330,0
34	477,9	486,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 15,641
Abs. člen	q = -45,3395
Korelační koef.	r = 0,998216



Protokol 8

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,7$

Kůže: 11.1.2008

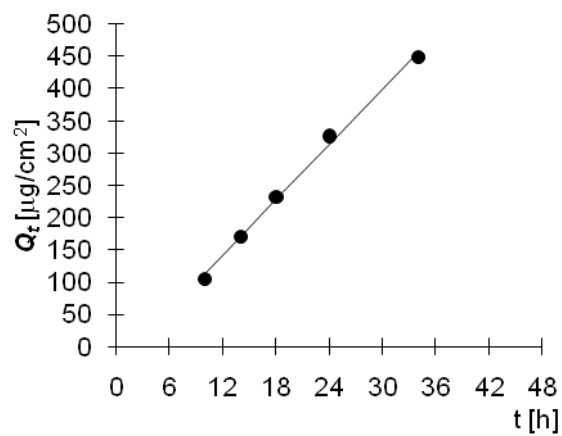
Donor: 0,5%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,260	0,6	1,260	210,4	105,2
14	1,997	0,6	2,042	341,0	170,5
18	2,697	0,6	2,771	462,7	231,3
24	3,806	0,6	3,905	652,2	326,1
34	5,218	0,6	5,358	894,8	447,4
40	5,963	0,6	6,156	1 028,0	514,0
48	7,009	0,6	7,230	1 207,5	603,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	105,2	113,2
14	170,5	170,4
18	231,3	227,5
24	326,1	313,3
34	447,4	456,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 14,29028
Abs. člen	q = -29,6897
Korelační koef.	r = 0,997782



Protokol 9

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,0$

Kůže: 11.1.2008

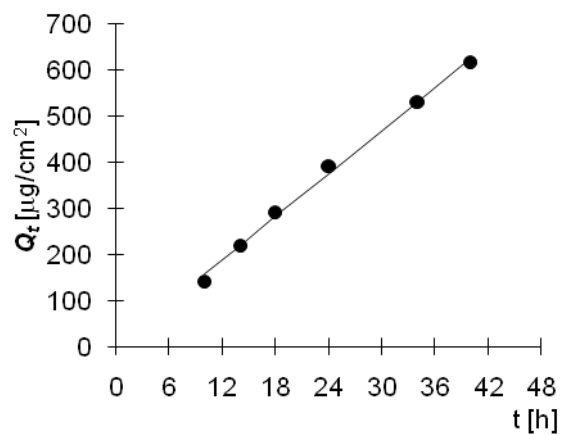
Donor: 0,5%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,684	0,6	1,684	286,3	143,1
14	2,540	0,6	2,599	441,9	220,9
18	3,342	0,6	3,433	583,7	291,8
24	4,496	0,6	4,617	785,0	392,5
34	6,092	0,6	6,255	1 063,3	531,6
40	7,038	0,6	7,258	1 233,9	617,0
48	8,069	0,6	8,325	1 415,2	707,6

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	143,1	158,2
14	220,9	220,6
18	291,8	283,0
24	392,5	376,6
34	531,6	532,5
40	617,0	626,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 15,59556$
Abs. člen	$q = 2,262813$
Korelační koef.	$r = 0,998074$



Protokol 10

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,7$

Kůže: 11.1.2008

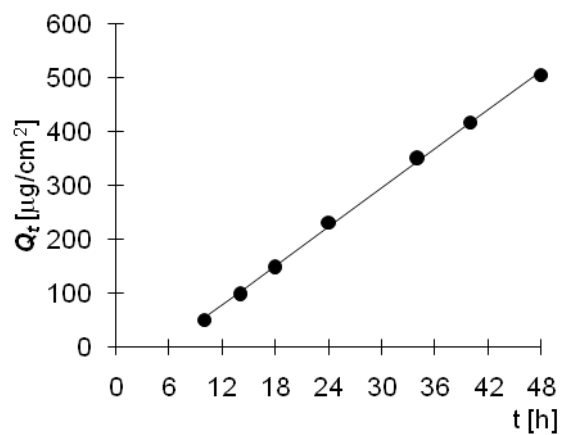
Donor: 0,5%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,548	0,6	0,548	102,5	51,3
14	1,041	0,6	1,059	198,0	99,0
18	1,569	0,6	1,603	299,7	149,8
24	2,422	0,6	2,474	462,6	231,3
34	3,674	0,6	3,754	702,0	351,0
40	4,337	0,6	4,457	833,5	416,8
48	5,248	0,6	5,391	1 008,1	504,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	51,3	54,8
14	99,0	102,9
18	149,8	151,1
24	231,3	223,2
34	351,0	343,5
40	416,8	415,7
48	504,1	511,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 12,02905$
Abs. člen	$q = -65,4732$
Korelační koef.	$r = 0,99939$



Protokol 11

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,7$

Kůže: 11.1.2008

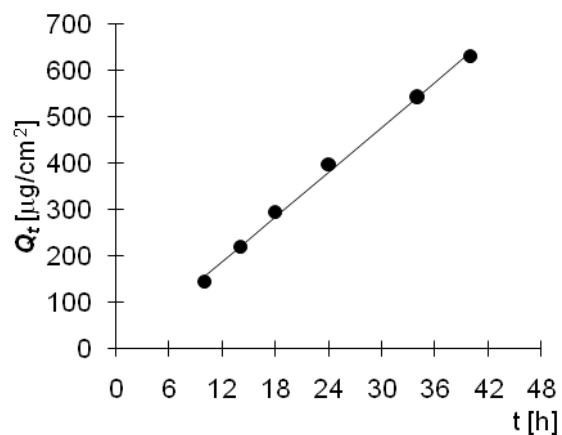
Donor: 0,3%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,541	0,6	1,541	288,2	144,1
14	2,296	0,6	2,346	438,6	219,3
18	3,061	0,6	3,137	586,6	293,3
24	4,141	0,6	4,242	793,2	396,6
34	5,669	0,6	5,805	1 085,6	542,8
40	6,546	0,6	6,732	1 258,9	629,5
48	7,584	0,6	7,800	1 458,5	729,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	144,1	156,7
14	219,3	220,9
18	293,3	285,2
24	396,6	381,6
34	542,8	542,3
40	629,5	638,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 16,06931
Abs. člen	q = -4,0331
Korelační koef.	r = 0,998488



Protokol 12

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Kůže: 11.1.2008

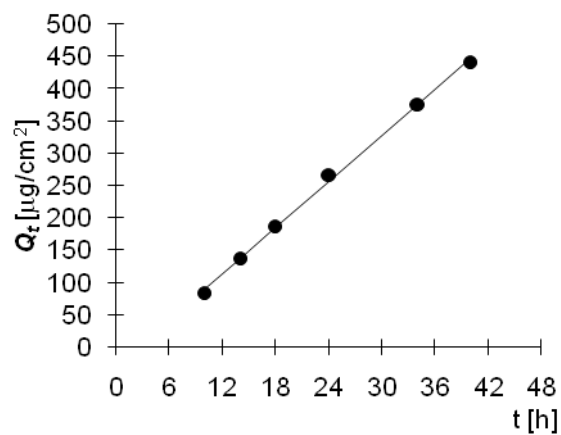
Donor: 0,3%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,906	0,6	0,906	166,8	83,4
14	1,458	0,6	1,487	273,6	136,8
18	1,978	0,6	2,027	372,9	186,5
24	2,830	0,6	2,896	532,8	266,4
34	3,984	0,6	4,079	750,4	375,2
40	4,657	0,6	4,790	881,4	440,7
48	5,433	0,6	5,589	1 028,4	514,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	83,4	89,8
14	136,8	137,3
18	186,5	184,8
24	266,4	256,1
34	375,2	374,9
40	440,7	446,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 11,88039
Abs. člen	q = -29,0414
Korelační koef.	r = 0,999071



Protokol 13

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,2$

Kůže: 11.1.2008

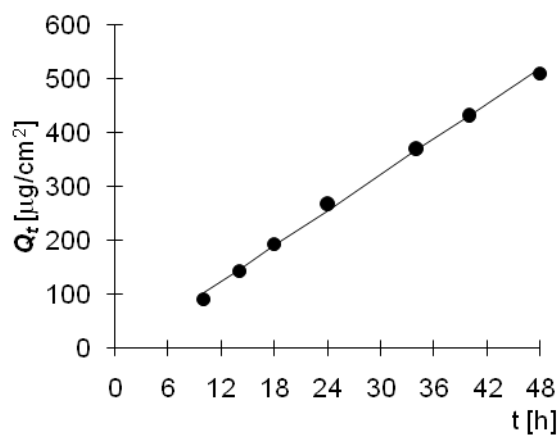
Donor: 0,3%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,122	0,6	1,122	181,8	90,9
14	1,728	0,6	1,769	286,6	143,3
18	2,324	0,6	2,389	387,1	193,5
24	3,232	0,6	3,321	538,0	269,0
34	4,467	0,6	4,590	743,6	371,8
40	5,185	0,6	5,355	867,6	433,8
48	6,109	0,6	6,307	1 021,8	510,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	90,9	101,8
14	143,3	145,9
18	193,5	190,0
24	269,0	256,1
34	371,8	366,3
40	433,8	432,5
48	510,9	520,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 11,02143
Abs. člen	q = -8,40207
Korelační koef.	r = 0,998536



Protokol 14

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,3$

Kůže: 11.1.2008

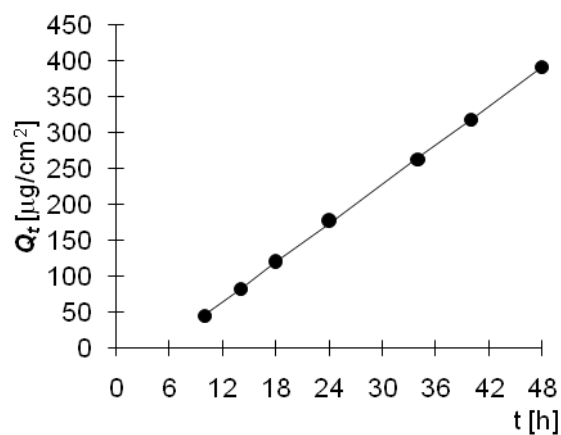
Donor: 0,3%

Měření: P1

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,558	0,6	0,558	91,0	45,5
14	0,988	0,6	1,009	164,4	82,2
18	1,454	0,6	1,491	243,0	121,5
24	2,137	0,6	2,192	357,3	178,6
34	3,144	0,6	3,225	525,6	262,8
40	3,796	0,6	3,915	638,1	319,0
48	4,662	0,6	4,806	783,5	391,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	45,5	47,4
14	82,2	83,6
18	121,5	119,9
24	178,6	174,3
34	262,8	265,0
40	319,0	319,4
48	391,7	391,9

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 9,066704$
Abs. člen	$q = -43,3044$
Korelační koef.	$r = 0,999841$



Protokol 15

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,8$

Kůže: 13.3.2008

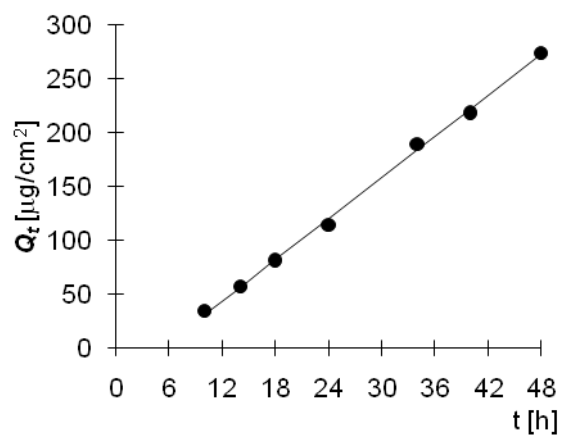
Donor: 0,0%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,411	0,6	0,411	69,0	34,5
14	0,665	0,6	0,680	114,2	57,1
18	0,945	0,6	0,969	162,8	81,4
24	1,324	0,6	1,359	228,3	114,1
34	2,207	0,6	2,256	378,9	189,5
40	2,527	0,6	2,607	438,1	219,0
48	3,170	0,6	3,263	548,2	274,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	34,5	31,5
14	57,1	56,9
18	81,4	82,3
24	114,1	120,4
34	189,5	183,9
40	219,0	222,0
48	274,1	272,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 6,351073$
Abs. člen	$q = -32,0384$
Korelační koef.	$r = 0,999069$



Protokol 16

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 13.3.2008

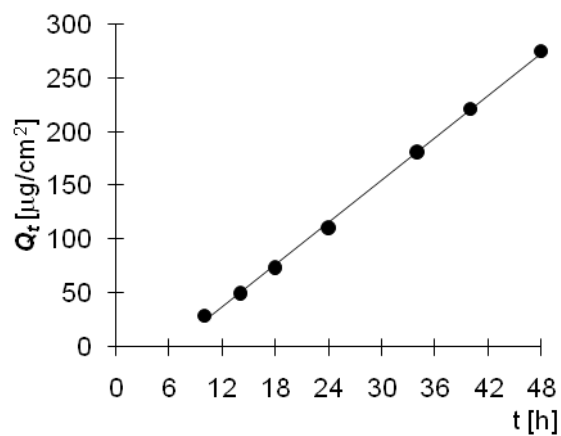
Donor: 0,0%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,338	0,6	0,338	59,5	29,8
14	0,563	0,6	0,575	101,2	50,6
18	0,820	0,6	0,840	147,8	73,9
24	1,235	0,6	1,264	222,5	111,2
34	2,019	0,6	2,063	363,0	181,5
40	2,439	0,6	2,509	441,6	220,8
48	3,033	0,6	3,119	548,9	274,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	29,8	29,8
14	50,6	50,6
18	73,9	73,9
24	111,2	111,2
34	181,5	181,5
40	220,8	220,8
48	274,4	274,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 6,52601$
Abs. člen	$q = -40,6625$
Korelační koef.	$r = 0,999407$



