

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Studijní obor: Farmacie**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE**



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Hodnocení transdermální propustnosti pro kyselinu listovou pomocí  
methylparabenu jako markeru.**

**Evaluation of transdermal permeability of folic acid using methylparaben  
as a marker.**

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavel Berka

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2010**

**KATEŘINA KUBÍKOVÁ**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“*

*Kateřina Kubíková*

Touto cestou bych ráda poděkovala především vedoucímu diplomové práce Mgr. Pavlu Berkovi za pomoc a čas věnovaný mé práci. Dále katedře farmaceutické technologie za poskytnuté zázemí a kolegyni Kateřině Chromé za spolupráci při provádění pokusů.

## ABSTRAKT

V teoretické části je stručně nastíněna problematika kůže ve vztahu k transdermální prostupnosti látek. Na tuto část navazuje obecně shrnutá problematika možnosti provádění samotného testování transdermálního průchodu. Dále byly v této části popsány základní vlastnosti methylparabenu a kyseliny listové jako látek použitých pro permeační pokusy.

V experimentální části diplomové práce byly popsány podmínky, za kterých probíhalo *in vitro* měření permeací methylparabenu a kyseliny listové z TRIS pufru, TRIS pufru s propylenglykolem (PG) (3:2), isopropylmyristátu (IPM) nebo z isopropylmyristátu (IPM) s parafínovým olejem (PO) (2:3) přes prasečí kůži plně tloušťky. Byly zjištěny následující normalizované fluxy kys. listové  $J_{KLn}$ : z TRIS pufru:  $1,00 \pm 0,47$ , RSD 46,5%; z TRIS pufru s PG:  $0,28 \pm 0,11$ , RSD 40,1%; z IPM:  $0,86 \pm 0,72$ , RSD 83,4%; z IPM s PO:  $2,08 \pm 3,91$ , RSD 188,2%. Dále byly vypočteny následující průměry poměrů normalizovaných fluxů kys. listové a methylparabenu  $J_{KLn}/J_{MPn}$  a jejich směrodatné odchylky a rel. směrodatné odchylky: z TRIS pufru:  $0,98 \pm 0,46$ , RSD 46,3%; z TRIS pufru s PG:  $0,18 \pm 0,09$ , RSD 52,2%; z IPM:  $0,78 \pm 0,77$ , RSD 98,9%; z IPM s PO:  $1,76 \pm 2,86$ , RSD 162,4%.

Porovnáním těchto výsledků byl vyvozen závěr, že methylparaben není vhodným markerem při hodnocení transdermální propustnosti kyseliny listové ze zvolených donorových prostředí.

Klíčová slova: Transdermální aplikace léčiv, methylparaben, kyselina listová

## ABSTRACT

In the theoretical part, there is briefly described the problematic of skin in the connection with transdermal permeability of substances. This part is followed by a general summary about transdermal permeability testing. Further on there were described the basic features of methylparaben and folic acid as substances used for permeability tests.

Experimental part of the diploma thesis describes the testing conditions for in vitro testing of permeability of methylparaben and folic acid from the TRIS buffer, the TRIS buffer with propylene glycol (PG) (3:2), isopropyl myristate (IPM) and isopropyl myristate (IPM) with parafin oil (PO) (2:3) through the full thickness pig ear skin. Measured values of normalized fluxes of folic acid  $J_{KLn}$  were as follows: from TRIS buffer:  $1,00 \pm 0,47$ , RSD 46,5%; from TRIS buffer with PG:  $0,28 \pm 0,11$ , RSD 40,1%; from IPM:  $0,86 \pm 0,72$ , RSD 83,4%; from IPM and PO:  $2,08 \pm 3,91$ , RSD 188,2%. The following average ratios of folic acid normalized fluxes and methylparaben normalized fluxes  $J_{KLn}/J_{MPn}$  from separate donors (and their standard deviations and relative standard deviations) were obtained: from TRIS buffer:  $0,98 \pm 0,46$ , RSD 46,3%; from TRIS buffer with PG:  $0,18 \pm 0,09$ , RSD 52,2%; from IPM:  $0,78 \pm 0,77$ , RSD 98,9%; from IPM and PO:  $1,76 \pm 2,86$ , RSD 162,4%.

The conclusion that methylparaben is not a suitable marker for the evaluation of the transdermal permeability of folic acid from the specified donor media was derived from these results.

Key words: Transdermal application of drugs, methylparaben, folic acid

# OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Anatomie a fyziologie kůže.....	9
3.2	Průnik léčiva do kůže .....	12
3.2.1	Absorpce léčiv dermální a transdermální .....	14
3.2.2	Testování vstupu chemických látek do kůže .....	17
3.3	Testované látky .....	26
3.3.1	Methylparaben .....	26
3.3.2	Kyselina listová .....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
4.1	Suroviny a materiál .....	30
4.2	Přístroje .....	31
4.3	Biologický materiál .....	32
4.3.1	Rozložení vzorků kůže pro 3. měření.....	33
4.4	Roztoky a suspenze .....	34
4.4.1	Složení a příprava pufru .....	34
4.4.2	Složení a příprava donorových suspenzí - 1% .....	34
4.5	Uspořádání .....	35
4.6	Teplota .....	37
4.7	Podmínky pro stanovení methylparabenu pomocí HPLC .....	37
4.8	Podmínky pro stanovení kyseliny listové pomocí HPLC .....	37
5	DOKUMENTACE .....	38
6	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	133
7	ZÁVĚRY.....	149
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	151
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	152

# 1 ÚVOD

Kůže je největším orgánem lidského těla. Představuje zhruba 10% z lidské hmoty průměrného člověka a má okolo 1,7 m<sup>2</sup>, což jí činí ideálním místem pro lokální i systémovou aplikaci léčiv.

Transdermální podání léčiv nabízí určitou alternativu ke konvenční perorální či injekční aplikaci. Zvláště náplast'ové lékové formy patří k nejúspěšnější neinvazivní aplikační cestu hned po perorální aplikaci. Různé transdermální přípravky by v budoucnu mohly posloužit například k podání léčiv se špatnou compliance pacienta či výrazným drážděním GITu. Určitý potenciál má i pro léky významně se odbourávající v játrech.

Transdermální lékové formy jsou již v některých indikacích používány. U řady léků jsou vyráběny nebo se nachází ve stadiu klinických zkoušek. Z vyráběných a klinicky zkoušených léčiv potenciálně podávaných transdermálně lze zmínit estradiol-levonorgesterolové antikoncepce, inzulín či selegilin jako MAO inhibitor či látky k tlumení bolesti. Časté je také podávání nitroglycerinu ve formě transdermálních náplastí, kam patří například NitroDur či NitroDerm. Všeobecně známější jsou přípravky určené k odvykání kouření.

Studium transdermální permeace léčiv je jedním z nejrychleji se rozvíjejících odvětví farmaceutické technologie a považuje se za perspektivu i pro 21. století.

Předkládaná práce se zabývá možností korekce hodnocení transdermální propustnosti kyseliny listové z různých vehikul pomocí methylparabenu a je tak dalším příspěvkem k řešení problematiky transdermálního podání léčiv, která je dlouhodobě součástí výzkumu realizovaného na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- 1) *in vitro* permačními pokusy přes kožní štěpy z prasečí kůže plné tloušťky zjistit rychlosti průniku methylparabenu a následně kyseliny listové z prostředí TRIS pufru, TRIS pufru s propylenglykolem, isopropylmyristátu a isopropylmyristátu s parafínovým olejem.
- 2) Získané údaje z experimentálních měření vyhodnotit a stanovit zda je methylparaben vhodným markerem pro hodnocení transdermální propustnosti kyseliny listové z použitých prostředí.



### 3 TEORETICKÁ ČÁST

Kůže neboli *cutis* (řecky *derma*) představuje anatomicky i fyziologicky specializovanou vrstvu tvořící ucelený zevní povrch lidského těla. Je to jedinečně sestavený orgán, který umožňuje život regulací tepla a zamezením ztrát vody z těla. Znemožňuje vstup cizích látek a mikroorganismů do organismu. Také zabraňuje či minimalizuje škodlivé účinky mechanických, tepelných, chemických, osmotických a světelných vlivů prostředí. Vytváří bariérové rozhraní mezi vnějším okolím a vnitřním prostředím organismu. Udržuje tím homeotázu, stálost vnitřního prostředí.

Ochranná funkce je dána mnohvrstevnou strukturou kůže tvořenou bílkovinnými, tukovými a vodnými složkami. Odolává tlaku až 0,176 MPa. Je prostupná pro vzdušný kyslík a oxid uhličitý, čímž se podílí na dýchání.<sup>1 2 3 4</sup>

Při formulaci a výrobě transdermálních i dermálních přípravků hrají významnou roli vlastnosti kůže, anatomie i fyziologie.<sup>1</sup>

#### 3.1 Anatomie a fyziologie kůže

Kůže dospělého člověka dosahuje plochy téměř 2 m<sup>2</sup> (průměrně 1,6 – 1,8 m<sup>2</sup>). Tloušťka kůže činí 0,5 – 4 mm dle části těla. Obzvláště tenká je na očních víčkách, nejsilnější je na zádech, kolem 4 mm.<sup>5</sup> Hmotnost kůže dosahuje 3- 6 kg, je-li kůže ztlustěla tukovým polštářem, může dosahovat i 20 kg.<sup>1 6</sup> Je tedy o nejtěžší jednotlivý orgán těla.<sup>7</sup> Vlastní epidermis váží asi 0,45 kg,<sup>1</sup> hmotnost škály se pohybuje okolo 3,5 kg, největší váhový podíl připadá na pokožku.<sup>8</sup> Obsahuje okolo 72% vody.<sup>4</sup> Uvedené údaje jsou vždy dány konkrétní výškou a hmotností jedince.<sup>8</sup>

Skládá se ze tří základních vrstev:

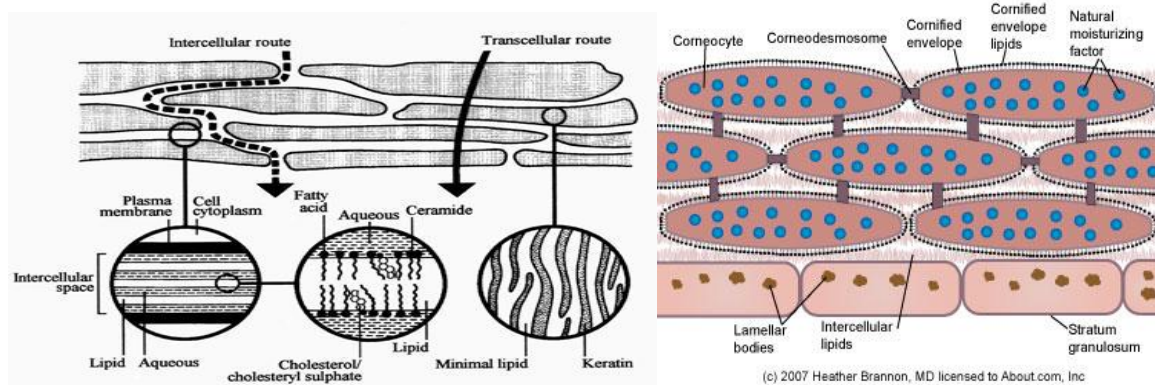
a) ***epidermis* – pokožka** - Je nejsvrchnější vrstva odvozená od embryonálního ektodermu. Má tloušťku asi 200 µm. Základní buňky epidermis se nazývají keratinocyty.

1 4 5 8

Buňky epidermis vytvářejí vrstvy. *Stratum germinativum* je vrstva zárodečná, jejíž buňky se mitoticky dělí a směrem k povrchu se diferencují a mění se ve *stratum corneum*, rohovou vrstvu.

*Stratum corneum* je široká asi 10-15  $\mu\text{m}$ . Skládá se z plochých, hrubě hexagonálně tvarovaných buněk - bezjaderných keratocytů, propletených vlákny keratinu a lipidovou matrix složenou z 9 typů ceramidů (45-50% hmoty), volných kyselin (10-15% hmoty), cholesterolu (25 % hmoty) a dalších lipidních komponent, které jsou hlavní příčinou nízké permeability této vrstvy pokožky. Lipidy rohové vrstvy tvoří asi 7-9% celkové hmotnosti tkáně. Keratinocyty se částečně překrývají a tvoří asi 20 vrstev.<sup>5</sup> Jsou mechanicky spojeny dezmozómy, které přispívají k soudržnosti celé vrstvy. Proto také právě *stratum corneum* tvoří účinnou bariéru při pronikání látek do kůže. Je třeba ale poznamenat, že pokud je bariéra *stratum corneum* porušena, tak velkou překážkou v permeaci pro drogy zůstávají i jiné vrstvy kůže.<sup>1 5 9 10 11</sup>

Obr. č. 1,2: Stavba *stratum corneum*<sup>12 13</sup>



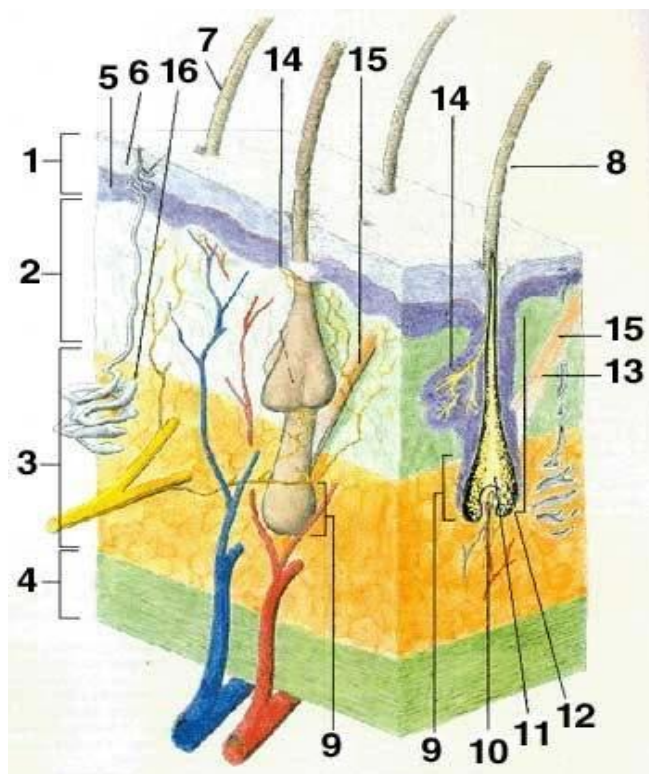
Struktura a chemické složení *stratum corneum* byly popsány důkladně, avšak pokusy studující závislost struktury a chemického složení na bariérové funkci kůže se setkaly s omezeným úspěchem. Někteří výzkumníci zjistili přímý vztah mezi obsahem ceramidů a propustností,<sup>14 15</sup> jiní na základě pokusů stanovili opačné korelace.<sup>16</sup> Objevili se také studie, které nepotvrdily ani jeden z výše uvedených vztahů.<sup>17</sup> Tato otázka může být uzavřena tvrzením, že vztah mezi složením lipidové kožní bariéry a jejími biofyzikálními vlastnostmi je komplexní a pravděpodobně závislý na chování ochranného lipidového systému. Přestože význam lipidového složení *stratum corneum* ve vztahu ke

kožní propustnosti je obecně uznáván, přesná role každého konkrétního lipidu není dosud dobře pochopená.<sup>9</sup>

b) **corium, dermis – škára** - Nacházející se pod pokožkou. Tvoří ji převážně pojivová (tvořena hlavně fibroblasty), částečně i elastická tkáň (vlákna kolagenní, elastická, retikulární). Vlákna jsou spojena ve snopce, které jsou plst'ovitě propletené. Do elastických vláken z hlubších vrstev zasahují krevní kapiláry, (jejichž hlavní funkcí je výživa epidermis) nervy, nervová zakončení, sekreční části žláz, cibulky vlasových folikulů a buňky imunitního systému. Tloušťka škáry je 0,5 – 2,5 mm.<sup>1 8</sup>

c) **tela subcutis, tela subcutanea, hypodermis – podkožní vazivo** - nachází se pod škárou. Je bohatě zásobena krevními a nervovými vlákny. V ní je uložena i tuková tkáň, jejíž tvorba je regulována hormonálně. Mezi škárou a podkožím není pevné rozhraní. Na některých částech těla, jako jsou uši, nos, víčka, se tuková tkáň nevytváří. Význam podkoží jako bariéry z hlediska průniku chemických látek, je zanedbatelný.<sup>1 8</sup> Je jednak skladištěm zásobních látek, jednak má ochranou a izolační funkci při termoregulaci a na některých místech má i význam mechanický např. tukové výplně na dlani a chodidlech.<sup>5</sup>

Obr. č. 3: Anatomická stavba kůže<sup>5</sup>



1. epidermis
2. dermis
3. podkožní vazivo
4. povrchová facie
5. stratum germinativum
6. stratum corneum
7. vlas
8. vlasový stvol
9. vlasová cibulka
10. vlasová papila s cévami
11. dřeň
12. kůra vlasu
13. vlasová pochva
14. mazová žláza
15. sval vzpřimovač vlasu
16. potní žláza

### 3.2 Průnik léčiva do kůže

Průnik léčiva do kůže je procesem značně složitým, což je dáno převážně vlastní strukturou kůže, jak už bylo zmíněno výše.<sup>18</sup>

Při dermální expozici mohou chemické látky vstupovat do kůže pěti základními cestami.<sup>19</sup>

- a) **transceluárně** – přes těla buněk rohové vrstvy a dalších buněk pokožky
- b) **intercelulárně** – skrz mezibuněčné prostory
- c) **transfolikulárně** – vlasovými folikuly
- d) **mazovými žlázami**
- e) **vývody potních žláz**<sup>8</sup>

Jiné členění rozlišuje **tranfolikulární** – skrz vlasové folikuly a potní žlázy nebo **transepidermální** vstup látky skrz kůži. Transepidermální transport lze ještě dále dělit na **intercelulární** – mezibuněčnými prostory v epidermis a **intraceluární** – přes buňky epidermis.<sup>1</sup>

Většina léčiv prochází intraceluárně. Tento prostup se řídí pravidly prosté difuze. Pasivní difuze látky vpravené v rozpouštědle do kůže je determinována její molekulovou hmotností a fyzikálními vlastnostmi procházející látky, rozpouštědla i kůže. Menší množství látek prochází cestou transceluární. Průnik cestou transfolikulární má jen okrajový význam.<sup>8 20</sup>

Dle Diembecka a spol. existují dva způsoby průniku látky do kůže.

- a) Látka může být absorbována do kůže, váže se v rohové vrstvě a spolu s odlupovanými buňkami se z kůže postupně odstraňuje. Nedostane se tedy do hlubších vrstev kůže. Nemá tedy vliv v té části kůže, kde nejsou krevní kapiláry, tzn. nepůsobí systémově, jen lokálně v místě aplikace.
- b) Látka překonává rohovou vrstvu a prochází do hlubších vrstev pokožky a do šikry, kde se dostává do kontaktu s krevními kapilárami a tkáňovým mokem, a tím proniká do systémové cirkulace.<sup>10</sup>

Novější popis průniku látky do organismu zavedlo OECD <sup>21</sup> a následně jej začala používat i WHO. Dle těchto institucí je dermální absorpce rozsáhlý termín, popisující celou cestu přenosu z vnějšího povrchu kůže do krevních nebo lymfatických cév organismu. Absorpci proto rozdělují na:

- a) **penetraci** - vstup látky do rohové vrstvy. Penetrace je pohyb agregátů, nosičových systémů – liposomů, niosomů, transferosomů.
- b) **permeaci** – přestup látek do dalších vrstev kůže. Permeace je jednoduchá difuze individuálních molekul. Ty však neovlivňují kožní bariéru. Permeabilita kůže závisí na:
  - velikosti molekuly léčivé látky
  - jejím rozdělovacím koeficientu
  - kompatibilitě permeující látky s kožními lipidy
  - difúzní konstantě, která je ovlivněna zejména plochou kůže, na kterou je látka nanesena
  - síle kožní bariéry závislé na fyziologických podmínkách, místu na těle, na rodu a rase, ale i na mechanické úpravě kůže před aplikací produktu.

Permeaci řídí koncentrační gradient rozpouštěné léčivé látky, gradient vlhkosti na povrchu kůže i další, např. elektrický potenciálový rozdíl. Vyrovnáním koncentračního gradientu rozpouštěné léčivé látky se její permeace zastavuje.