Protokol 17

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,4$

Kůže: 13.3.2008

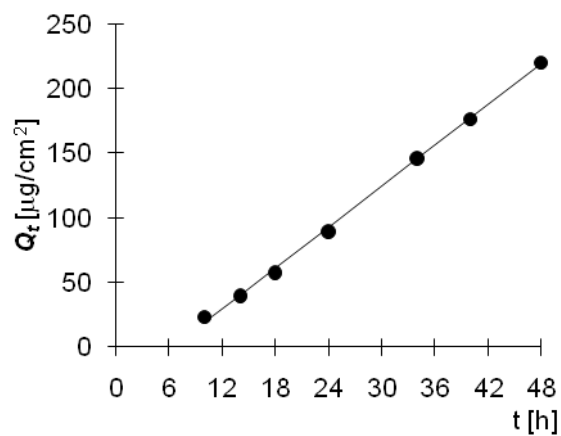
Donor: 0,0%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,289	0,6	0,289	47,5	23,7
14	0,478	0,6	0,488	80,1	40,0
18	0,690	0,6	0,707	116,0	58,0
24	1,065	0,6	1,091	178,9	89,5
34	1,743	0,6	1,783	292,5	146,2
40	2,087	0,6	2,152	352,9	176,5
48	2,607	0,6	2,685	440,4	220,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	23,7	19,2
14	40,0	40,2
18	58,0	61,2
24	89,5	92,7
34	146,2	145,2
40	176,5	176,7
48	220,2	218,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 5,249629
Abs. člen	q = -33,2544
Korelační koef.	r = 0,99933



Protokol 18

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 13.3.2008

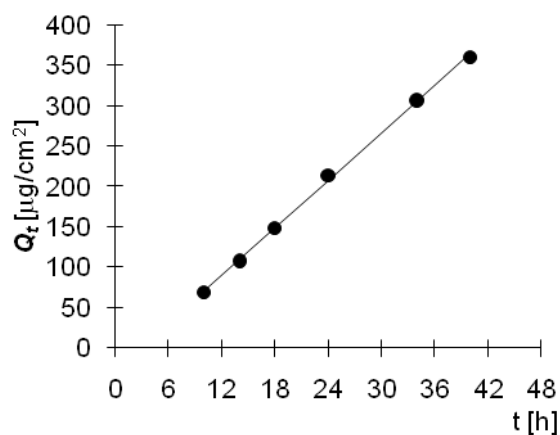
Donor: 1,0%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,837	0,6	0,837	139,0	69,5
14	1,276	0,6	1,306	216,8	108,4
18	1,748	0,6	1,795	298,0	149,0
24	2,512	0,6	2,577	427,7	213,9
34	3,614	0,6	3,707	615,4	307,7
40	4,209	0,6	4,343	721,0	360,5
48	4,822	0,6	4,979	826,4	413,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	69,5	71,1
14	108,4	110,2
18	149,0	149,3
24	213,9	208,0
34	307,7	305,8
40	360,5	364,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 9,776834
Abs. člen	q = -26,6389
Korelační koef.	r = 0,999544



Protokol 19

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,2$

Kůže: 13.3.2008

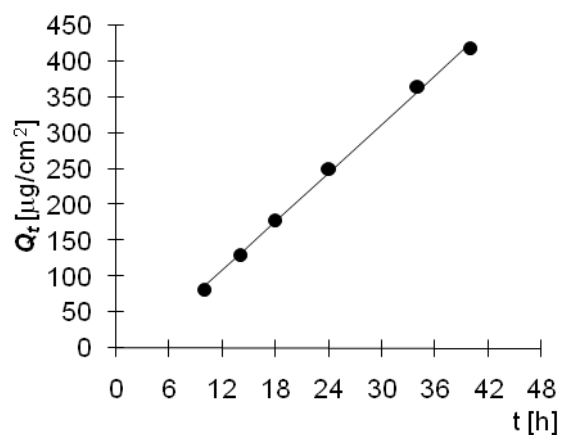
Donor: 1,0%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,960	0,6	0,960	165,2	82,6
14	1,486	0,6	1,519	261,3	130,7
18	2,026	0,6	2,079	357,6	178,8
24	2,842	0,6	2,915	501,3	250,7
34	4,134	0,6	4,235	728,5	364,2
40	4,710	0,6	4,857	835,5	417,7
48	5,434	0,6	5,603	963,8	481,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	82,6	86,9
14	130,7	132,0
18	178,8	177,2
24	250,7	245,0
34	364,2	357,9
40	417,7	425,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 11,29396
Abs. člen	q = -26,0801
Korelační koef.	r = 0,999097



Protokol 20

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,4$

Kůže: 13.3.2008

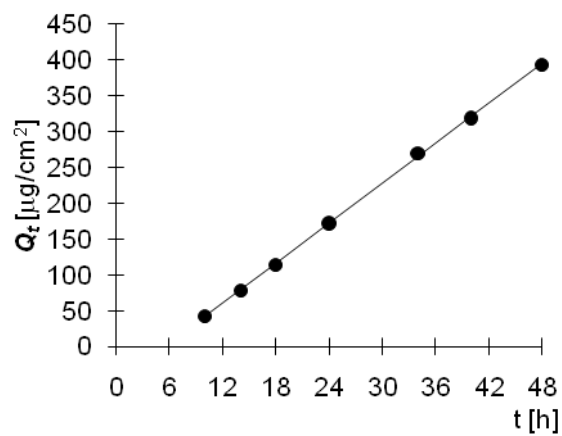
Donor: 1,0%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,461	0,6	0,461	84,8	42,4
14	0,835	0,6	0,850	156,3	78,2
18	1,214	0,6	1,242	228,6	114,3
24	1,827	0,6	1,867	343,6	171,8
34	2,873	0,6	2,934	539,8	269,9
40	3,374	0,6	3,470	638,5	319,2
48	4,161	0,6	4,274	786,4	393,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	42,4	41,8
14	78,2	79,0
18	114,3	116,1
24	171,8	171,9
34	269,9	264,8
40	319,2	320,6
48	393,2	394,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 9,291946
Abs. člen	q = -51,1283
Korelační koef.	r = 0,999832



Protokol 21

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,2$

Kůže: 13.3.2008

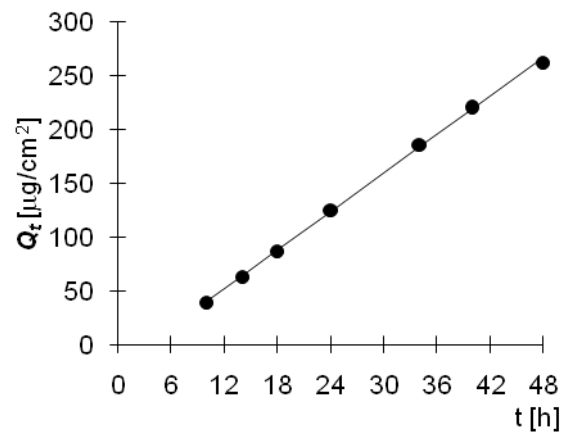
Donor: 0,5%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,433	0,6	0,433	78,9	39,4
14	0,677	0,6	0,691	125,9	62,9
18	0,929	0,6	0,952	173,2	86,6
24	1,346	0,6	1,377	250,6	125,3
34	2,000	0,6	2,045	372,2	186,1
40	2,361	0,6	2,429	442,1	221,0
48	2,801	0,6	2,881	524,3	262,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	39,4	40,2
14	62,9	64,0
18	86,6	87,8
24	125,3	123,5
34	186,1	183,0
40	221,0	218,7
48	262,2	266,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 5,947706
Abs.	q = -19,2293
Korelační koef.	r = 0,999546



Protokol 22

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,8$

Kůže: 13.3.2008

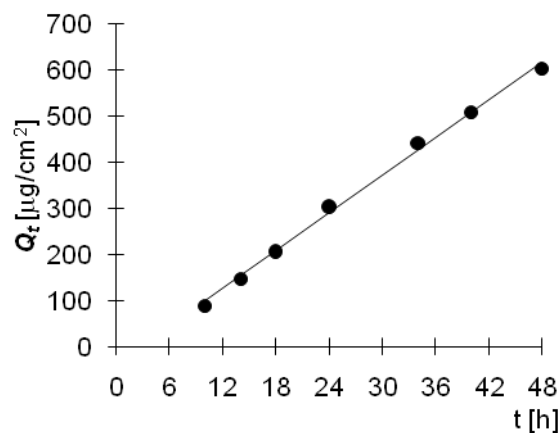
Donor: 0,5%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,957	0,6	0,957	179,9	89,9
14	1,546	0,6	1,576	296,4	148,2
18	2,155	0,6	2,205	414,5	207,3
24	3,173	0,6	3,244	609,8	304,9
34	4,600	0,6	4,703	884,2	442,1
40	5,261	0,6	5,411	1 017,3	508,6
48	6,244	0,6	6,417	1 206,4	603,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	89,9	99,2
14	148,2	153,7
18	207,3	208,3
24	304,9	290,2
34	442,1	426,6
40	508,6	508,5
48	603,2	617,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 13,64535
Abs. člen	q = -37,3027
Korelační koef.	r = 0,998262



Protokol 23

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,0$

Kůže: 13.3.2008

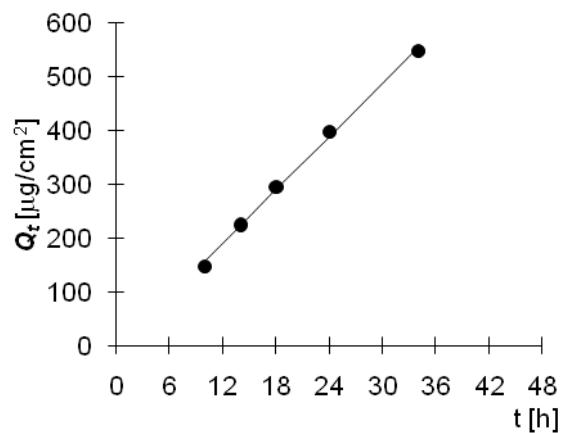
Donor: 0,5%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,654	0,6	1,654	297,7	148,8
14	2,452	0,6	2,508	451,4	225,7
18	3,201	0,6	3,285	591,2	295,6
24	4,307	0,6	4,416	794,9	397,4
34	5,932	0,6	6,079	1 094,3	547,1
40	6,563	0,6	6,765	1 217,8	608,9
48	7,654	0,6	7,880	1 418,4	709,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	148,8	157,7
14	225,7	223,8
18	295,6	289,9
24	397,4	389,0
34	547,1	554,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 16,52261
Abs. člen	q = -7,50883
Korelační koef.	r = 0,998771



Protokol 24

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,3$

Kůže: 13.3.2008

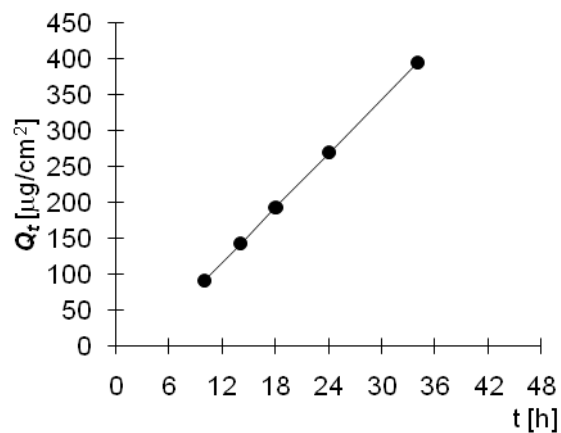
Donor: 0,5%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,988	0,6	0,988	180,9	90,4
14	1,523	0,6	1,556	284,7	142,3
18	2,051	0,6	2,102	384,7	192,4
24	2,871	0,6	2,940	538,1	269,0
34	4,216	0,6	4,312	789,1	394,6
40	4,783	0,6	4,925	901,2	450,6
48	5,643	0,6	5,805	1 062,3	531,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	90,4	91,1
14	142,3	141,8
18	192,4	192,4
24	269,0	268,4
34	394,6	395,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 12,66189
Abs. člen	q = -35,4901
Korelační koef.	r = 0,999988