- c) **resorpci** – vstup látek do krevních a lymfatických cév <sup>18</sup>

Průnik chemických látek kůží probíhá v několika stupních. V první fázi se léčivo uvolňuje z léčivého přípravku a dostává se do přímého kontaktu s kůží. V druhé fázi prochází do kůže a skrz epidermis prochází až do škáry a podkožního vaziva, kde se vyskytují krevní kapiláry.<sup>10</sup>

### 3.2.1 Absorpce léčiv dermální a transdermální

Pokud se zabýváme absorpcí léčiv jako takových ve vztahu ke kůži, je třeba si definovat dva základní pojmy tj. absorpci dermální a transdermální. Pokud hovoříme o tzv. dermální aplikaci léčiv, myslíme tím působení léčiv na kůži a v kůži. Transdermální léky překonávají kožní bariéru, procházejí přes kůži do podkoží, kde se dostávají do kontaktu s krevními kapilárami a pronikají v místě aplikace do krevního řečiště, vyvolávají systémový účinek. Tím se také liší od dermálně podaných léčiv, protože pokud se dermální lék dostane do krve, je to pro něj účinek nežádoucí.<sup>1</sup>

#### 3.2.1.1 Transdermální transport

Transdermální podání léčiv, neboli transdermal drug delivery systém (TDDS), je efektivní cesta podání terapeuticky aktivních látek skrz kůži.<sup>7</sup> Má řadu výhod a nabízí atraktivní alternativu ke konvenční perorální či injekční aplikaci.<sup>22</sup>

Objev, že mnohé látky, pokud jsou v dostatečném množství, mohou při průchodu kůží vniknout do krve, stál na počátku zvýšeného zájmu firem připravit právě takovou lékovou formu, která umožní po aplikaci na kůži vyvolat systémový účinek léčiva.<sup>1</sup> O transdermální podávání léčiv se začalo uvažovat teprve ve 20. letech 20. století. K vlastnímu používání došlo výrazně později. V 50. letech se objevili masti s nitroglycerinem a v roce 1978 náplasti se skopolaminem.<sup>11</sup> Začátek výraznějšího výzkumu se datuje od roku 1980, kdy mnohé firmy začaly intenzivně pracovat na transdermálních lékových formách. První takovou firmou byla Alza Corporation v USA. Byla první, ale zdaleka ne poslední korporací, která orientovala a orientuje svůj výzkum právě na toto odvětví farmaceutické technologie. Dnes je registrováno více než 35 transdermálních produktů obsahujících 13 molekul. Dle průzkumu Jain PharmBiotech byla hodnota globálního prodeje transdermálních přípravků v roce 2005 12,7 bilionů dolarů, přičemž se předpokládá, že v roce 2010 to bude 21,5 bilionů dolarů a 31,5 bilionů dolarů v roce 2015. Transdermální léky se považují za perspektivu i pro 21. století. Zvláště náplast'ové podání léčiv patří k nejúspěšnější neinvazivní aplikační cestu po perorální aplikaci.<sup>1 7 11</sup>

Faktory limitující rozvoj transdermální technologie ve vztahu k podání člověku mohou být lokální dráždění či jiné nepříznivé vztahy související s účinnou látkou i lékovou formou.<sup>7</sup>

Otázkou však zůstává, proč transdermální aplikace, když se vyskytnou cesty značně jednodušší, přirozenější, technologicky dobře zvládnuté? Je to dáno tím, že i jiné, hojněji používané, cesty podání nejsou bez úskalí. Nejčastěji užívaný způsob podání, tj. perorální aplikace, má tyto nevýhody:<sup>19</sup>

- horší pacientova compliance
- potíže s polykáním nebo rozkousáním tablet s kontrolovaným uvolňováním
- dráždění zažívacího traktu
- inaktivace first-pass efektem, neboli efektem prvního průchodu játry, kdy dochází k metabolizaci i značné části podaného léčiva, což se v konečném důsledku projeví sníženou účinností
- nemožnost (po určité době od perorální aplikace) rychle ukončit přívod léčiva do systémového oběhu v případě potřeby, např. při předávkování, alergické nebo jiné nežádoucí reakci
- snížené nebo zvýšené vstřebávání léčiv z GITu, způsobené jeho momentální náplní po perorální aplikaci
- změny GITu v důsledku probíhajícího patologického procesu ovlivní množství vstřebaného léčiva po per os aplikaci.

Parenterální podání je značně náročné na vybavení. Navíc, s výjimkou autoaplikace inzulínu, musí být prováděna kvalifikovaným zdravotnickým personálem. Téměř vždy traumatizuje pacienta, zejména děti, protože často bývá bolestivá nejen při vlastním provedení vpichu, ale také v souvislosti s tvorbou depot léčiva v místě aplikace, kdy bolest někdy i dlouhou dobu přetrvává.<sup>7 19</sup>

Z toho také vyplývá, že mezi výhody transdermální aplikace patří bezesporu trvalý a rovnoměrný přísun léčiva, vyloučení first-pass efektu, relativně nízký výskyt nežádoucích účinků, poměrně snadná aplikace a lepší pacientova compliance než u perorálních či injekčních přípravků.<sup>3</sup>

Proč tedy nepodáváme všechna léčiva transdermální? Není jednoduché dopravit látku skrz kůži až ke krevním kapilárám. <sup>1</sup> Léky musí permeovat do hlubších vrstev kůže, i přestože kůže tvoří efektivní, selektivní bariéru vůči vstupu chemických látek. Bohužel jen několik léků má takové fyzikálně-chemické vlastnosti, které jsou nezbytné pro tento způsob podání. Většina léků není schopna přes kůži, v množství potřebném pro úspěšnou systémovou terapii, projít. <sup>23</sup>

Jak už bylo konstatováno, překážkou pro percutánní průnik drog je horní vrstva kůže, *stratum corneum*. Ta je propustná pouze pro malé, lipofilní molekuly. Brání vstupu cizorodých látek, tím i léčiv do organismu. Proto je třeba mít tuto skutečnost na paměti a učinit patřičná opatření, která transdermální aplikaci umožní nebo alespoň podpoří. <sup>22</sup>

Jaká látka se tedy zdá být nejlepším kandidátem pro transdermální průchod? Odpověď na tuto i další otázky tkví nejen v pochopení struktury kůže, ale také v porozumění molekulárních faktorů, které utvářejí látku snadněji průchodnou do kůže. Mezi vlastnosti, které daná látka musí mít, patří vyšší absolutní afinitu ke kožní fázi, která zabezpečí její difúzní vodivost a účinek drogy spolu s relativní schopností látky působit systémově a dostat se do těla.

#### 3.2.1.1.1 Metody zlepšení transdermálního průchodu

Byla popsána řada postupů, kterými lze průchod látek přes *stratum corneum* zvýšit. Patří mezi ně:

- Zvýšení koncentrace léčivé látky na kůži, a tím využití aktivního koncentračního gradientu.
- Využití kladného rozdělovacího koeficientu léčivé látky v kůži a její afinity ke kůži pomocí tzv. lipoidních prodrugs.
- Zmenšení síly kožní bariéry, což je prakticky nevyužitelné <sup>1</sup>
- Využití fyzikálních postupů – **sonophorezy** <sup>24</sup> - pomocí terapeuticky užívaného ultrazvuku (několik W.cm<sup>-2</sup>), **iontoforezy**, <sup>25</sup> **elektroporace** - vytvořením širších



hydrofilních otvorů (pórů) pomocí slabého elektrického proudu ( $0,4 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Všechny tyto metody vyžadují zkušenosti a přístrojové vybavení a to hlavně proto, aby se rozšíření pórů nestalo ireverzibilní. Těchto metod se využívá hlavně pro transport terapeuticky zajímavých peptidů, které se ze standardních transdermálních náplastí do kůže nedostanou.

- Použití **chemických stimulátorů** <sup>26 27</sup> zavádění vezikulárních forem či použití chemických látek. V současné době je nejrozšířenější přístup k posílení průchodu látek přes korovou vrstvu použití chemických látek zvyšujících penetraci (sorpční stimulatory a akceleranty). Urychlovače, neboli akceleranty transdermální penetrace, reverzibilně snižují bariérovou funkci kůže a umožňují průnik léčiva přes kůži v předem odhadnutelném množství a čase, což přináší značný posun v porovnání s klasicky užívanými keratoplastiky či derivancí. Tato skupina pomocných látek je dnes bouřlivě se rozvíjející skupinou látek potenciálně použitelných při aplikaci topických či transdermálních léčivých přípravků. Tyto látky musí být nedráždivé, netoxické, nealergizující a nesmějí mít vlastní farmakologický účinek. <sup>1 3 18 22</sup>
- Využití tzv. **transdermálních nosičových systémů**, které mění strukturu i prostupnost kůže. Mezi takové systémy patří např. liposomy, niosomy, transfersony. Ty působí tak, že interagují s kůží a ta interaguje s nimi. Výsledkem takové interakce je fluidizace kožních lipidů, která způsobí zvýšenou permeabilitu kůže. Dochází ke změnám v biochemických procesech probíhajících v kůži. Může dojít až k porušení kůže případně lyzi až smrti kožních buněk. <sup>1</sup>

### 3.2.2 Testování vstupu chemických látek do kůže

Obecně lze testování vstupu chemické látky do kůže provádět následujícími metodami:

- *In vivo na zvířeti*
- *In vitro na kůži lidské, zvířecí, uměle vytvořené*
- *In vitro na membráně (jiné než kůže)*
- *Modelování absorpce in silico* <sup>8 21</sup>

Nejčastěji používané metody jsou první dvě výše zmiňované. Obě studují přechod testované substance z testovaného preparátu skrz kožní bariéru do kůže a každá z nich má řadu výhod i nevýhod.

Národní regulační autority mají rozdílné preference pro *in vivo* či *in vitro* metody používané pro studium kožní absorpce. Volba konečné metody jde ruku v ruce s požadavky či podmínkami daného specifického orgánu či autority. *In vivo* data mohou být použita samostatně. Po *in vitro* pokusech většinou následují zkoušky *in vivo*. Výběr může být také závislý na zkoušené látce, kdy může být použita např. jen *in vitro* metoda pro první hodnocení zkoušené látky. Tam, kde potřebujeme přesnější výsledky, je požadováno použití kombinace obou metod.<sup>21</sup>

### 3.2.2.1 *In vivo* metody

Termín *in vivo* je odborný pojem pocházející z latiny, dá se přeložit jako „v živém“. Označuje se tak studium organismů (popř. jejich orgánů, či ještě jednodušších biologických složek a biologických látek), které jsou pozorovány přímo v přirozených podmínkách, neboli zkoušky jsou prováděny přímo na živých organismech.<sup>28</sup>

V případě studia transdermální či dermální absorpce jsou nejčastěji pro tyto pokusy používány krysy. Testovaná látka se aplikuje na plochu okolo 10 cm<sup>2</sup>. Tam je ponechána určitou dobu odpovídající potenciální době expozice u člověka. Na konci pokusu je látka ze zvířete smyta. Získaná data slouží k odhadnutí celkového průniku testované látky. Kožní absorpce testované látky může být vyjádřena jako procento z dávky absorbované za určitý čas z průměrné rychlosti absorpce na jednotku plochy kůže.<sup>21</sup>

### 3.2.2.2 *In vitro* metody

*In vitro* je odborný termín, který se z latiny překládá jako „ve skle“. V přeneseném slova smyslu je myšleno ve zkumavce, Ehrlen-Mayerově baňce, Petrino misce či dalším

laboratorním skle. Tento pojem se užívá obecně pro pozorování v umělých např. laboratorních podmínkách.<sup>29</sup>

Pro *in vitro* pokusy je charakteristické zkoušení průchodu látek přes kůži v laboratorních podmínkách na vzorku kůže zvířecí nebo lidské.<sup>21</sup>

### 3.2.2.2.1 Vzorky kůže

Obojí, lidské i zvířecí kůže, mohou být a jsou používány k *in vitro* studiím pro předpovídání možného pronikání různých látek skrz lidskou kůži.<sup>9</sup> Platí, že mezi výhody těchto metod patří možnost použití lidské i zvířecí kůže se srovnatelnými výsledky.<sup>21</sup>

V minulosti byly používány četné modely zvířecí kůže z různých savců, hlodavců a plazů jako potenciální náhrady lidské kůže pro tyto pokusy, a to i přes zjištění, že zvířecí kůže má tendenci být více propustná pro určité látky než kůže lidská.<sup>30 31</sup>

Jako tzv. „zlatý standard“ je každopádně považována lidské kůže, ta však není často k dispozici ani včas ani v dostatečném množství.<sup>9</sup> Vzorky lidské kůže jsou nejčastěji získávány z tkáňových bank nebo od živých dárců, většinou pacientů při chirurgických operacích. Používá se kůže ze zad, břicha, hrudníku a boku. Transdermální absorpce je ovlivněna věkem a pohlavím dárce, hydratací kůže, místem odběru kůže i prostředím, při kterém je experiment prováděn (pH, teplota).