Protokol 25

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 13.3.2008

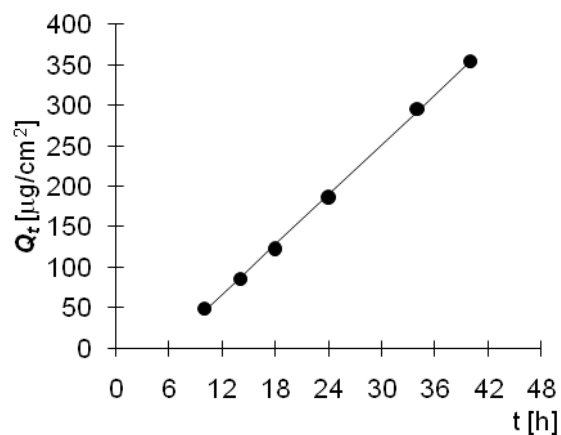
Donor: 0,3%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,604	0,6	0,604	100,2	50,1
14	1,013	0,6	1,035	171,8	85,9
18	1,455	0,6	1,493	247,8	123,9
24	2,197	0,6	2,251	373,7	186,8
34	3,486	0,6	3,568	592,3	296,1
40	4,137	0,6	4,266	708,1	354,1
48	4,833	0,6	4,987	827,8	413,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	50,1	45,6
14	85,9	86,8
18	123,9	127,9
24	186,8	189,7
34	296,1	292,6
40	354,1	354,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 10,29248$
Abs. člen	$q = -57,3368$
Korelační koef.	$r = 0,9996$



Protokol 26

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,2$

Kůže: 13.3.2008

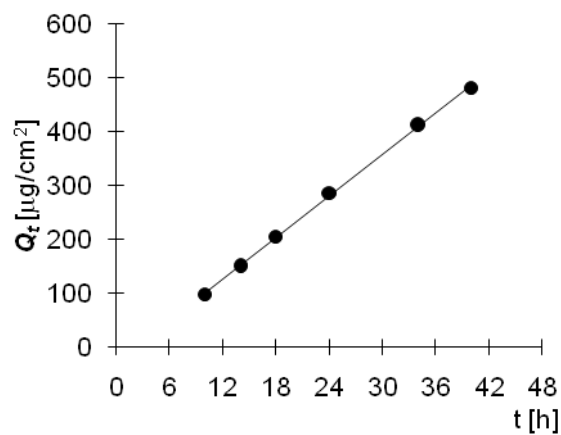
Donor: 0,3%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,077	0,6	1,077	196,0	98,0
14	1,628	0,6	1,664	302,8	151,4
18	2,192	0,6	2,247	408,9	204,5
24	3,072	0,6	3,146	572,6	286,3
34	4,437	0,6	4,540	826,3	413,2
40	5,131	0,6	5,280	961,0	480,5
48	5,981	0,6	6,155	1 120,2	560,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	98,0	101,2
14	151,4	152,5
18	204,5	203,9
24	286,3	280,9
34	413,2	409,2
40	480,5	486,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 12,83479
Abs. člen	q = -27,1736
Korelační koef.	r = 0,999604



Protokol 27

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,2$

Kůže: 13.3.2008

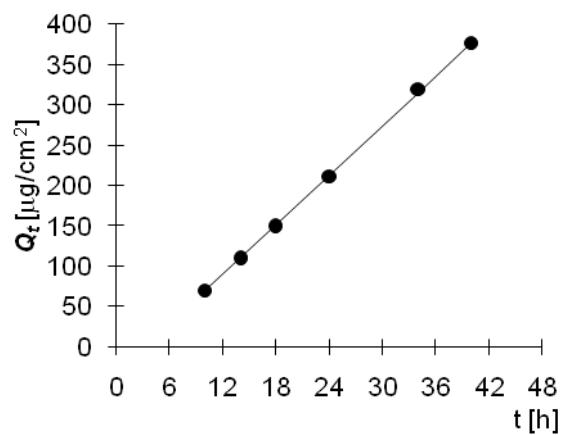
Donor: 0,3%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,868	0,6	0,868	140,6	70,3
14	1,333	0,6	1,365	221,1	110,6
18	1,801	0,6	1,852	299,9	150,0
24	2,541	0,6	2,609	422,7	211,4
34	3,837	0,6	3,934	637,3	318,7
40	4,494	0,6	4,639	751,6	375,8
48	5,271	0,6	5,443	881,8	440,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	70,3	69,3
14	110,6	110,3
18	150,0	151,4
24	211,4	212,9
34	318,7	315,6
40	375,8	377,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 10,26327
Abs. člen	q = -33,3709
Korelační koef.	r = 0,999882



Protokol 28

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,3$

Kůže: 13.3.2008

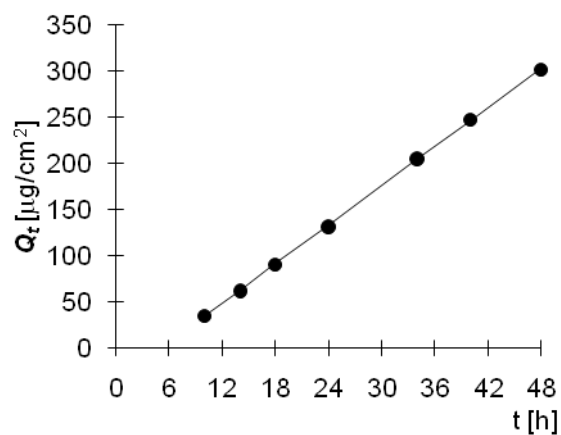
Donor: 0,3%

Měření: P2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,437	0,6	0,437	71,2	35,6
14	0,747	0,6	0,763	124,3	62,1
18	1,082	0,6	1,110	181,0	90,5
24	1,577	0,6	1,617	263,6	131,8
34	2,460	0,6	2,519	410,6	205,3
40	2,946	0,6	3,038	495,3	247,6
48	3,587	0,6	3,699	602,9	301,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	35,6	34,5
14	62,1	62,8
18	90,5	91,0
24	131,8	133,3
34	205,3	203,9
40	247,6	246,3
48	301,5	302,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 7,05799
Abs. člen	q = -36,0618
Korelační koef.	r = 0,999921



Protokol 29

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,4$

Kůže: 13.3.2008

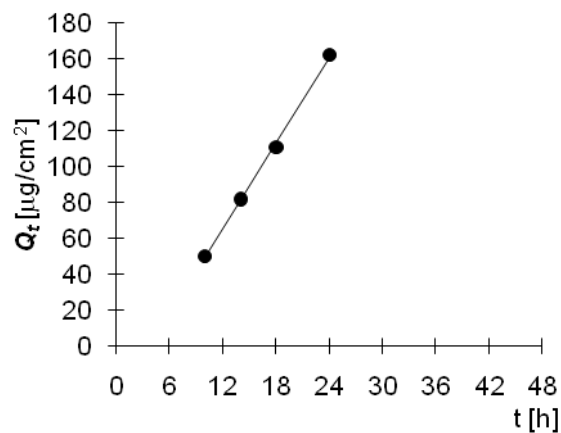
Donor: 0,0%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,611	0,6	0,611	100,2	50,1
14	0,976	0,6	0,998	163,7	81,8
18	1,312	0,6	1,348	221,1	110,5
24	1,926	0,6	1,975	323,9	162,0
34	3,039	0,6	3,111	510,3	255,1
40	3,719	0,6	3,833	628,6	314,3
48	4,667	0,6	4,807	788,3	394,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	50,1	49,5
14	81,8	81,3
18	110,5	113,0
24	162,0	160,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 7,945137
Abs. člen	q = -29,9814
Korelační koef.	r = 0,99937



Protokol 30

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,8$

Kůže: 13.3.2008

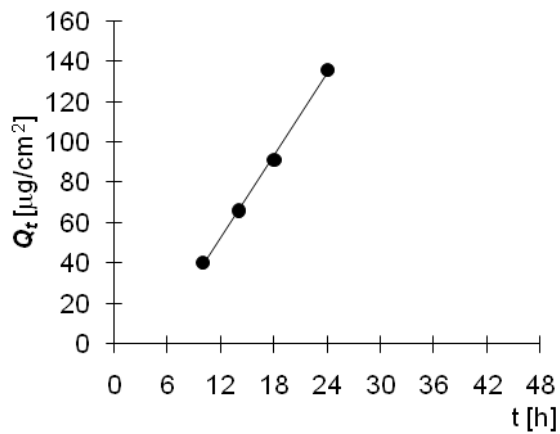
Donor: 0,0%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,481	0,6	0,481	80,8	40,4
14	0,770	0,6	0,788	132,3	66,2
18	1,057	0,6	1,085	182,2	91,1
24	1,577	0,6	1,616	271,5	135,8
34	2,609	0,6	2,667	448,1	224,0
40	3,248	0,6	3,343	561,6	280,8
48	4,080	0,6	4,200	705,6	352,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	40,4	40,4
14	66,2	66,2
18	91,1	91,1
24	135,8	135,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 6,792524
Abs. člen	q = -28,7171
Korelační koef.	r = 0,999044



Protokol 31

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,2$

Kůže: 13.3.2008

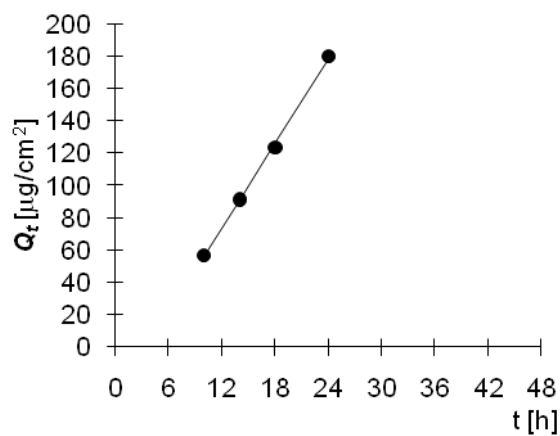
Donor: 0,0%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,627	0,6	0,627	114,1	57,0
14	0,983	0,6	1,004	182,7	91,3
18	1,324	0,6	1,357	247,0	123,5
24	1,933	0,6	1,977	359,9	179,9
34	3,074	0,6	3,139	571,3	285,6
40	3,783	0,6	3,886	707,3	353,7
48	4,749	0,6	4,877	887,6	443,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	57,0	56,1
14	91,3	91,1
18	123,5	126,1
24	179,9	178,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 8,745104
Abs. člen	q = -31,34
Korelační koef.	r = 0,99942



Protokol 32

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,1$

Kůže: 13.3.2008

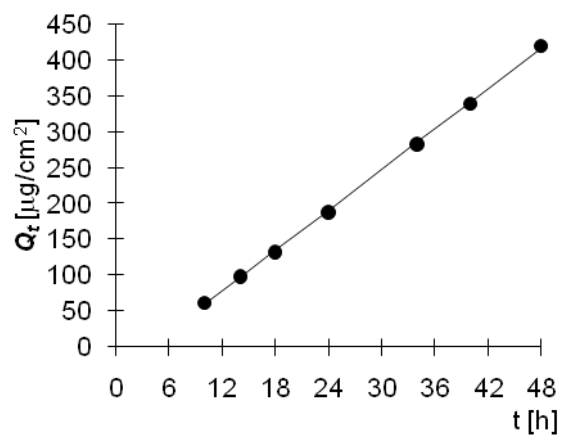
Donor: 0,5%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,726	0,6	0,726	124,2	62,1
14	1,122	0,6	1,147	196,2	98,1
18	1,505	0,6	1,545	264,2	132,1
24	2,142	0,6	2,196	375,5	187,7
34	3,227	0,6	3,304	565,0	282,5
40	3,856	0,6	3,972	679,2	339,6
48	4,766	0,6	4,905	838,7	419,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	62,1	59,1
14	98,1	96,6
18	132,1	134,2
24	187,7	190,5
34	282,5	284,4
40	339,6	340,8
48	419,4	415,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 9,390716
Abs. člen	q = -34,8434
Korelační koef.	r = 0,999809



Protokol 33

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,6$

Kůže: 13.3.2008

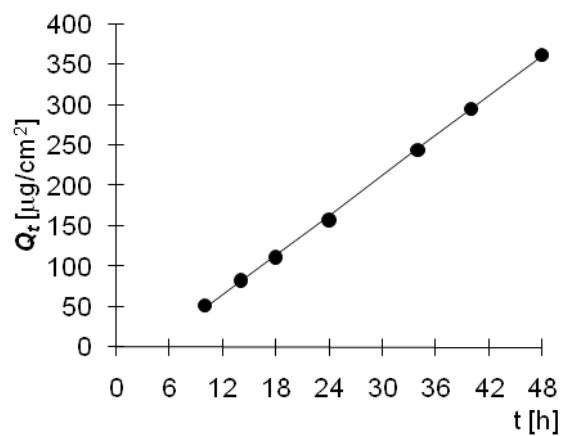
Donor: 0,5%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,561	0,6	0,561	104,3	52,1
14	0,874	0,6	0,892	166,0	83,0
18	1,171	0,6	1,200	223,2	111,6
24	1,654	0,6	1,693	314,8	157,4
34	2,573	0,6	2,627	488,7	244,3
40	3,086	0,6	3,171	589,8	294,9
48	3,783	0,6	3,886	722,7	361,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	52,1	48,4
14	83,0	81,2
18	111,6	113,9
24	157,4	163,0
34	244,3	244,8
40	294,9	294,0
48	361,4	359,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 8,184175
Abs. člen	q = -33,4135
Korelační koef.	r = 0,999638



Protokol 34

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Kůže: 13.3.2008

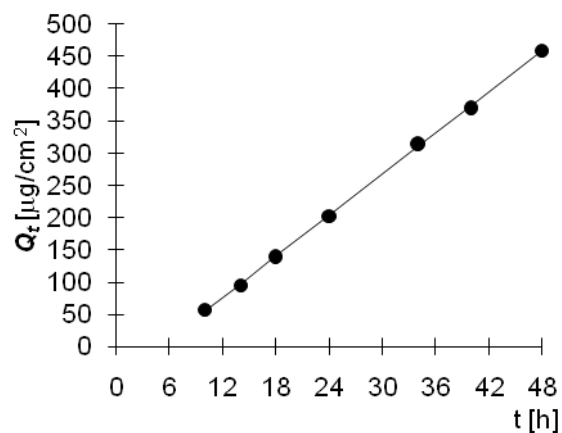
Donor: 0,5%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,626	0,6	0,626	115,1	57,6
14	1,009	0,6	1,029	189,3	94,7
18	1,479	0,6	1,513	278,4	139,2
24	2,147	0,6	2,197	404,2	202,1
34	3,344	0,6	3,416	628,5	314,2
40	3,907	0,6	4,018	739,3	369,7
48	4,846	0,6	4,977	915,7	457,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	57,6	55,0
14	94,7	97,4
18	139,2	139,8
24	202,1	203,3
34	314,2	309,3
40	369,7	372,8
48	457,9	457,6

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 10,59404$
Abs. člen	$q = -50,9184$
Korelační koef.	$r = 0,999813$



Protokol 35

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,2$

Kůže: 13.3.2008

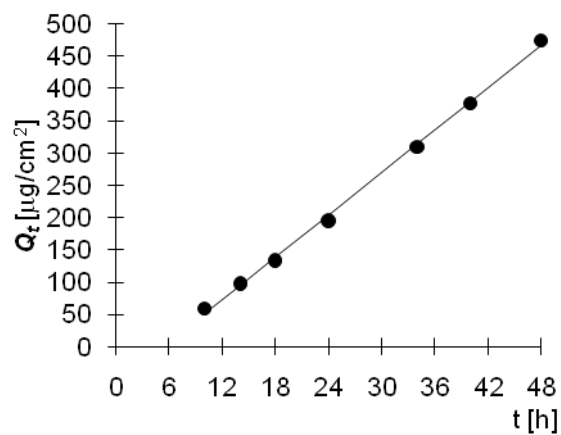
Donor: 0,3%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,740	0,6	0,740	119,8	59,9
14	1,183	0,6	1,210	196,1	98,0
18	1,606	0,6	1,651	267,4	133,7
24	2,353	0,6	2,414	391,1	195,5
34	3,733	0,6	3,822	619,2	309,6
40	4,514	0,6	4,656	754,2	377,1
48	5,680	0,6	5,852	948,1	474,0

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	59,9	51,4
14	98,0	95,0
18	133,7	138,7
24	195,5	204,2
34	309,6	313,4
40	377,1	378,9
48	474,0	466,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 10,91841
Abs. člen	q = -57,8158
Korelační koef.	r = 0,999094



Protokol 36

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,9$

Kůže: 13.3.2008

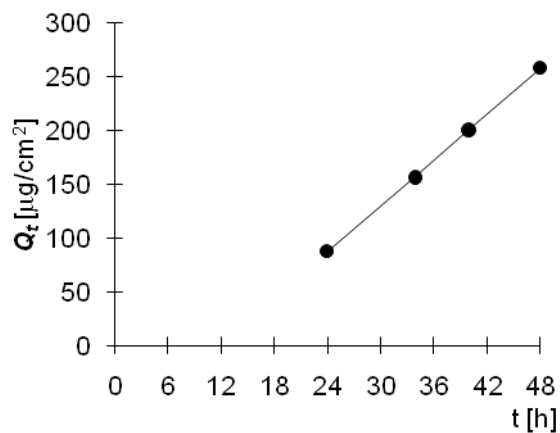
Donor: 0,3%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,271	0,6	0,271	43,1	21,6
14	0,475	0,6	0,485	77,1	38,5
18	0,697	0,6	0,716	113,8	56,9
24	1,086	0,6	1,113	177,0	88,5
34	1,927	0,6	1,969	313,0	156,5
40	2,448	0,6	2,522	401,0	200,5
48	3,151	0,6	3,246	516,1	258,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
24	88,5	87,4
34	156,5	158,2
40	200,5	200,7
48	258,1	257,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 7,076303
Abs. člen	q = -82,3984
Korelační koef.	r = 0,999849



Protokol 37

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,7$

Kůže: 13.3.2008

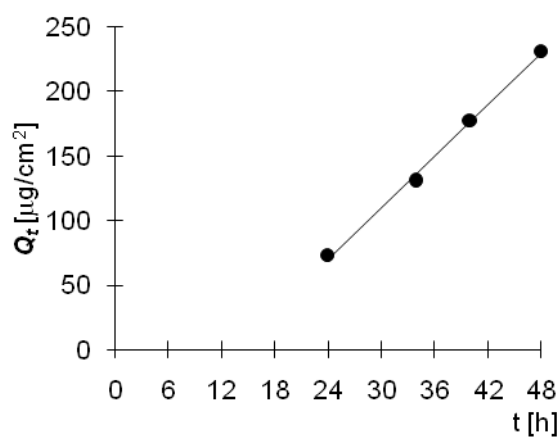
Donor: 0,3%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,186	0,6	0,186	32,9	16,5
14	0,342	0,6	0,348	61,6	30,8
18	0,517	0,6	0,529	93,7	46,8
24	0,809	0,6	0,827	146,4	73,2
34	1,455	0,6	1,483	262,5	131,3
40	1,957	0,6	2,007	355,2	177,6
48	2,545	0,6	2,613	462,4	231,2

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
24	73,2	70,4
34	131,3	136,7
40	177,6	176,5
48	231,2	229,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 6,635903
Abs. člen	q = -88,8887
Korelační koef.	r = 0,998464



Protokol 38

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,1$

Kůže: 13.3.2008

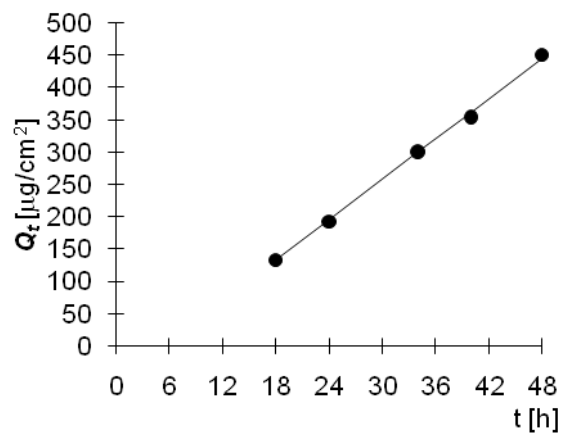
Donor: 0,3%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,798	0,6	0,798	128,4	64,2
14	1,205	0,6	1,235	198,8	99,4
18	1,619	0,6	1,665	268,1	134,1
24	2,338	0,6	2,400	386,5	193,2
34	3,647	0,6	3,736	601,5	300,8
40	4,258	0,6	4,397	707,9	354,0
48	5,423	0,6	5,587	899,5	449,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
18	134,1	131,9
24	193,2	194,5
34	300,8	298,9
40	354,0	361,5
48	449,8	445,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 10,43631
Abs. člen	q = -55,9511
Korelační koef.	r = 0,999294



Protokol 39

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,3$

Kůže: 13.3.2008

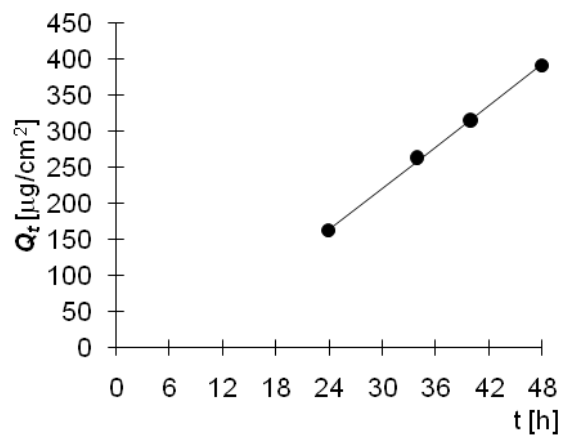
Donor: 0,7%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,592	0,6	0,592	108,3	54,2
14	0,928	0,6	0,947	173,3	86,7
18	1,233	0,6	1,264	231,4	115,7
24	1,736	0,6	1,778	325,3	162,6
34	2,822	0,6	2,880	527,1	263,6
40	3,358	0,6	3,452	631,8	315,9
48	4,170	0,6	4,284	783,9	391,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
24	162,6	164,6
34	263,6	259,7
40	315,9	316,8
48	391,9	392,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 9,514639
Abs. člen	q = -63,7715
Korelační koef.	r = 0,999636



Protokol 40

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,0$

Kůže: 13.3.2008

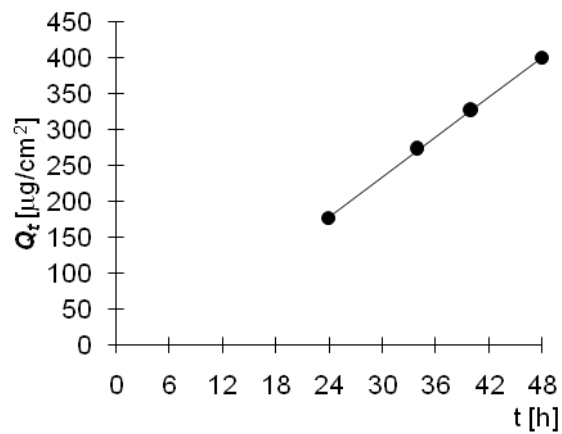
Donor: 0,7%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,800	0,6	0,800	128,0	64,0
14	1,197	0,6	1,227	196,3	98,2
18	1,549	0,6	1,595	255,3	127,6
24	2,153	0,6	2,213	354,0	177,0
34	3,342	0,6	3,425	548,1	274,0
40	3,966	0,6	4,094	655,0	327,5
48	4,840	0,6	4,993	799,0	399,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
24	177,0	178,8
34	274,0	271,4
40	327,5	326,9
48	399,5	401,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 9,258785
Abs. člen	q = -43,4309
Korelační koef.	r = 0,999756



Protokol 41

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,0$

Kůže: 13.3.2008

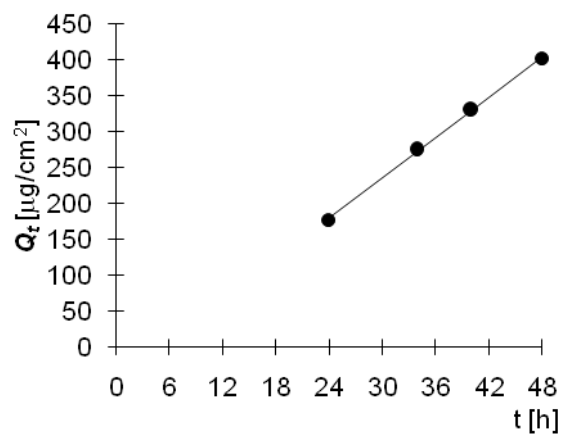
Donor: 0,7%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,710	0,6	0,710	113,5	56,8
14	1,095	0,6	1,122	179,5	89,8
18	1,465	0,6	1,507	241,2	120,6
24	2,172	0,6	2,229	356,6	178,3
34	3,374	0,6	3,457	553,2	276,6
40	4,013	0,6	4,143	662,9	331,4
48	4,865	0,6	5,021	803,3	401,7

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
24	178,3	180,6
34	276,6	273,7
40	331,4	329,6
48	401,7	404,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 9,312421
Abs. člen	q = -42,9078
Korelační koef.	r = 0,999569



Protokol 42

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,0$

Kůže: 13.3.2008

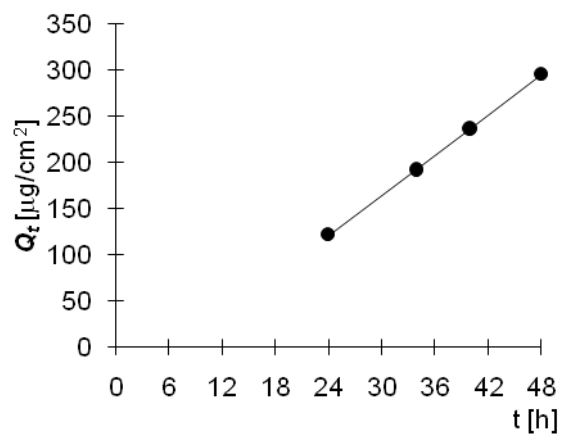
Donor: 0,7%

Měření: P3

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,441	0,6	0,441	79,4	39,7
14	0,686	0,6	0,700	126,1	63,0
18	0,916	0,6	0,940	169,2	84,6
24	1,330	0,6	1,362	245,1	122,6
34	2,089	0,6	2,134	384,2	192,1
40	2,560	0,6	2,631	473,7	236,8
48	3,195	0,6	3,283	591,0	295,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
24	122,6	121,6
34	192,1	193,7
40	236,8	237,0
48	295,5	294,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 7,213953
Abs. člen	q = -51,5692
Korelační koef.	r = 0,999869