Ve většině případů jsou tyto studie určeny k předvídání kožní absorpce u člověka, proto také použití lidské kůže je nejvíce relevantní. Nicméně z regulačních či praktických důvodů se používají kůže různých druhů zvířat, obvykle z prasat nebo potkanů, v některých případech i opic a morčat. Potkaní kůže se používá poměrně často. Je to dáno tím, že většina testů toxicity byla provedena právě na tomto druhu. Její použití je ale méně vhodné, neboť se anatomickou i chemickou stavbou kůže liší od člověka. Má více vlasových folikulů, což vede k vyšší propustnosti pro testované látky. Prasečí a opičí kůže se používá častěji pro její větší podobnost s kůží lidskou, pokud jde o morfologické vlastnosti a propustnost.<sup>8 21</sup>

Nejen z etických důvodů je dnes ve většině případů výzkum omezen na používání vepřové kůže. Důvodem je v první řadě morfologická a funkční podobnost s kůží lidskou, ale také snadné získání kůži jako odpadu z poražených zvířat určených ke konzumaci. Mezi

velmi podobné znaky obou druhů kůže patří sporé ochlupení, tenká *epidermis* s dobře diferencovanou strukturou *Dermis*, která má dobře rozlišená papilární těla či velký obsah papilární tkáně. Z toho také vyplývá, že prasečí kůže se zdá být nejbliže k lidské kůži, a proto nejvhodnější k těmto pokusům.<sup>9 32 33 34</sup>

K testování dermální absorpce přes prasečí kůže se nejčastěji používají kůže ze slabiny zvířete nebo z uší. Vzorky prasečí kůže se získávají výhradně z vnější strany kůže ušních boltců. Boltce kanců se nepoužívají, protože metabolismus i celková struktura kůže jsou pozměněny vlivem hormonu testosteronu, který produkují. Kůže řezanců se také nepoužívá. Využit se ale v některých případech mohou vzorky ze zad nebo končetin. V případě krysa, může být použita hřbetní nebo břišní kůže. Ta hřbetní kůže ale jen tehdy, jestliže studie korespondují s aplikační stranou u *in vivo* pokusů.<sup>21</sup>

Vzhledem k interindividuálním rozdílům mezi jednotlivci téhož druhu či intraindividuálním rozdílům mezi částmi těla téhož jedince v propustnosti kůže je doporučováno, aby se při jednom měření použilo minimálně 6 vzorků kůže za stejného místa od minimálně 3 různých dárců.<sup>35</sup>

Odborníci z Národního institutu pro bezpečnost a zdraví, sídlícího ve Virginii v USA, provedli výzkum, jehož cílem bylo kvantitativní porovnání propustnosti látek a *lag times* (*Lag time* permeace souvisí s časem potřebným k dosažení ustáleného stavu toku chemické látky skrz kůži. Stejně jako propustnost je *lag time* závislý na konkrétní sloučenině, vehikulu a vlastnostech kůže. *Lag time* se může pohybovat od jedné minuty až do několika dní. Jeho měření je však náchylné k chybám. Pro dlouhé *lag times* je přesné určení hodnoty složité, pro možné zhoršení stavu kožní membrány) mezi lidskou a zvířecí kůží, včetně vyhodnocení rozdílů jak mezidruhových, tak i intradruhových.

Výzkum byl omezen na pozorování kůže z prasete domácího a morčete se srstí i bezsrstého, jako možné náhrady lidské kůže při pozorování procesu průchodu různých chemických látek přes kůži. Výzkum byl zaměřen právě na tyto vybrané druhy, protože jsou často používány jako náhrady pro testování průchodu látek skrz kůži. Tyto pokusy bylo prováděno jak na lidské, tak i na zvířecí kůži společně vždy v jedné laboratoři. Aktuální hodnocení zahrnuje metaanalýzu dříve publikovaných dat získaných za podobných podmínek.

Z výzkumu vyplynulo, že prasečí kůže i kůže z morčete jsou dobrými modely pro studium propustnosti skrz lidskou kůži a mají menší variabilitu než modely kůže lidské. Výběr modelu bude vždy záležet na konkrétním konečném účelu studie a na chemické látce, kterou zkoumáme.<sup>9</sup>

Masivní používání zvířecích modelů a odpor ochranářů zvířat vedly v Evropě v roce 2003 k přijetí směrnice EU zakazující od března 2009 použití zvířat pro testování akutních účinků kosmetických přípravků a od března 2013 také pro testování chronické toxicity, reprodukční toxicity a toxikokinetiky kosmetických přípravků. Tato směrnice výrazně ovlivnila i dále ovlivní rozvoj metod pro studium dermální i transdermální aplikace *in vitro*.

Určitou alternativou ke kůži přirozené je použití kůže umělé. Jedná se například o modely EpiSkin, SkinEthic či EpiDerm. Kůže je vypěstovaná *in vitro* z keratinocitů na vhodném podkladě. Nevýhodou a určitým omezením pro plošné používání této kůže je, že stále ještě nedosahuje vlastností a funkcí kůže přirozené. Může se použít pro orientační testování látek, ale k závěrečnému testování látek potenciálně využitelných pro přípravu humánních i veterinárních přípravků se nedoporučuje.<sup>8</sup>

#### **3.2.2.2 Příprava kůže**

Způsob úpravy kůže je závislá na druhu, ze kterého pochází, což je dáno rozdíly v kožní morfologii a hloubce folikulů. Běžně se používá tepelná separace pro lidskou i prasečí kůži (60°C po dobu jedné nebo dvou minut, epidermální membrána se odloupne od dermis pomocí kleští). Chemická separace se používá k přípravě potkaní epidermální membrány. Používá se 2M roztok bromidu sodného. Enzymatická separace využívá proteáz nebo bakteriální kolagenasy.

Velmi tenké vzorky (okolo 200 – 400  $\mu\text{m}$ ) kůže se připravují pomocí dermatomů.<sup>21</sup>

### 3.2.2.2.3 Uchovávání kožních preparátů

Skladovací podmínky mohou mít vliv na kožní propustnost. Někteří autoři tvrdí, že nejsou žádné rozdíly mezi zmraženými a nezmařenými kůžemi ve vztahu k propustnosti vody<sup>36 37</sup>, zatímco jiní oponují, že propustnost některých látek se zvýšila<sup>38 39</sup> a lag time se snížil<sup>38</sup> po zmražení kůže.<sup>9</sup>

Přednost se v každém případě dává čerstvým kůžím (do dvou dnů po odběru). Tato kůže má aktivní enzymatický systém, zanedbáme-li, že k částečné autolýze dochází již od okamžiku odběru. Takové kůže však nejsou vždy snadno dostupné. Životnost kožního vzorku v závislosti na metabolické aktivitě kůže klesá s dobou skladování.<sup>8 21</sup> Pokud se pro pokusy používají vzorky lidské kůže, jsou nejčastěji zmražené, zatímco zvířecí nejčastěji čerstvé.<sup>9</sup> Zmražená kůže nemá zachovaný aktivní enzymatický systém a je mírně anatomicky poškozena krystalizací vody, přičemž rohová vrstva je bezvodá, tudíž je poškozena jen minimálně. Ve srovnání s čerstvou kůží vykazuje zmražená kůže vyšší úroveň ustáleného průtoku testované látky (*steady state flux*) a také kratší čas od začátku pronikání testované látky do receptorové tekutiny. Existují však dostupné důkazy, že pokud uchováváme vzorek za daných vhodných podmínek, nemá uchovávání výrazný vliv na *in vitro* permeabilitu lidské i zvířecí kůže. Použití kůže pro pokusy po určitou dobu skladovaných má také řadu výhod, hlavně ve vztahu k pozdější srovnatelnosti a standardizaci metod. Z toho důvodu mohou být použity i kůže, které byly po určitou dobu a za daných podmínek uchovávány, a to za předpokladu, že je zaručena jejich celistvost.

Bylo prokázáno, že lidská i zvířecí kůže může být skladována po několik měsíců při teplotě - 20°C bez toho, aby došlo k výrazným změnám v propustnosti v porovnání s čerstvou kůží. Kůže by ale naproti tomu neměla být skladována při velmi nízkých teplotách, protože se ukazuje, že teplota nižší než - 80°C může zvýšit její propustnost. Také není vhodné vzorky kůže během skladování rozmrazovat nebo nechat roztát a pak zpět zamrazovat, protože se může změnit, respektive zvýšit jejich propustnost. Zmražené kůže jsou vzhledem k dlouhodobé použitelnosti (dle různých autorů v době do 1 roku) v pokusech využívány častěji.<sup>8 21</sup>

Je důležité, aby si každá laboratoř stanovila podmínky, které jsou potřebné pro experiment a zjistila, zda jsou tyto podmínky vhodné. Pozornost je nutné také zaměřit na způsob přípravy kůže, která má být použita v experimentu *in vitro*, což může ovlivnit jak

propustnost tak i lag time. Propustnost se také může měnit nepřímo, a to úměrně s tloušťkou kůže.<sup>9 40 41</sup>

#### **3.2.2.2.4 Posuzování integrity kožních vzorků**

Akceptovaných metod pro testování integrity kůže při *in vitro* pokusech dle OECD je několik. Jednou z nejčastěji prováděnou je měření elektrického odporu kůže (TER). Jde o jednoduchou, rychlou, bezpečnou a cenově dostupnou metodu k posouzení míry celistvosti kožních štěpů. Určitou alternativou je určení transepidermální ztráty vody ze *stratum corneum* (TEWL) či nanesením referenční látky (např. triciované vody, kofeinu, sacharózy) před testovanou substancí. Je třeba mít vždy na paměti, že tímto krokem může dojít ke zvýšení absorpce následně aplikované testované látky. Testování integrity kůže lze provádět na počátku pokusu před nanesením testované látky, v průběhu testování formou přidání referenční látky či po ukončení pokusu. V tomto případě však může být absorpční membrána již poškozena vlivem testované substance, a proto se daný způsob kontroly volí pouze u látek působících na kůži po krátkou dobu, řádově v minutách. Další metoda je vázaná na výsledky pokusů a spočívá ve vyloučení výsledků, jejichž hodnoty se významně liší od ostatních hodnot, neboť i malá, zrakem nepostřehitelná poškození kůže se projeví výrazným zvýšením propustnosti.<sup>8 21 42 43 44</sup>

#### **3.2.2.2.5 Difúzní buňky**

Pro pokusy transdermální permeace se používají difúzní komůrky neboli buňky. Existuje několik typů difúzních buněk. Všechny se skládají ze dvou částí: donorové a receptorové komory, mezi kterými je umístěna kůže upevněná mezi dvěma sklíčky s otvorem uprostřed pro aplikaci testované látky. Musí být vyrobeny z inertního materiálu, nejčastěji skla nebo teflonu, aby se minimalizovaly interakce materiálu se zkoušenou látkou. Konstrukce buněk by měla umožnit regulaci teploty kůže i receptorové tekutiny. Dále by měly být sestaveny tak, aby v případě potřeby umožnily snadné odstranění zkušebního roztoku.<sup>21</sup>

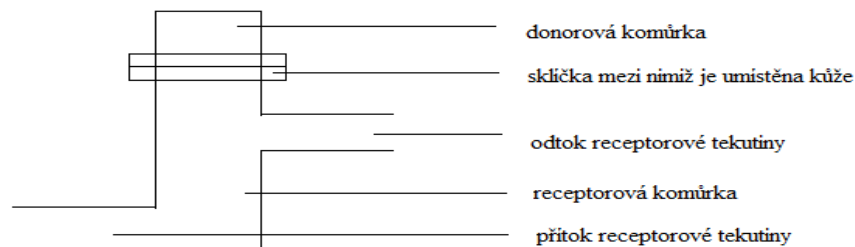
Existují dva základní typy difúzních komůrek:

- a) **statická vertikální difúzní komůrka, tzv. Franzova komůrka** – receptorová tekutina (v objemu od 2 do 20 ml) v této komůrce musí být neustále míchána a je v daných intervalech odebírána a analyzována
  
- b) **průtoková vertikální difúzní komůrka** – v tomto případě je receptorová tekutina (obvykle 0,1 – 5 ml) ze spodní části odstraňována kontinuálně během celého pokusu pomocí pumpy.<sup>8 21</sup>

Obr. č.4: Statická vertikální difúzní komůrka



Obr.č.5: Průtoková vertikální komůrka





### 3.2.2.2.6 Receptorová tekutina

Receptorová tekutina vyplňuje spodní část difúzní komůrky, tzv. receptorovou komoru. Musí být zvolena tak, aby byla v souladu s kožním vzorkem, který nesmí poškozovat a musí splňovat základní parametry rozpustnosti zkoušené látky (nikoli testovaného přípravku) v receptorové tekutině.

Pro hodnocení ve vodě rozpustných (hydrofilních) sloučenin na kůži skladované zmražením se používají obvykle solné nebo pufrované roztoky solí o pH okolo 7,4 (např. fyziologické roztoky). Pro lypofilní zkoušené látky používáme receptorovou tekutinu, která může obsahovat organická rozpouštědla nepoškozující membránu jako je například etanol a voda v poměru 1:1 nebo 6% polyethylenglykol, 20% oleylether ve vodě či přidání sérového albuminu. Bariéra integrity kůže musí být neporušena, přičemž bylo prokázáno, že tence připravené vzorky kůže (přibližně 200 µm) mají zvýšenou náchylnost k poškození.<sup>8 21</sup>

Pro metabolicky aktivní vzorek kůže může být použita fyziologická receptorová tekutina, např. tkáňové kultivační medium. Určitým omezením používání takovýchto receptorových tekutin pro nepolární testované substance je potenciálně neadekvátní rozpustnost testované substance v receptorové tekutině. To by se mohlo vyřešit přidáním modifikátoru, typicky 6% polyethylenglykolu 20 oleyletheru nebo 5% hovězího sérového albuminu.

Pro radioaktivně značené testovací látky by se měla vybrat taková receptorová tekutina, která nezasahuje do použitých analytických metod.<sup>21</sup>

### 3.2.2.2.7 Vyhodnocování výsledků

Na konci studie se porovná množství testované látky nanesené na kůži s množstvím látky v receptorové tekutině. Tato data jsou nezbytná k určení celkového kožního průchodu testované látky. Kožní absorpce tetované látky se může vyjádřit:

- v procentech, tj. kolik procent z aplikované dávky prošlo do receptorové tekutiny
- množstvím, tj. množstvím látky prošlé přes kůži, jako poměr absorbované látky k aplikované dávce za určitou časovou jednotku
- rychlostí absorpce za jednotku času

- nebo v případě nekonečné dávky aplikace jako permační konstanta.<sup>21</sup>

Rozsah analýz je dán požadavky experimentu. Kůže může být studována v celé její šířce či jen její určité části.

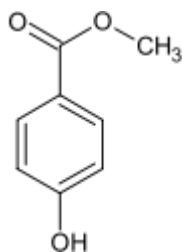
Množství látky v rohové vrstvě se určuje pomocí tzv. stripování, kdy se jednotlivé buňky rohové vrstvy odlupují pomocí pásky. Páska s nalepenými buňkami rohové vrstvy se posléze analyzuje. Může být studována také samotná pokožka nebo škára, které se od sebe oddělují tepelně, chemicky nebo enzymaticky. Nejčastěji však studujeme receptorovou tekutinu odebíranou během pokusu.

Analýza jednotlivých vzorků odebrané receptorové tekutiny se provádí nejčastěji pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), radiografie nebo scintigrafie (při použití značených testovaných látek). O výběru metody rozhoduje charakter testované látky a možnosti daného pracoviště.<sup>8</sup>

### 3.3 Testované látky

#### 3.3.1 Methylparaben

Obr. č. 6: vzorec methylparabenu<sup>45</sup>



Jiné názvy: *metyl-paraben*, *Methyl-p-hydroxybenzoát* – oficiální název dle názvosloví IUPAC, *methyl p-hydroxybenzoát*, *nipagin*

*Molekulární vzorec: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>*

*Molární hmotnost: 152,15 g/mol*

*Rozpustnost ve vodě při teplotě 25°C: 0,25 g/100 ml*

*Rozpustnost ve vodě o teplotě 80°C: 2,00 g/100 ml*

Všechny parabeny jsou obecně estery 4-hydroxybenzoové kyseliny, na kterou jsou v kůži hydrolyzovány karboxyesterázou a rychle vyloučeny bez akumulace v těle. K potlačení přeměny může být použita řada inhibitorů tohoto enzymu. Někteří z nich jsou specifičtí k určitému druhu parabenu.<sup>46</sup>

Parabeny jsou velkou skupinou chemických látek, které jsou hojně používány jako konzervační látky v kosmetických přípravcích. Jsou široce používány i ve farmacii a někdy také jako aditiva v potravinách. V roce 1984 bylo registrováno 13 200 různých kosmetických přípravků s obsahem parabenů<sup>47</sup>. Z toho důvodu je třeba porozumět jejich chování po nanesení na kůži, možnému transdermálnímu průchodu a z toho plynoucího jejich potenciálnímu toxickému efektu.

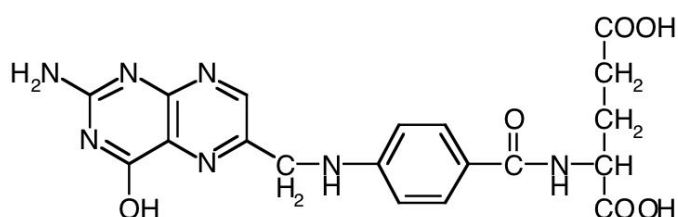
Parabeny mají dlouhou historii používání. Je to dáno hlavně tím, že nejsou finančně náročné na výrobu a jsou relativně netoxické. Nejčastěji používaným parabenem je metylparaben, po něm pak etylparaben, propylparaben a butylparaben. Parabeny jsou metabolizovány systémově a vylučovány močí.<sup>46 48</sup>

Skutečnost, že jsou parabeny schopny působit systémově po topické aplikaci na lidských subjektech, byla publikována ve studii, kde byly sledovány hladiny parabenů v krvi i moči 26 zdravých mladých mužů, kterým byly aplikovány parabeny topicky ve formě krémů.<sup>49</sup> Janjua et al. ukazují, že mohou být rychle absorbovány skrz kůži do lidského těla dokonce pouze z jednotlivé dávky kosmetických produktů pro péči o tělo. Ukazují také, že hladina esterázy v kůži není k hydrolyze všech parabenů dostatečná. Reálná expozice by měla být kratší (okolo 0,4 % jednotlivých esterů, jak je povoleno v Evropě, spíše než 2 % užita Janjua et al. 2007), ale měla by také zahrnout opakovanou aplikaci několika produktů a potenciál pro akumulaci. Studie také ukazují, že při studiu *in vitro* může být permeace parabenů skrz lidskou zvýšena s opakováním dávky.<sup>48</sup>

Samotný methylparaben se snadno vstřebávají jak z trávicího traktu tak kůží. Studie prokázaly, že je prakticky bez toxických účinku, perorální i parenterální forma. V populaci s normální pleť je prakticky nedráždivý, jen v některých případech se mohou vyskytnout alergické reakce.<sup>28</sup> Je rozpustný ve vodě (1g se rozpustí v 400 ml vody), horkém oleji (1g ve 40 ml) a glycerolu (1g v 70 ml).<sup>50</sup>

### 3.3.2 Kyselina listová

Obr. č.7: Vzorec kyseliny listové<sup>51</sup>



*Jiné názvy: Pteroglutamová kyselina, folacin, folát, vitamin B9, acidum folicum*

*Systematický název: N-[4[[[(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridinyl)methyl]amino]benzoyl]-L-glutamová kyselina*

*Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>*

*Molární hmotnost: 441,4 g/mol*

Vzorec této kyseliny se skládá z pteridinové části napojené v *para* poloze na aminobenzoovou kyselinu a L-glutamát. Kyselina listová je standardně dostupná ve formě folátu a užívaná ve vitaminových doplňcích. Folát je generický termín popisující mnoho různých forem vitamínu mající biologickou aktivitu.<sup>52</sup>

Kyselina listová je ve vodě rozpustný vitamin ze skupiny komplexu vitamínu B. Je nezbytná pro syntézu nukleových kyselin, při krvetvorbě a zvláštní význam má pro

normální růst a vývoj plodu.<sup>51</sup>Jedná se o krystalicky žlutý do oranžovo-hnědé zbarvený prášek. Je nepatrně rozpustná ve studené vodě (0,0016%/mol při 25°C) asi do 1% ve vařící vodě. Je také snadno rozpustná v zásadách, hydroxidech a uhličitanech a mírně v metanolu či v horké kyselině chlorovodíkové a sírové. Nerozpustná v acetonu, chloroformu, éteru a benzenu. Rozpustnost je inaktivována UV zářením. Kyselina listová je nestabilní a ztrácí aktivitu v přítomnosti světla, oxidačních a redukčních agens a kyselém či zásaditém prostředí. Při uchovávání se musí chránit před světlem a umístit v lednici.<sup>50 53</sup>

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Suroviny a materiál

<i>Název suroviny</i>	<i>Výrobce (Dodavatel)</i>
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Diazolidinylurea, 95%	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, Neratovice, ČR
Hydrogefosforečnan draselný	Lachema, Neratovice, ČR
Izopropylmyristát	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Kyselina chlorovodíková, 35%	Penta Ing. Petr Švec, Praha ČR
Kyselina mravenčí	Lachema, Neratovice, ČR
Kyselina listová	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Methanol	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Methylparaben	Kulich, HK, ČR
Parafinový olej	Tamda a.s, Olomouc, ČR
Propylenglykol	Kulich, HK, ČR
Trizma	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Trometamol	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Voda čištěná	Faf UK, HK, ČR
Voda pro HPLC	Faf UK, HK, ČR

## 4.2 Přístroje

<i>Typ přístroje</i>	<i>Výrobce</i>
Analytické váhy	Sartorius, Göttingen, Německo
Automatické pipety – M-PLASTOMED	SEM-Plastomed, Německo
Digitální pH-metr GRYPF 209L	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Elektronická míchačka	Variomag Labortechnik, München, Německo
HPLC sestava Agilent Technologies 1200 Series (izokratická pumpa G1390A, DEGASET G1379B, autosampler G1329A, termostat G1316A, UV/VIS detektor G1314B)	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
LCR meter - Voltcraft 4080	Voltcraft.cz, ČR
Kombinovaná lednička s mrazničkou	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha
Předvážky Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Předvážky Kern 440-53N	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Vodní lázen - JB series	Grant Instruments, Velká Británie

### 4.3 Biologický materiál

Pro permeační pokusy jsme použili jako model štěpy prasečích kůží získané výhradně z vnější strany ušních boltců samic prasete domácího *Sus Strofa F. domestica*.