Protokol 43

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,4$

Kůže: 13.3.2008

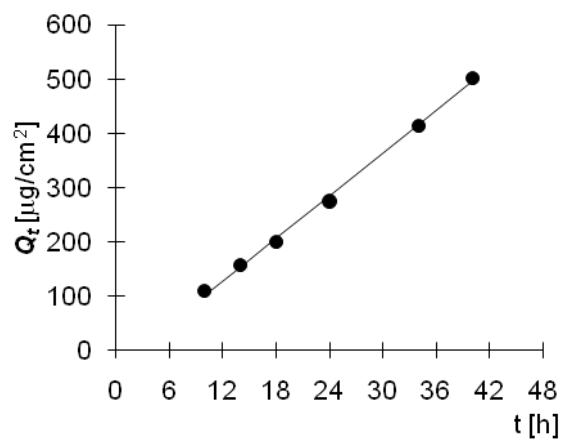
Donor: 0,0%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,357	0,6	1,357	222,5	111,3
14	1,873	0,6	1,923	315,3	157,7
18	2,387	0,6	2,457	403,0	201,5
24	3,276	0,6	3,366	552,0	276,0
34	4,933	0,6	5,056	829,3	414,6
40	5,932	0,6	6,117	1 003,2	501,6
48	6,529	0,6	6,753	1 107,5	553,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	111,3	103,2
14	157,7	155,4
18	201,5	207,6
24	276,0	285,8
34	414,6	416,2
40	501,6	494,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 13,03975
Abs. člen	q = -27,1489
Korelační koef.	r = 0,998903



Protokol 44

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 13.3.2008

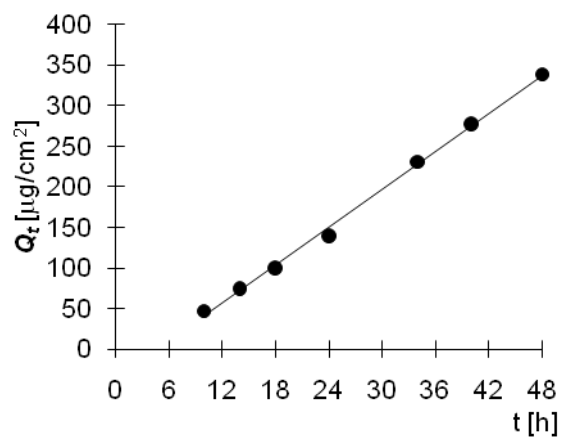
Donor: 0,0%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,574	0,6	0,574	95,3	47,7
14	0,878	0,6	0,899	149,2	74,6
18	1,176	0,6	1,208	200,6	100,3
24	1,642	0,6	1,685	279,8	139,9
34	2,713	0,6	2,774	460,5	230,2
40	3,236	0,6	3,336	553,8	276,9
48	3,943	0,6	4,064	674,6	337,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	47,7	47,7
14	74,6	74,6
18	100,3	100,3
24	139,9	139,9
34	230,2	230,2
40	276,9	276,9
48	337,3	337,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 7,759281
Abs. člen	q = -35,986
Korelační koef.	r = 0,998818



Protokol 45

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,4$

Kůže: 13.3.2008

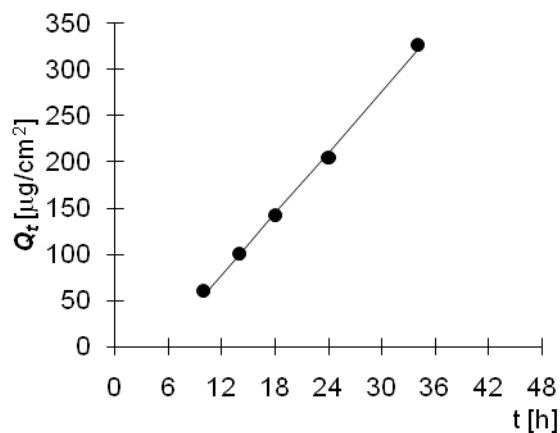
Donor: 0,0%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,698	0,6	0,698	121,4	60,7
14	1,134	0,6	1,158	201,5	100,7
18	1,589	0,6	1,629	283,4	141,7
24	2,296	0,6	2,352	409,3	204,7
34	3,664	0,6	3,745	651,6	325,8
40	4,143	0,6	4,272	743,3	371,6
48	5,460	0,6	5,608	975,7	487,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	60,7	56,4
14	100,7	100,5
18	141,7	144,7
24	204,7	210,9
34	325,8	321,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 11,03701
Abs. člen	q = -54,0111
Korelační koef.	r = 0,998982



Protokol 46

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,6$

Kůže: 13.3.2008

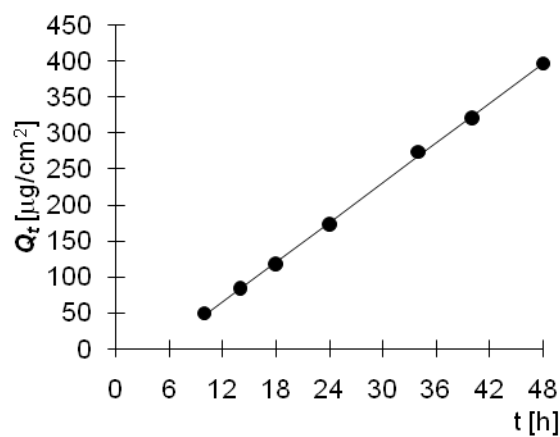
Donor: 1,0%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,539	0,6	0,539	100,2	50,1
14	0,888	0,6	0,905	168,3	84,2
18	1,238	0,6	1,267	235,7	117,8
24	1,818	0,6	1,859	345,7	172,9
34	2,880	0,6	2,940	546,9	273,5
40	3,351	0,6	3,445	640,8	320,4
48	4,145	0,6	4,256	791,6	395,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	50,1	47,5
14	84,2	84,2
18	117,8	120,9
24	172,9	175,9
34	273,5	267,6
40	320,4	322,6
48	395,8	396,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 7$
Flux	$J = 9,171953$
Abs. člen	$q = -44,237$
Korelační koef.	$r = 0,999683$



Protokol 47

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 13.3.2008

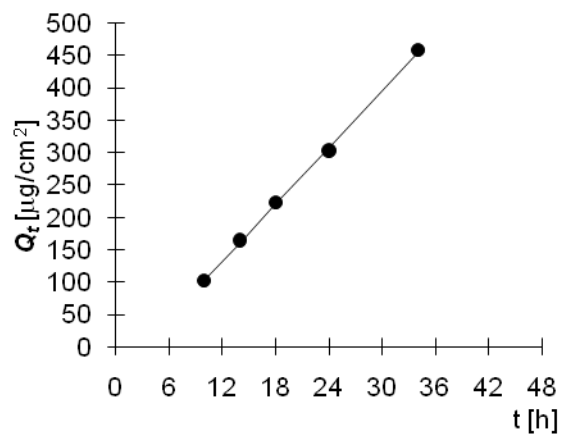
Donor: 1,0%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,238	0,6	1,238	205,5	102,7
14	1,939	0,6	1,984	329,3	164,6
18	2,618	0,6	2,690	446,5	223,3
24	3,545	0,6	3,642	604,6	302,3
34	5,377	0,6	5,509	914,5	457,2
40	5,661	0,6	5,861	972,8	486,4
48	7,214	0,6	7,426	1 232,7	616,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	102,7	103,8
14	164,6	162,3
18	223,3	220,8
24	302,3	308,5
34	457,2	454,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 14,62726
Abs. člen	q = -42,5094
Korelační koef.	r = 0,999616



Protokol 48

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 13.3.2008

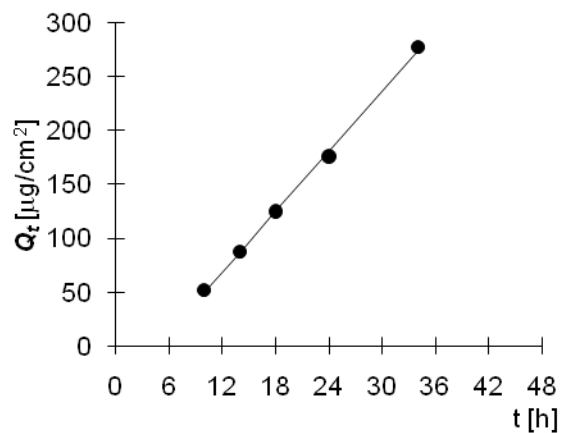
Donor: 1,0%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,593	0,6	0,593	104,4	52,2
14	0,978	0,6	0,998	175,7	87,9
18	1,388	0,6	1,422	250,3	125,1
24	1,950	0,6	1,999	351,8	175,9
34	3,085	0,6	3,153	555,0	277,5
40	3,277	0,6	3,385	595,7	297,8
48	4,437	0,6	4,552	801,2	400,6

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	52,2	50,3
14	87,9	87,6
18	125,1	125,0
24	175,9	181,1
34	277,5	274,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 9,343779
Abs. člen	q = -43,1679
Korelační koef.	r = 0,999359



Protokol 49

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,0$

Kůže: 13.3.2008

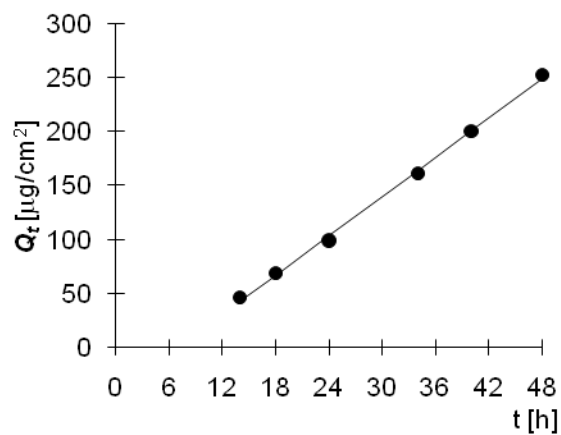
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,336	0,6	0,336	53,8	26,9
14	0,567	0,6	0,580	92,8	46,4
18	0,839	0,6	0,860	137,6	68,8
24	1,202	0,6	1,234	197,5	98,7
34	1,973	0,6	2,019	323,1	161,5
40	2,432	0,6	2,508	401,2	200,6
48	3,060	0,6	3,154	504,7	252,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
14	46,4	43,0
18	68,8	67,3
24	98,7	103,7
34	161,5	164,4
40	200,6	200,8
48	252,3	249,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 6,066414
Abs. člen	q = -41,8962
Korelační koef.	r = 0,999144



Protokol 50

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,4$

Kůže: 13.3.2008

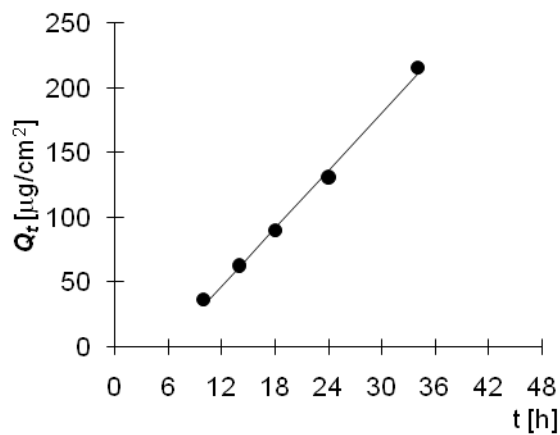
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,447	0,6	0,447	73,4	36,7
14	0,751	0,6	0,767	125,8	62,9
18	1,068	0,6	1,096	179,7	89,8
24	1,555	0,6	1,595	261,6	130,8
34	2,568	0,6	2,626	430,7	215,3
40	2,826	0,6	2,922	479,2	239,6
48	3,966	0,6	4,073	667,9	333,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	36,7	32,9
14	62,9	62,6
18	89,8	92,3
24	130,8	136,8
34	215,3	211,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 7,425522
Abs. člen	q = -41,4025
Korelační koef.	r = 0,998066



Protokol 51

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,8$

Kůže: 13.3.2008

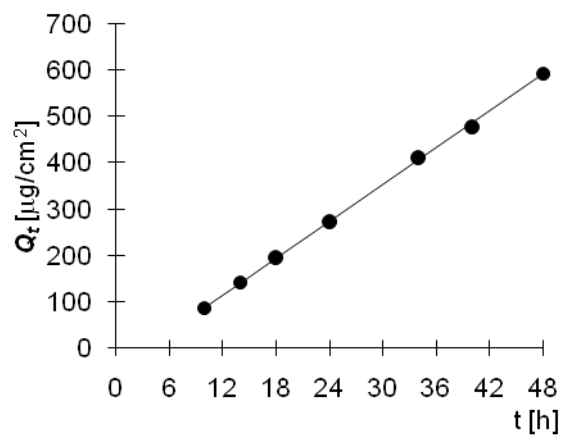
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,087	0,6	1,087	171,8	85,9
14	1,736	0,6	1,777	280,8	140,4
18	2,395	0,6	2,463	389,1	194,5
24	3,357	0,6	3,450	545,1	272,6
34	5,083	0,6	5,214	823,9	411,9
40	5,862	0,6	6,060	957,4	478,7
48	7,277	0,6	7,507	1 186,1	593,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	85,9	87,3
14	140,4	140,4
18	194,5	193,5
24	272,6	273,1
34	411,9	405,8
40	478,7	485,5
48	593,1	591,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 13,27274
Abs. člen	q = -45,4536
Korelační koef.	r = 0,999793



Protokol 52

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,4$

Kůže: 13.3.2008

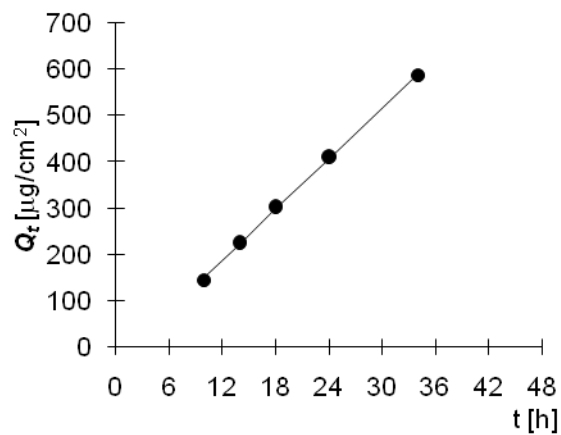
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,576	0,6	1,576	290,1	145,0
14	2,398	0,6	2,449	450,7	225,3
18	3,216	0,6	3,296	606,5	303,2
24	4,355	0,6	4,462	821,0	410,5
34	6,219	0,6	6,365	1 171,1	585,6
40	6,915	0,6	7,123	1 310,6	655,3
48	8,653	0,6	8,885	1 634,9	817,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	145,0	151,2
14	225,3	224,3
18	303,2	297,4
24	410,5	407,0
34	585,6	589,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 18,26994
Abs. člen	q = -31,4681
Korelační koef.	r = 0,999561



Protokol 53

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,0$

Kůže: 13.3.2008

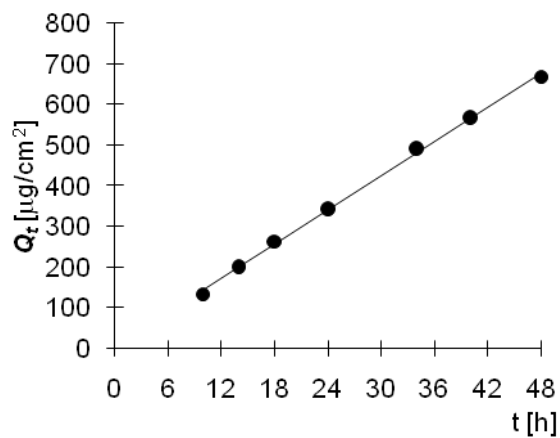
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,684	0,6	1,684	269,5	134,7
14	2,470	0,6	2,533	405,3	202,6
18	3,196	0,6	3,291	526,6	263,3
24	4,184	0,6	4,308	689,2	344,6
34	6,008	0,6	6,169	987,1	493,6
40	6,883	0,6	7,114	1 138,2	569,1
48	8,088	0,6	8,355	1 336,8	668,4

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	134,7	145,7
14	202,6	201,8
18	263,3	258,0
24	344,6	342,2
34	493,6	482,6
40	569,1	566,9
48	668,4	679,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 14,03984
Abs. člen	q = 5,268511
Korelační koef.	r = 0,999172



Protokol 54

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,2$

Kůže: 13.3.2008

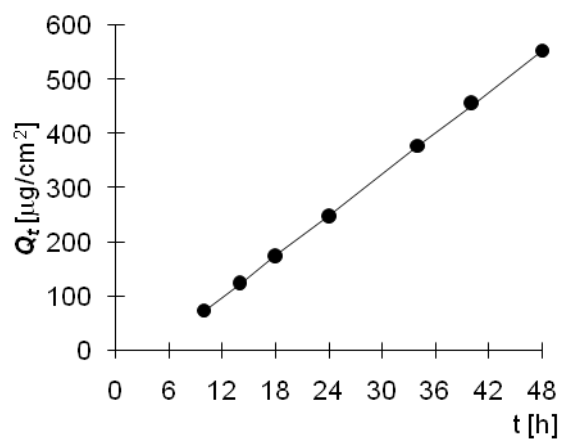
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	0,830	0,6	0,830	151,1	75,5
14	1,356	0,6	1,383	251,8	125,9
18	1,878	0,6	1,924	350,2	175,1
24	2,674	0,6	2,738	498,3	249,1
34	4,056	0,6	4,146	754,6	377,3
40	4,893	0,6	5,030	915,5	457,7
48	5,906	0,6	6,071	1 105,0	552,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	75,5	74,8
14	125,9	125,3
18	175,1	175,8
24	249,1	251,5
34	377,3	377,8
40	457,7	453,5
48	552,5	554,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 12,6263
Abs. člen	q = -51,5101
Korelační koef.	r = 0,999925



Protokol 55

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,1$

Kůže: 13.3.2008

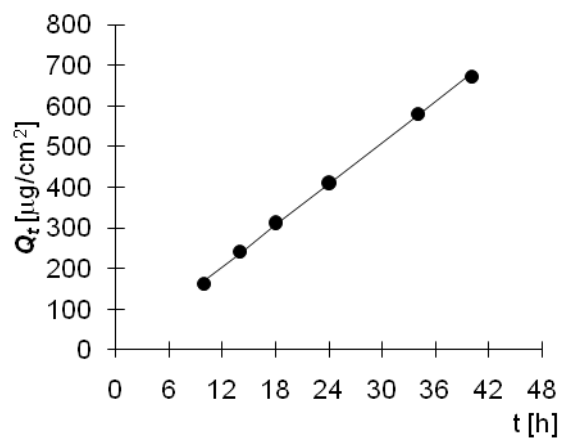
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,175	0,6	1,175	189,1	94,6
14	1,831	0,6	1,875	301,8	150,9
18	2,469	0,6	2,539	408,8	204,4
24	3,349	0,6	3,443	554,4	277,2
34	4,975	0,6	5,103	821,6	410,8
40	5,904	0,6	6,094	981,1	490,5
48	7,304	0,6	7,531	1 212,6	606,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	162,4	170,9
14	240,5	238,5
18	311,5	306,0
24	410,8	407,4
34	580,5	576,3
40	670,9	677,6

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 6$
Flux	$J = 16,89066$
Abs. člen	$q = 1,991951$
Korelační koef.	$r = 0,999534$



Protokol 56

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 13.3.2008

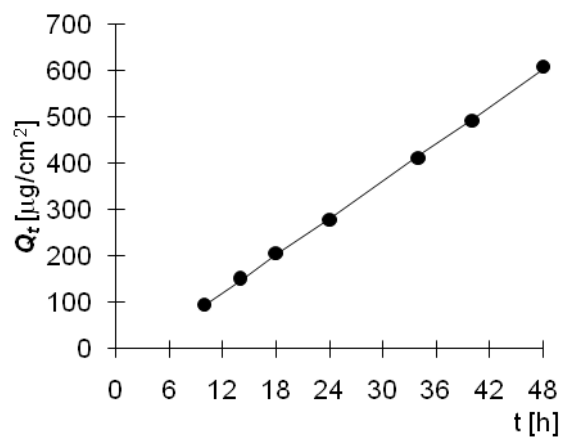
Donor: 0,7%

Měření: P4

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
10	1,957	0,6	1,957	324,8	162,4
14	2,827	0,6	2,897	480,9	240,5
18	3,649	0,6	3,753	623,1	311,5
24	4,814	0,6	4,950	821,6	410,8
34	6,816	0,6	6,995	1 161,1	580,5
40	7,830	0,6	8,083	1 341,7	670,9
48	9,170	0,6	9,462	1 570,7	785,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
10	94,6	94,9
14	150,9	148,1
18	204,4	201,3
24	277,2	281,2
34	410,8	414,3
40	490,5	494,2
48	606,3	600,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 7
Flux	J = 13,31003
Abs. člen	q = -38,2318
Korelační koef.	r = 0,999788



6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jako akceptorové médium byl zvolen TRIS pufr (pH 7,1), který svým složením představuje kompromis mezi požadavkem na intaktnost vůči kožním štěpům (při jejich současné konzervaci diazolidinylureou) a dále mezi požadavkem neinterferovat v UV oblasti se stanovovaným léčivem. Tento pufr se již osvědčil během předchozích experimentů na katedře farmaceutické technologie FaF UK.

Kofein byl ve zkoumaných krémech použit v takovém množství, aby po dobu nejméně 48 hodin byla zajištěna dostatečná koncentrace jeho difuzibilní formy.

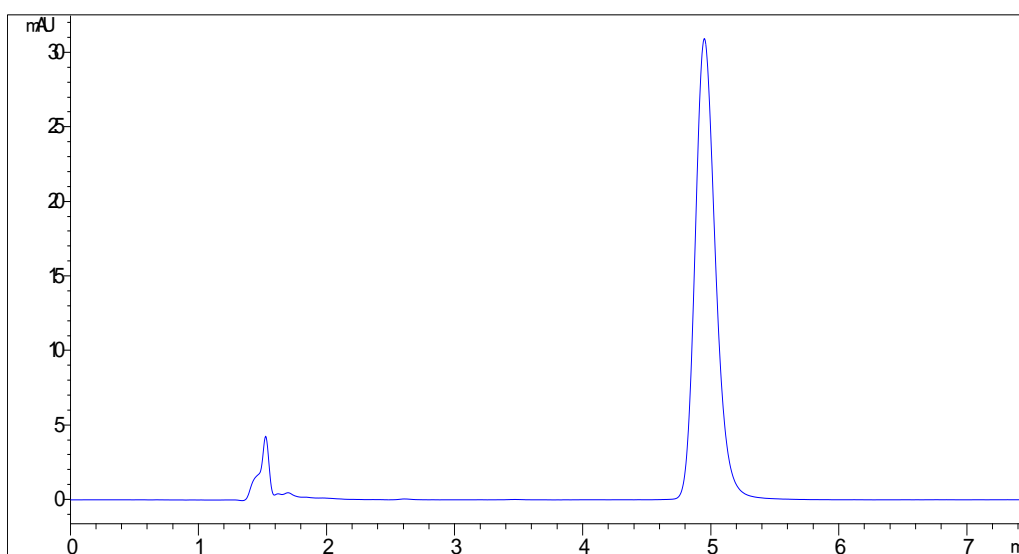
Sestava použitá pro permeační pokusy byla taktéž již dříve ověřena používáním na katedře farmaceutické technologie FaF UK.

Analytická metodika vyhovuje požadavkům na rychlé, sériové HPLC stanovení kofeinu v akceptorové fázi permeačních pokusů.

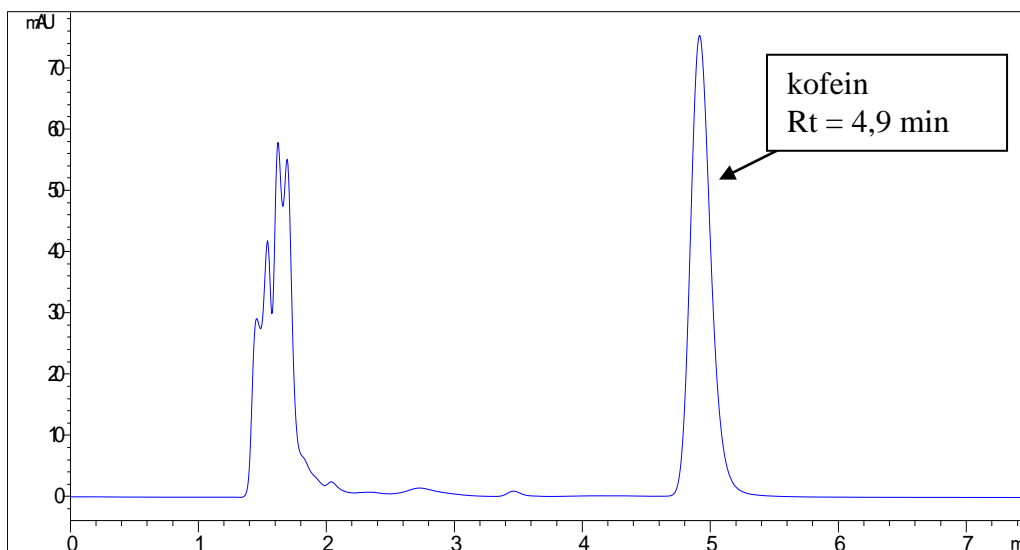
Zvolená mobilní fáze ve složení voda:methanol 75:25 s 0,2 % kyseliny mravenčí se ukázala vyhovující z hlediska dobré separace píků. Před každým novým naplněním do chromatografické soustavy byla odplyněna na ultrazvukové lázni po dobu 10–15 minut, což se ukázalo jako dostatečné.

Použité chromatografické podmínky zajistily dobrou separaci píku kofeinu v retenčních časech okolo 4,9 minut, jak ukazují grafy 1 a 2, v němž je navíc při použité vlnové délce (272 nm) patrný balastní pík vehikula.