Kůže byly skladovány mezi dvě polypropylenovými foliemi při teplotách kolem -20°C.

Obr. č.8.: Zmražená kůže z ušních boltců prasete používaná pro permeační pokusy

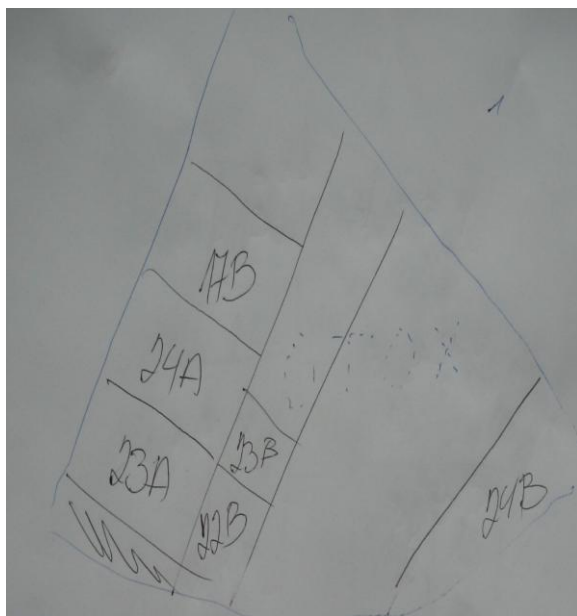


Pro vlastní permeační pokusy se kůže vyjmula z mrazničky a nastříhala na jednotlivé štěpy, které se umístily mezi komory difúzních komůrek. Nepoužily se ty části, které byly tetované, od krve či jinak poškozené, protože by mohly zkreslit výsledky pokusů. Zaznamenaly se základní údaje o kůži, která se použila, aby se dalo zpětně dohledat, která kůže byla použita pro danou komůrku.

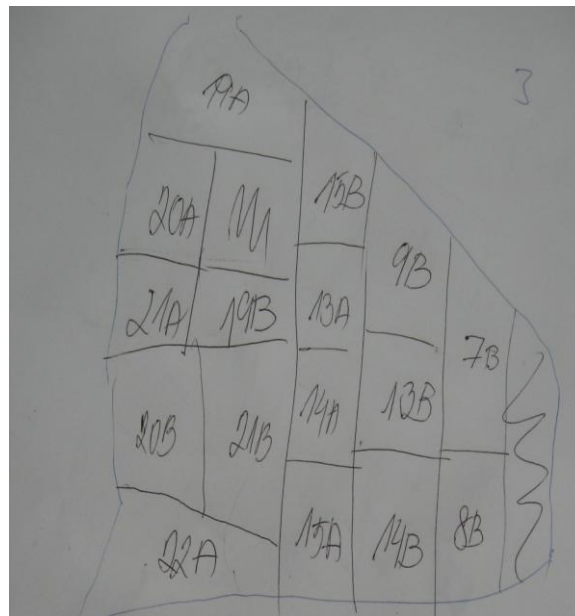


### 4.3.1 Rozložení vzorků kůže pro 3. měření

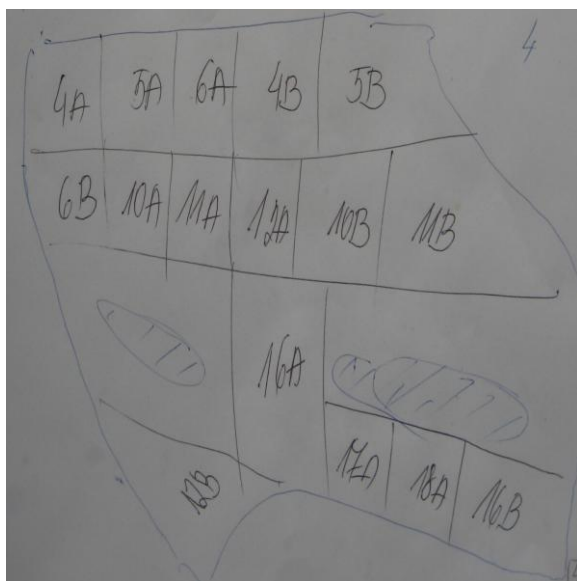
Obr. č. 9 : Kůže 25.8.09/1



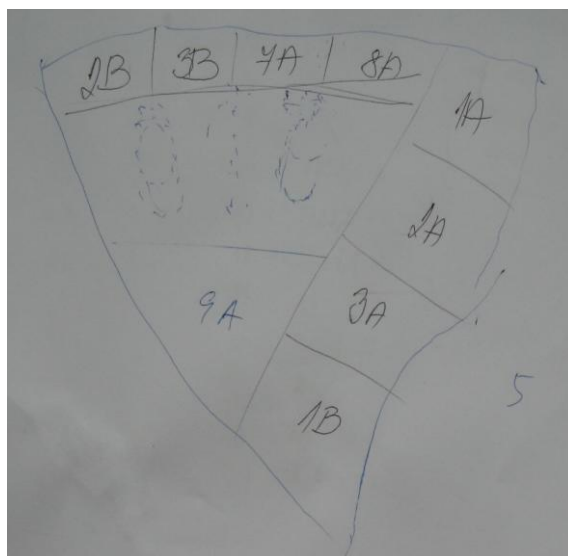
Obr. č. 10 : Kůže 25.9.08/3



Obr. č. 11: Kůže 25.9.08/4



Obr. č. 12: Kůže 25.9.08/5



## 4.4 Roztoky a suspenze

### 4.4.1 Složení a příprava pufru

<i>TRIS pufr</i>		<i>TRIZMA pufr</i>	
<i>Suroviny</i>	<i>Množství v g</i>	<i>Suroviny</i>	<i>Množství v g</i>
Trometamol	24,0	Trizma	31,6
Diazolidinylurea	6,0	Diazolidinylurea	6,0
Kyselina chlorovodíková	q.s.	Čištěná voda	ad 1000,0
Čištěná voda	ad 1000,0		

#### Postup přípravy:

- Roypustili jsme trometamolu asi v 900 ml vody
  - Změřili pH za stálého míchání (pH asi 12,3)
  - Přidali jsme diazolidinylureu (konc 0,6%, hodnota pH klesne)
  - Upravili pH na 7,1 přidáváním koncentrované HCl
  - Doplňili jsme pufr (pH 7,1) na konečný objem 1000,0 ml (v odměrné baňce)
- TRIS pufr o pH 7,1 při laboratorní teplotě 25°C (pH 7,4 při teplotě 32°C).

### 4.4.2 Složení a příprava donorových suspenzí - 1%

Pro permeační pokusy byla zvoleny takové donory, které složením představují určitý kompromis mezi požadavky na inaktivnost vůči kožním štěpům a mezi požadavky neinterferovat v UV oblasti detekce HPLC se stanovovanými látkami.

	<b>Suspenze s MP</b>	<b>suspenze s KL</b>
1.	MP + TRIS pufr	KL + TRIS pufr
2.	MP + (PG + TRIS pufr 2:3)	KL + (PG + TRIS pufr 2:3)
3.	MP + IPM	KL + IPM
4.	MP + (IPM + PO 2:3)	KL + (IPM + PO 2:3)

Postup přípravy:

A. příprava 1 a 3

Navážili jsme 1g MP (KL) na analytických vahách. Umístili jsme navážku do odměrné baňky a doplnili do 100g TRIS puforem. Promíchali.

B. příprava 2 a 4

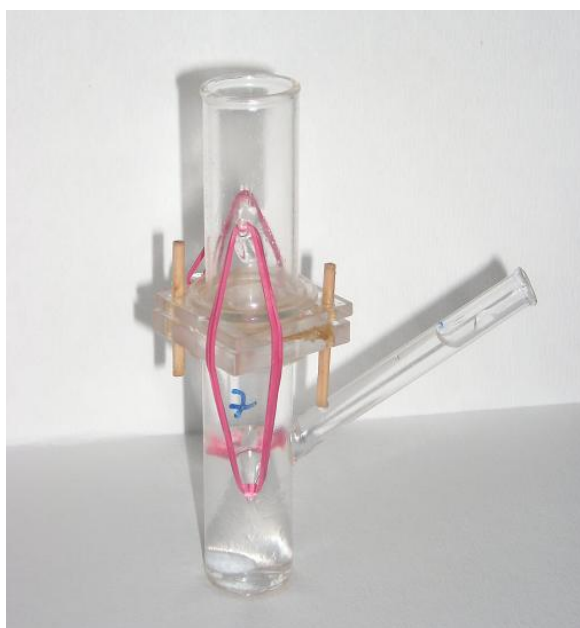
Navážili jsme 1g MP (KL) na analytických vahách a umístili do odměrné baňky. Na vahách jsme do jiné označené kádinky navážili 60g TRIS pufru (PO) a 40 g PG (IPM). Roztok jsme promíchali a přidali ho k MP (KL) v odměrné baňce, aby výsledná hmotnost byla 100 g.

Suspenze s MP jsme skladovali v termostatu přibližně při teplotě 35°C. Suspenze s KL v temnu a chladu (v lednici při teplotě 4,8°C obalené alobalem). Pokud došlo k rozpuštění látky, přidala se, aby u dna zůstal vždy nerozpuštěný podíl.

## 4.5 Uspořádání

Permeační pokusy se prováděly ve speciálních zařízeních, kterým se říká difúzní komůrky, které byly popsány již v teoretické části. V našem případě jsme používali Franzovy difúzní komůrky. Do spodní části jsme umístili 400 ml TRIS/TRIZMA pufru, tedy přibližně do poloviny raménka. Zbytek pufru jsme vpravili do připravené kalibrované zkumavky. Kůže byla upevněna v cele mezi dvě plexi sklíčka s otvory pro aplikaci testované látky a kontakt s receptorovou tekutinou. *Stratum corneum* byla zcela nahoře. V průběhu pokusu byla receptorová tekutina míchána.

Obr.č.13: Sestavená Francova difúzní buňka Obr.č.14: Buňky umístěné ve vodní lázni



Po kompletním sestavení cel a jejich naplněním akceptovanou fází se všechny umístily do vytemperované vodní lázně o teplotě 32°C. Teplotance trvala asi 1 hodinu.

Po vytemperování se začaly nanášet vzorky. Nanášením vzorku (donoru) se myslí umístění donoru do přesně vymezeného prostoru o známé ploše na povrch kůže. V souboru buněk používaných pro pokus měly vždy všechny buňky stejnou absorpční plochu 2 cm<sup>2</sup>. Tato plocha je vymezena plexi-sklíčkem. Na štěp kůže umístěné mezi komorami se nanášelo 0,6 ml suspenze léčiva. Vzorek se nanášel objemově pomocí mikropipety. Po nanesení vzorku se opatrně odejmula donorová komora a celá plocha se zakryla krycím sklíčkem (aby nedocházelo k odpařování vody ze vzorku), poté se buňky opět sestavily a zkontrolovaly, zda v donorové části nedošlo k průniku vzduchu a vzniku bubliny. Pokud ano, buňka se naklonila a bublina se vypudila do hrdla Franzovy cely.

Receptorová kapalina byla posléze odebírána v objemu 0,6 ml po celou dobu experimentu v určitých časových intervalech v závislosti na množství látky či možné rychlosti průchodu testované substance. Množství odebraného vzorku bylo doplněno na 0,6 ml pufrou.

## 4.6 Teplota

Změna v kožní teplotě může ovlivňovat absorpční proces, tzn. že difuze je teplotně závislá. Receptorová tekutina v kontaktu s kůží musela být udržována na konstantní teplotě, většinou  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , což je považováno za teplotu lidského těla. Teplota se kontrolovala a zaznamenávala průběžně při odebírání vzorků receptorové tekutiny v průběhu pokusu. K udržování konstantní teploty se používala vodní lázeň s termostatem.

## 4.7 Podmínky pro stanovení methylparabenu pomocí HPLC

Kolona: Agilent Elipse XDB-C18 (velikost částic  $5 \mu\text{m}$ , délka 150 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, S/N USKH025859)

Mobilní fáze: acetonitril : voda pro HPLC, 35:65 + 200  $\mu\text{ml}/100\text{ml}$  kyseliny mravenčí

Průtoková rychlost: 1,5ml/min

Nasřik: 30  $\mu\text{l}$

Detektor: UV spektrofotometrický, při vlnové délce 256 nm

## 4.8 Podmínky pro stanovení kyseliny listové pomocí HPLC

Kolona Agilent Elipse XDB-C18 (velikost částic  $5 \mu\text{m}$ , délka 250 mm, vnitřní průměr 4,6 mm, S/N USKH025859).

Mobilní fáze:  $\text{KH}_2\text{PO}_3$  11, 16 g/l +  $\text{K}_2\text{HPO}_3$  5,5 g/l : Methanol, 85 : 15

Průtoková rychlost: 1ml/min

Nasřik: 20  $\mu\text{l}$

Detektor: UV spektrofotometrický, při vlnové délce 280 nm

## 5 DOKUMENTACE

### Protokol 1

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o/1cm^2$

$V_o = 19,4$

Kůže: 25.9.08/2

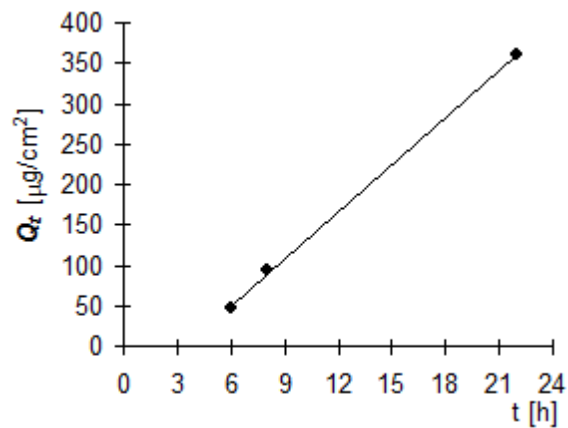
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	0,464	0,6	0,483	93,7	46,9
8	0,944	1,5	0,959	186,0	93,0
22	3,710	0,6	3,714	720,5	360,3

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	46,9	50,3
8	93,0	89,1
22	360,3	360,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 19,40373
Abs. člen	q = -66,136
Korelační koef.	r = 0,99976



## Protokol 2

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o/1cm^2$

$V_o = 18,8$

Kůže: 25.9.08/2

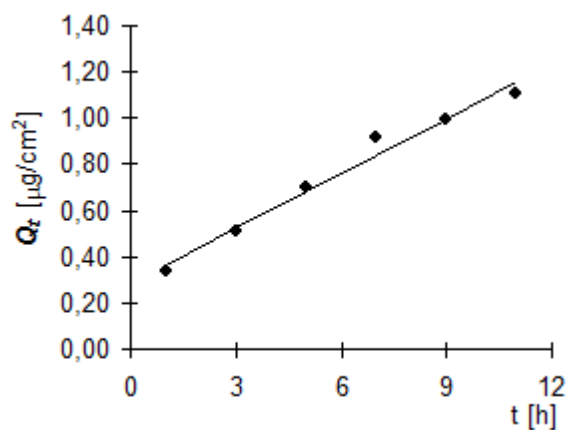
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,004	0,6	0,004	0,7	0,3
3	0,005	0,6	0,005	1,0	0,5
5	0,007	1,5	0,007	1,4	0,7
7	0,009	0,6	0,010	1,8	0,9
9	0,010	0,6	0,011	2,0	1,0
11	0,011	0,6	0,012	2,2	1,1

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,3	0,4
3	0,5	0,5
5	0,7	0,7
7	0,9	0,8
9	1,0	1,0
11	1,1	1,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,078739
Abs. člen	q = 0,288322
Korelační koef.	r = 0,988661



## Protokol 3

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Kůže: 25.9.08/4

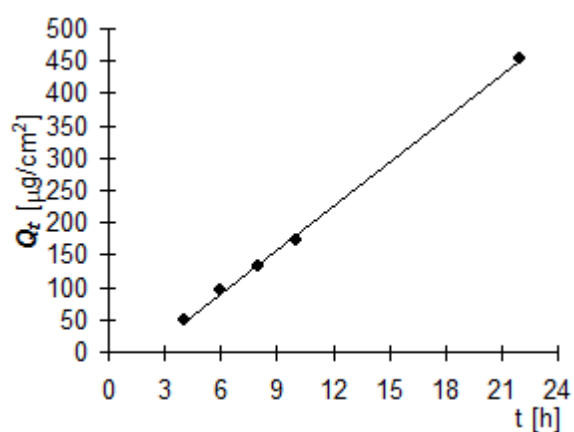
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,522	0,6	0,522	96,0	48,0
6	1,011	0,6	1,028	189,1	94,6
8	1,418	0,6	1,451	267,0	133,5
10	1,833	0,6	1,880	346,0	173,0
22	4,867	0,6	4,928	906,8	453,4

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	48,0	48,0
6	94,6	94,6
8	133,5	133,5
10	173,0	173,0
22	453,4	453,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 22,53743
Abs. člen	q = -44,8772
Korelační koef.	r = 0,999553





**Protokol 4**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 18,2

Kůže: 25.9.08/4

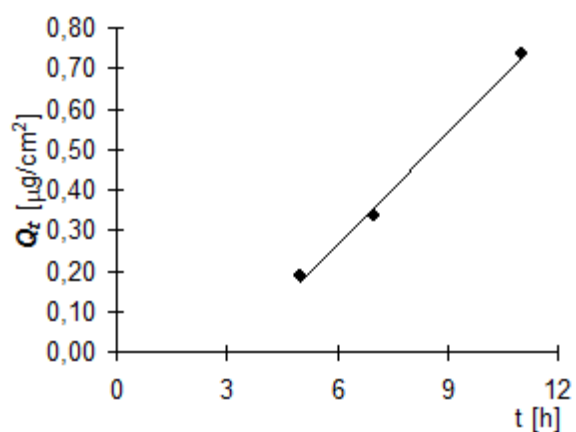
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2
7	0,004	0,6	0,004	0,7	0,3
11	0,008	0,6	0,008	1,5	0,7

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,2	0,2
7	0,3	0,3
11	0,7	0,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 0,092293
Abs. člen	q = -0,28886
Korelační koef.	r = 0,99768



**Protokol 5**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Kůže: 25.9.08/2

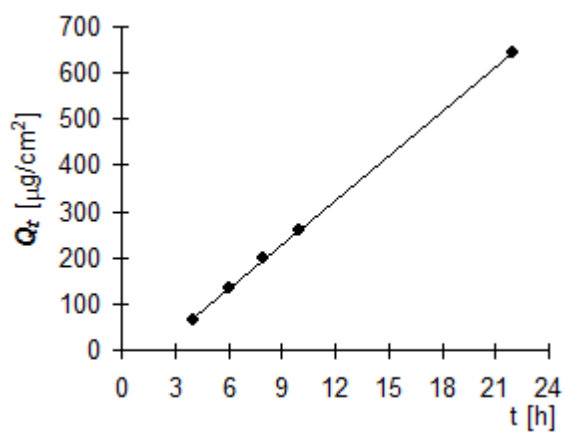
Donor: IPM

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,693	0,6	0,693	130,9	65,5
6	1,379	0,6	1,401	264,7	132,4
8	2,077	0,6	2,121	400,9	200,4
10	2,672	0,6	2,739	517,6	258,8
22	6,712	0,6	6,799	1 285,1	642,5

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	65,5	68,3
6	132,4	132,2
8	200,4	196,1
10	258,8	259,9
22	642,5	643,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 31,93645
Abs. člen	q = -59,4399
Korelační koef.	r = 0,999929



## Protokol 6

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,2$

Kůže: 25.9.08/2

Donor: IPM

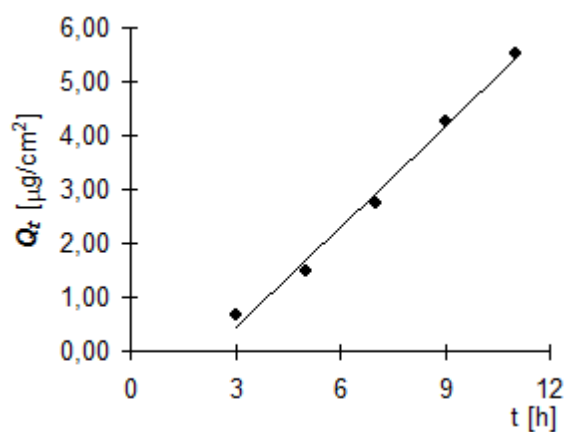
Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,006	0,6	0,007	1,3	0,7
5	0,016	0,6	0,016	3,0	1,5
7	0,030	0,6	0,030	5,5	2,8
9	0,046	0,6	0,047	8,5	4,2
11	0,059	0,6	0,061	11,1	5,5