Graf 1: Chromatogram standardního roztoku kofeinu (0,47 mg/100ml)

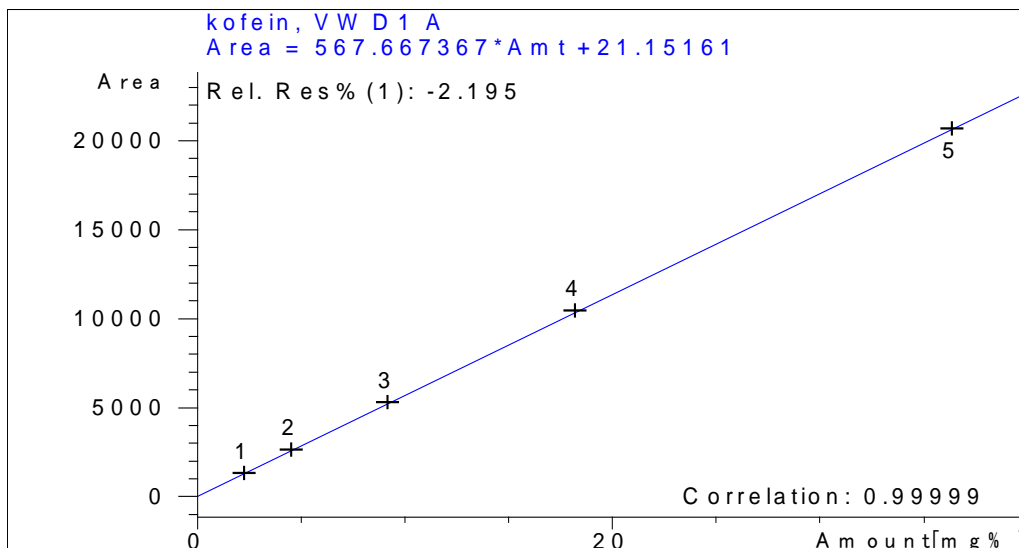


Graf 2: Chromatogram vzorku odebraného v 10. hodině, série měření P1, protokol č.1



Vhodnost takto optimalizovaných podmínek stanovení kofeinu dokládají i výsledky kalibračních měření (graf 3).

Graf 3: Kalibrační závislost kofeinu v akceptorovém médiu (TRIS pufr pH 7,1)



Z údajů získaných pomocí HPLC byly sestaveny průběhy permeace stanovovaného kofeinu v čase, za použití šablony pro korekci odebraných a doplněných objemů akceptorové fáze²⁶ (viz část DOKUMENTACE, protokoly 1–56).

V každém takto sestaveném průběhu byl nalezen lineární úsek ustálené permeace, z něhož byl vyčíslen flux kofeinu. Hledání úseku ustálené permeace bylo většinou bezproblémové, jen v některých případech bylo nutné vypustit krajní hodnoty, které vybočovaly z lineárního průběhu či vyloučit hodnoty výrazně vybočující pravděpodobně z důvodu experimentální chyby.

Hlavním sledovaným parametrem permeačních pokusů byl zvolen **flux (J)** kofeinu [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]. Hodnoty fluxů jsou různé podle použitého kožního štěpu, což souvisí s faktem, že transdermální permeace látek je ovlivněna individuálními vlastnostmi kůže. Přesto byl **průměr fluxů (Jr)** v první fázi zpracování výsledků spočítán ze všech naměřených hodnot, bez ohledu na použitou kůži.

Pro první sérii měření (P1) byly použity kožní štěpy zpracované dne 11.1. 2008, pro další série měření (P2, P3, P4) ze dne 13.3. 2008.

Hodnoty fluxů (J) z jednotlivých sérií měření, jejich průměry (Jr) a směrodatné odchylky (σ) jsou shrnuty v tabulkách 1–4.

Tab. 1: Hodnoty fluxů (J), jejich průměry (Jr) a směrodatné odchylky (σ) ze série měření P1

série měření	číslo protokolu	kůže	konc.T12 (%)	J	Jr	σ J
P1	1	11.1.2008	0,00%	18,608	18,002	2,697
P1	2	11.1.2008	0,00%	14,438		
P1	3	11.1.2008	0,00%	20,960		
P1	4	11.1.2008	1,00%	31,345	23,401	6,822
P1	5	11.1.2008	1,00%	24,172		
P1	6	11.1.2008	1,00%	14,687		
P1	7	11.1.2008	0,50%	15,641	14,389	1,466
P1	8	11.1.2008	0,50%	14,290		
P1	9	11.1.2008	0,50%	15,596		
P1	10	11.1.2008	0,50%	12,029		
P1	11	11.1.2008	0,30%	16,069	12,009	2,556
P1	12	11.1.2008	0,30%	11,880		
P1	13	11.1.2008	0,30%	11,021		
P1	14	11.1.2008	0,30%	9,067		

Tab. 2: Hodnoty fluxů (J), jejich průměry (Jr) a směrodatné odchylky (σ) ze série měření P2

série měření	číslo protokolu	kůže	konc.T12 (%)	J	Jr	σ J
P2	15	13.3.2008	0,00%	6,351	6,042	0,565
P2	16	13.3.2008	0,00%	6,526		
P2	17	13.3.2008	0,00%	5,250		
P2	18	13.3.2008	1,00%	9,777	10,121	0,853
P2	19	13.3.2008	1,00%	11,294		
P2	20	13.3.2008	1,00%	9,292		
P2	21	13.3.2008	0,50%	5,948	12,194	3,876
P2	22	13.3.2008	0,50%	13,645		
P2	23	13.3.2008	0,50%	16,523		
P2	24	13.3.2008	0,50%	12,662		
P2	25	13.3.2008	0,30%	10,292	10,112	2,049
P2	26	13.3.2008	0,30%	12,835		
P2	27	13.3.2008	0,30%	10,263		
P2	28	13.3.2008	0,30%	7,058		

Tab. 3: Hodnoty fluxů (J), jejich průměry (Jr) a směrodatné odchylky (σ) ze série měření P3

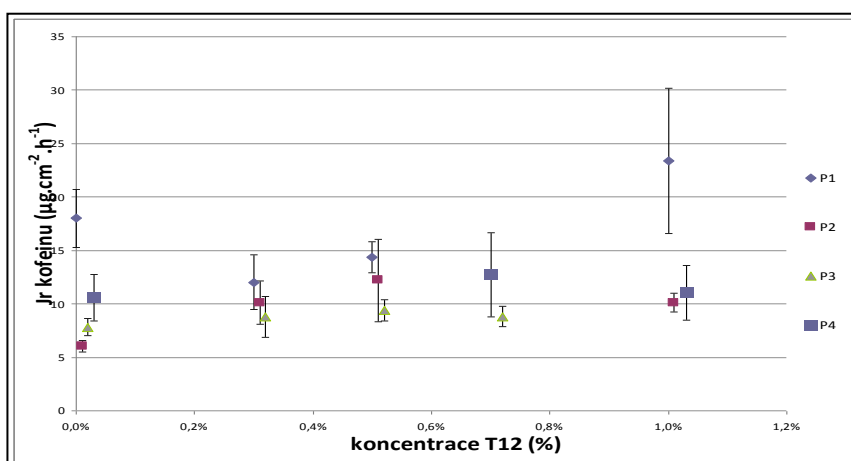
série měření	číslo protokolu	kůže	konc.T12 (%)	J	Jr	σ J
P3	29	13.3.2008	0,00%	7,95	7,828	0,801
P3	30	13.3.2008	0,00%	6,79		
P3	31	13.3.2008	0,00%	8,75		
P3	32	13.3.2008	0,50%	9,39	9,390	0,984
P3	33	13.3.2008	0,50%	8,18		
P3	34	13.3.2008	0,50%	10,59		
P3	35	13.3.2008	0,30%	10,92	8,767	1,925
P3	36	13.3.2008	0,30%	7,08		
P3	37	13.3.2008	0,30%	6,64		
P3	38	13.3.2008	0,30%	10,44		
P3	39	13.3.2008	0,70%	9,51	8,825	0,935
P3	40	13.3.2008	0,70%	9,26		
P3	41	13.3.2008	0,70%	9,31		
P3	42	13.3.2008	0,70%	7,21		

Tab. 4: Hodnoty fluxů (J), jejich průměry (Jr) a směrodatné odchylky (σ) ze série měření P4

série měření	číslo protokolu	kůž	konc.T12 (%)	J	Jr	σ J
P4	43	13.3.2008	0,00%	13,03975	10,61201	2,17659
P4	44	13.3.2008	0,00%	7,759281		
P4	45	13.3.2008	0,00%	11,03701		
P4	46	13.3.2008	1,00%	9,171953	11,04766	2,532126
P4	47	13.3.2008	1,00%	14,62726		
P4	48	13.3.2008	1,00%	9,343779		
P4	49	13.3.2008	0,70%	6,066414	12,73768	3,919501
P4	50	13.3.2008	0,70%	7,425522		
P4	51	13.3.2008	0,70%	13,27274		
P4	52	13.3.2008	0,70%	18,26994		
P4	53	13.3.2008	0,70%	14,03984		
P4	54	13.3.2008	0,70%	12,6263		
P4	55	13.3.2008	0,70%	16,89066		
P4	56	13.3.2008	0,70%	13,31003		

Podle výše uvedených tabulek byly sestaveny grafy. V grafu 4 jsou prezentovány průměry fluxů (Jr) kofeinu odpovídající rozdílným koncentracím T12 z jednotlivých sérií měření.

Graf 4: Průměry fluxů (Jr) kofeinu odpovídající rozdílným koncentracím T12 z jednotlivých sérií měření (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)

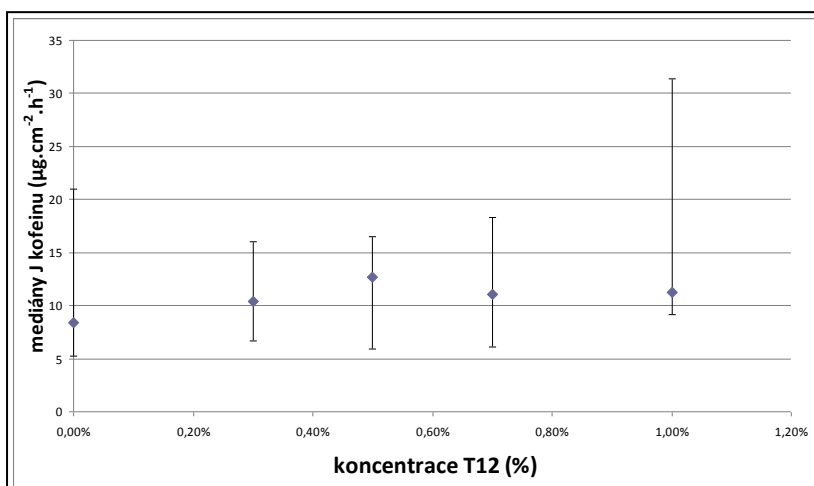


Graf ukazuje na výrazně vyšší hodnotu **Jr** 0% T12 (kontrolní vzorek) z první série měření (P1) ve srovnání s hodnotami **Jr** získanými u vzorků s 0% T12 v ostatních

sériích měření (P2–P4) a u vzorků s 0,3% T12 v téže sérii měření (P1), tato skutečnost byla později zohledněna (viz. graf 6 a graf 7).

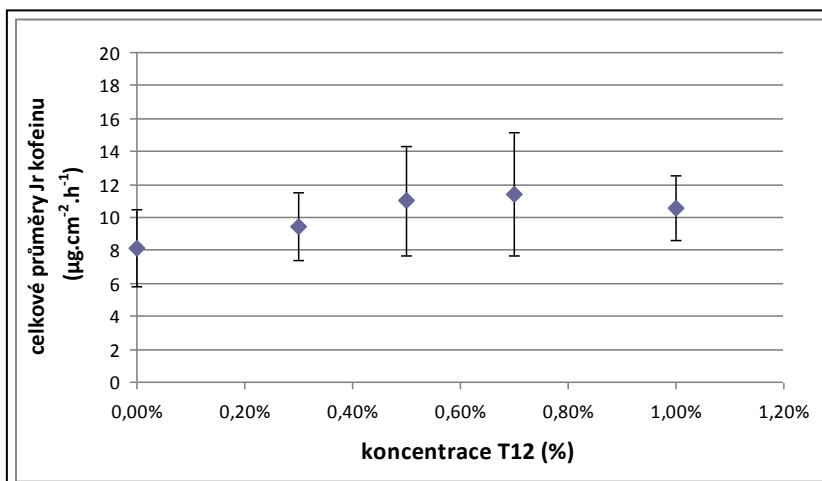
V dalším kroku bylo přistoupeno ke zobrazení závislosti mediánů fluxů kofeinu na jednotlivých koncentracích T12, protože základní výhodou mediánu jako statistického ukazatele je fakt, že není ovlivněn extrémními hodnotami (graf 5).

Graf 5: Mediány fluxů (J) kofeinu odpovídající rozdílným koncentracím T12 ze všech sérií měření (úsečky znárodňují rozpětí dat)

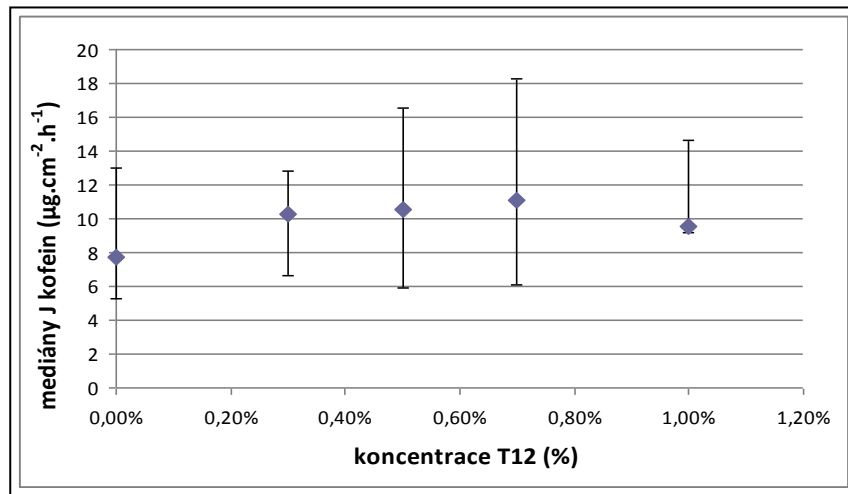


Výrazně vyšší hodnoty J_r u kontrolních vzorků bez T12 (viz graf 4) nás vedly k vyloučení celé série měření P1 (graf 6 a graf 7). Na výsledky série měření P1 mohlo mít vliv to, že kožní štěpy použité při této sérii byly získány na rozdíl od sérií P2, P3, P4 z jiné, starší dodávky ušních boltců s nejasnou historií uchovávání kožních štěpů.

Graf 6: Celkové průměry průměrů fluxů (J_r) kofeinu odpovídající rozdílným koncentracím T12 ze série měření P2, P3 a P4 (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)

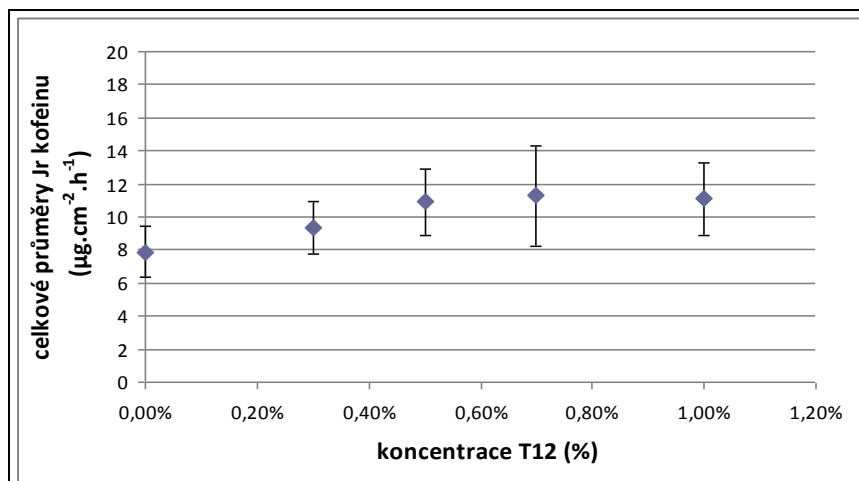


Graf 7: Mediány fluxů (**J**) kofeinu odpovídající rozdílným koncentracím T12 ze série měření P2, P3 a P4 (úsečky znázorňují rozpětí dat)



Variabilita získaných údajů byla stále značná, proto bylo přistoupeno k metodě symetrického odstranění krajních bodů (konkrétně se jednalo o odstranění jednoho maximálního a jednoho minimálního bodu u každé koncentrace T12 (graf 8).

Graf 8: Celkové průměry fluxů (**Jr**) kofeinu odpovídající rozdílným koncentracím T12 ze série měření P2, P3 a P4 po symetrickém odstranění krajních bodů (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)



Takto získaná data byla zpracována nepárovým t-testem v šabloně dostupné v počítačové síti FaF²⁷ do tabulky 5.

Tab. 5: Výsledky nepárových t-testů na hladině významnosti 0,05

(Hypotéza 1: „Průměrná hodnota $Jr(\alpha) \neq Jr(\beta)$ “ prokázána byla (Y), nebyla (N) /

Hypotéza 2: „Průměrná hodnota $Jr(\alpha) > Jr(\beta)$ “ prokázána byla (Y), nebyla (N))

konc. T12	0,30%	0,50%	0,70%	1%
0%	N/N	Y/Y	Y/Y	N/Y
0,30%		N/N	N/N	N/N
0,50%			N/N	N/N
0,70%				N/N

Kromě vzorků s 0,3 a s 1% T12 jsou průměrné fluxy kofeinu Jr vždy statisticky signifikantně vyšší u vzorků s obsahujícími T12 než u kontrolních vzorků bez T12. Vzájemně se však statisticky významně neliší.

Pozn.: Díky selhání termostatu ve vodní lázni po provedení série měření P2 jsem začala podrobněji sledovat teploty v sérii měření P3 a P4, toto je zaznamenáno v tabulce 6 a tabulce 7.

Tab. 6: Teploty vody ve vodní lázni zaznamenané při sérii měření P3

odběr za	10 hodin	14 hodin	18 hodin	24 hodin	34 hodin	40 hodin	48 hodin
teplota při P3	31,0 °C	31,7 °C	30,0 °C	29,7 °C	31,7 °C	31,3 °C	31,1 °C

Tab. 7: Teploty vody ve vodní lázni zaznamenané při sérii měření P4

odběr za	10 hodin	14 hodin	18 hodin	24 hodin	34 hodin	40 hodin	48 hodin
teplota při P4	30,5 °C	32,3 °C	30,1 °C	29,0 °C	31,2 °C	31,3 °C	31,5 °C

Z tabulek je patrné, že teplota v mediu kolísala v rozmezí 29,0–32,3 °C. Protože permeační pokusy mají být prováděny při 32 °C mohou být výsledky tímto faktem do jisté míry ovlivněny.

7 ZÁVĚRY

1. Celkové průměry J_r včetně směrodatných odchylek ze série měření P2, P3 a P4:

$$J_r = 7,88 \pm 1,52 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0\% \text{ T12}$$

$$J_r = 9,34 \pm 1,62 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0,3\% \text{ T12}$$

$$J_r = 10,89 \pm 2,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0,5\% \text{ T12}$$

$$J_r = 11,29 \pm 3,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0,7\% \text{ T12}$$

$$J_r = 11,09 \pm 2,21 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 1\% \text{ T12}$$

2. Pro oleokrém s obsahem 60 % vody byla nalezena maximální akcelerační aktivita T12 při 0,7 %.

3. Hodnoty, ke kterým dospěla Pavla Dvořáková²⁸, zabývající se oleokrémem s 30 % vody: $J_r = 6,29 \pm 0,90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ pro 0% T12

$$J_r = 9,13 \pm 0,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0,3\% \text{ T12}$$

$$J_r = 8,71 \pm 1,91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0,5\% \text{ T12}$$

$$J_r = 10,20 \pm 3,25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 0,7\% \text{ T12}$$

$$J_r = 7,06 \pm 0,81 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ pro } 1\% \text{ T12}$$

4. Maximum akcelerační aktivity T12 bylo nalezeno u krémů s obsahem 0,7% T12 jak u krému s obsahem 60% vody, tak s 30% vody.

5. Podle mého názoru by bylo vhodné budoucí experimenty tohoto typu provádět s větším počtem sérií měření a zároveň dbát na to, aby vzorky obsahující jednotlivé koncentrace T12 byly rovnoměrně rozloženy pro každou sérii měření. Pokud by při vyhodnocování experimentálních podkladů bylo nutné nějakou sérii měření vyloučit, tento fakt by příliš neovlivnil celkový výsledek.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

T12	Transkarbam 12
SC	stratum corneum
DOPA	dihydroxyfenylalanin
HLA	human leucocyte antigens (lidské leukocytární antigeny)
CD 1	diferenciační antigeny (shluk povrchových znaků)
EAK	6-aminohexanová kyselina
J [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]	flux kofeinu
J_r [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]	průměrná hodnota fluxů kofeinu
σ_J	směrodatná odchylka hodnot fluxů
V_o [ml]	celkové množství akceptorového média
ΔV_{dop} [ml]	množství doplňovaného akceptorového média
t [h]	čas
C_{nk} [mg/100ml]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_k [mg/100ml]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
Q_t [μg]	množství permeantu prošlého kožní membránou
Q_t [$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$]	množství permeantu prošlého přes 2 cm ² kožní membrány
n	počet naměřených bodů
r	korelační koeficient
q	absolutní člen
P1 – P4	první až čtvrtá série měření

9 ZDROJE

1. Chalabala, M., Řehula, M., Pešák, M. et al.: Biogalenika, 161–183. In: Komárek, P., Rabišková, M. et al.: Technologie léků. Třetí, přepracované a doplněné vydání. Galén, Praha, 2006, 399 s.
2. Holas, T.: Izosterní analogy transkarbamů, syntéza, vlastnosti a biologická aktivita, Hradec Králové, 2006. Disertační práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře anorganické a organické chemie.
Vedoucí práce: doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
3. Rokyta, R.: Fyziologie kůže, 176–179. In: Rokyta, R. et al.: Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech. 1. vyd. ISV nakladatelství, Praha, 2000, 359 s.
4. <http://www.emla.cz/kuze2.php>; 20.1. 2009
5. Čihák, R.: Anatomie 3. 1.vyd. Grada, Praha, 1997, 655 s.
6. Masopust, J., Průša, R., Bartůňková, J.: Patobiochemie buňky. Česká Společnost klinické biochemie a 2. LF UK, Praha, 2003, 344 s.
7. <http://www.ratbehavior.org/CoatTypes.htm>; 22. 2. 2009
8. Vávrová, K., Hrabálek, A.: Role ceramidů v kůži. Praktické lékařství, 2006; 2: 55–58
9. Krejsek, J., Kopecký, O., Fixa, B.: Kapitoly z lékařské imunologie. Karolinum, Praha, 1992, 75 s.
10. Litvik, R.: Úloha kožní bariéry u atopické dermatitidy. Farmakoterapie, 2008; Supplementum 3 Dermatologie: 11–21

11. Hrabálek, A., Vávrová, K.: Lze překonat kožní bariéru? Praktické lékárenství, 2005; 1: 8–11
12. Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: Biochemie pro studující medicíny II. díl. 1.vyd. Karolinum, Praha, 2005, 562 s.
13. Hořejší, J. (přeložil a redakčně upravil z anglického originálu The Human Body, Marshall Editions Ltd. London): Lidské tělo, srozumitelný a zevrubný průvodce po strukturách a funkcích lidského organismu. 1. vyd. Nakladatelství a vydavatelství cesty, Praha, 1996, 336 s.
14. http://www.soudom.cz/Ucebnice/Kosmetika/Prvni_rocnik/KUZE.pdf; 24.2. 2009
15. Simpson, N.: Treating hyperhidrosis. British medical journal, 296,1988, 1345
16. Kumar, M.G., Lin, S.: Transdermal iontophoresis: impact on skin integrity as evaluated by various methods. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 25 (4), 2008, 381–401
17. Williams, A.C., Barry, B.W.: Skin absorption enhancers. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 9, 1992, 305–353
18. Williams, A.C., Barry, B. W.: Penetration enhancers. Adv. Drug Deliv. Rev., 56, 2004, 603-618
19. Hrabálek, A., Doležal, P., Šklubalová, Z. et al.: Akceleranty transdermální penetrace. Chemické listy, 93, 1999, 107–119
20. Chalabala, M., Rabišková, M., Chalupová, R. et al.: Léky jako aplikační systémy, 191–308. In: Komárek, P., Rabišková, M. et al.: Technologie léků. Třetí, přepracované a doplněné vydání. Galén, Praha, 2006, 399 s.

21. Hrabálek, A., Doležal, P., Vávrová, K.: Historie a současný stav ve vývoji akceleračních transdermálních permeací na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové – od esterů 6-aminohexanové kyseliny k transkarbamům (I.část). Praktické lékařství, 2007; 2: 90–92
22. Holas, T., Vávrová, K., Šíma, M. et al.: Synthesis and transdermal permeation-enhancing activity of carbonate and carbamate analogs of Transkarbam 12. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, 2006; 23: 7671-7680
23. Zbytovská, J., Raudenkolb, S., Wartewig, S. et al.: Phase behaviour of transkarbam 12. Chemistry and Physics of Lipids, 129, 2004; 1: 97-109
24. Hrabálek, A., Vávrová, K.: Historie a současný stav ve vývoji akceleračních transdermálních permeací na Faf UK v Hradci Králové – od esterů 6-aminohexanové kyseliny k transkarbamům (II. část). Praktické lékařství, 2007; 6: 299–300
25. <http://www.cuni.cz/IFORUM-3022.html>; 6.3.2009; autor: doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
26. Klemera, P., Doležal, P., Berka, P.: Šablona pro zpracování výsledků permeačních pokusů. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2008.
27. Klemera, P.: Univerzální šablona pro statistické výpočty parametrů t-rozdělení a t-testů. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 1998.
28. Dvořáková, P.: Transkarbam 12 a transdermální průnik kofeinu z oleokrémů. 2., Hradec Králové, 2009. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře farmaceutické technologie. Vedoucí práce: Mgr. Pavel Berka.