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
3	0,7	0,4
5	1,5	1,7
7	2,8	2,9
9	4,2	4,2
11	5,5	5,4

### Parametry regrese

Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,625444
Abs. člen	q = -1,44148
Korelační koef.	r = 0,995837



# Protokol 7

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,4$

Kůže: 25.9.08/4

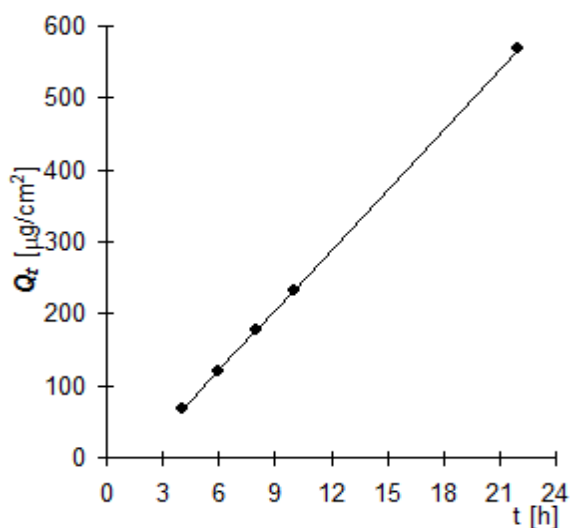
Donor: IPM

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,784	0,6	0,784	136,5	68,2
6	1,366	0,6	1,393	242,4	121,2
8	1,987	0,6	2,035	354,1	177,0
10	2,601	0,6	2,672	464,9	232,4
22	6,433	0,6	6,525	1 135,4	567,7

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	68,2	66,4
6	121,2	122,0
8	177,0	177,7
10	232,4	233,3
22	567,7	567,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 27,82094
Abs. člen	q = -44,8904
Korelační koef.	r = 0,999982



## Protokol 8

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17$

Kůže: 25.9.08/4

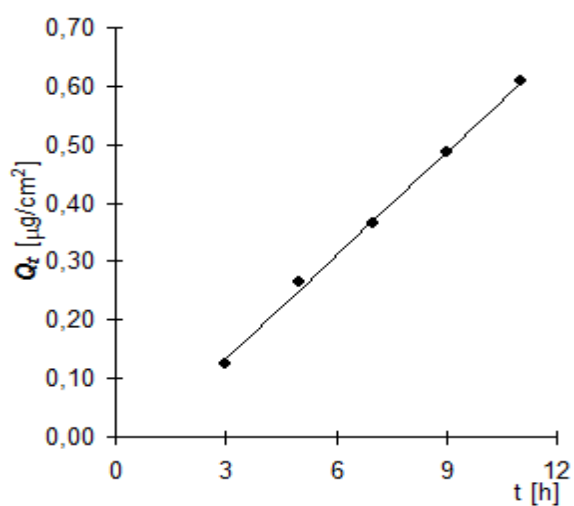
Donor: IPM

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,001	0,6	0,001	0,3	0,1
5	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
7	0,004	0,6	0,004	0,7	0,4
9	0,006	0,6	0,006	1,0	0,5
11	0,007	0,6	0,007	1,2	0,6

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
3	0,1	0,1
5	0,3	0,3
7	0,4	0,4
9	0,5	0,5
11	0,6	0,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,059294
Abs. člen	q = -0,04517
Korelační koef.	r = 0,99907



## Protokol 9

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,5$

Kůže: 25.9.08/2

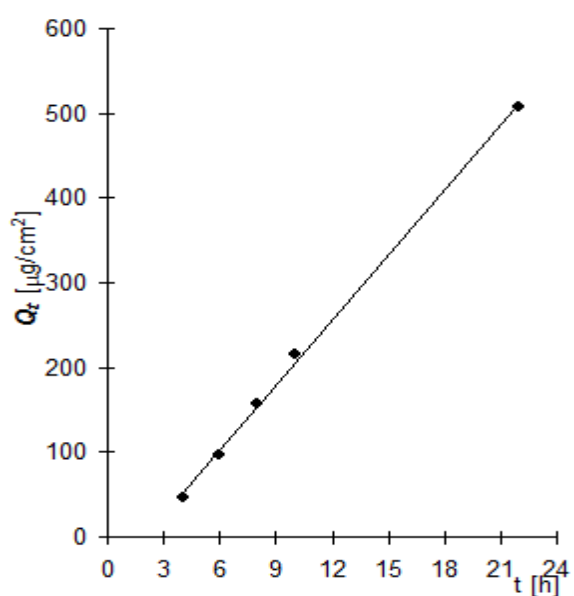
Donor: PUFR

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,504	0,6	0,504	93,3	46,6
6	1,035	0,6	1,052	194,5	97,3
8	1,670	0,6	1,704	315,3	157,7
10	2,266	0,6	2,321	429,4	214,7
22	5,415	0,6	5,491	1 015,8	507,9

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	46,6	51,5
6	97,3	102,6
8	157,7	153,7
10	214,7	204,8
22	507,9	511,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 25,55175
Abs. člen	q = -50,6899
Korelační koef.	r = 0,99932



## Protokol 10

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 25.9.08/2

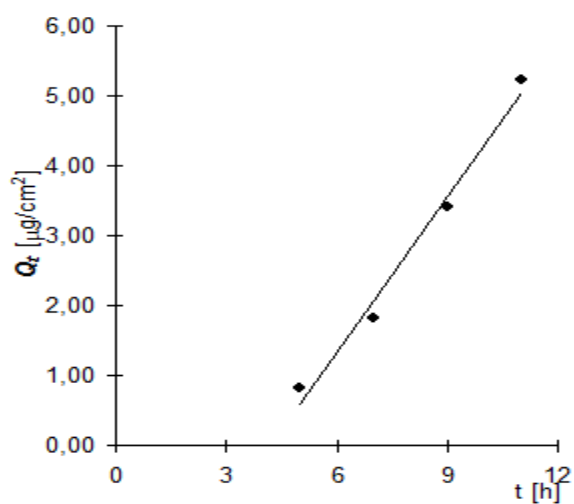
Donor: PUFR

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,009	0,6	0,009	1,6	0,8
7	0,020	0,6	0,021	3,6	1,8
9	0,038	0,6	0,039	6,8	3,4
11	0,058	0,6	0,059	10,5	5,2

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,8	0,6
7	1,8	2,1
9	3,4	3,6
11	5,2	5,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,743522
Abs. člen	q = -3,12857
Korelační koef.	r = 0,992269



## Protokol 11

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,3$

Kůže: 25.9.08/4

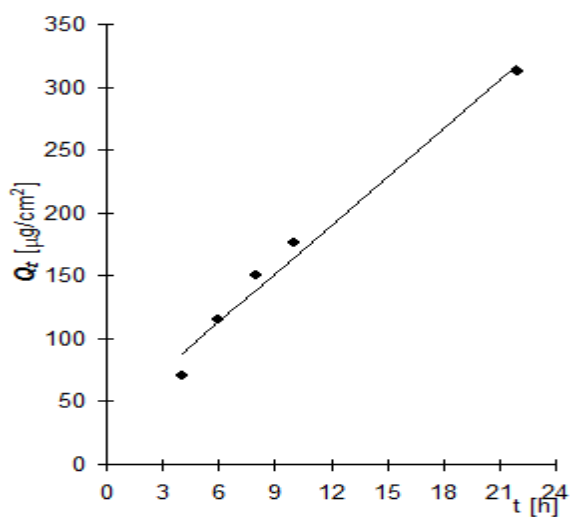
Donor: PUFR

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,732	0,6	0,732	141,4	70,7
6	1,165	0,6	1,188	229,2	114,6
8	1,517	0,6	1,554	300,0	150,0
10	1,777	0,6	1,826	352,4	176,2
22	3,177	0,6	3,234	624,1	312,1

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	70,7	87,8
6	114,6	113,5
8	150,0	139,1
10	176,2	164,7
22	312,1	318,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 12,81078
Abs. člen	q = 36,59702
Korelační koef.	r = 0,99118





## Protokol 12

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,7$

Kůže: 25.9.08/4

Donor: PUFR

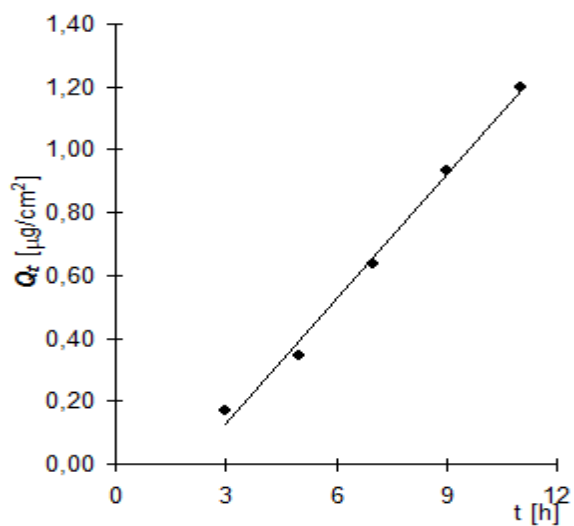
Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
5	0,004	0,6	0,004	0,7	0,3
7	0,007	0,6	0,007	1,3	0,6
9	0,010	0,6	0,010	1,9	0,9
11	0,013	0,6	0,013	2,4	1,2

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
3	0,2	0,1
5	0,3	0,4
7	0,6	0,7
9	0,9	0,9
11	1,2	1,2

### Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,132217$
Abs. člen	$q = -0,26886$
Korelační koef.	$r = 0,996373$



## Protokol 13

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,3$

Kůže: 25.9.08/4

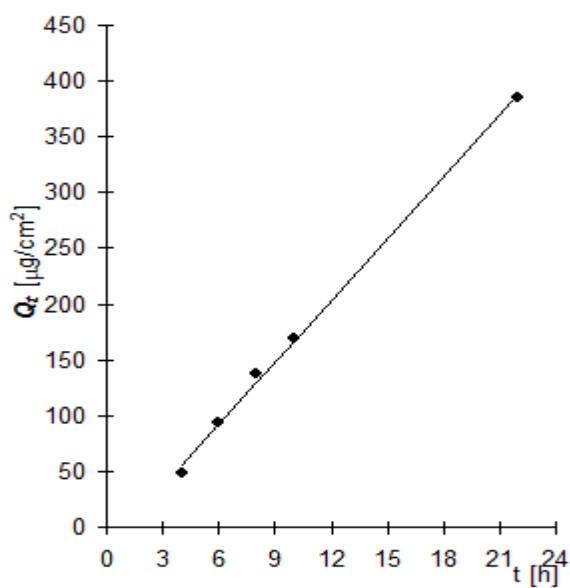
Donor: IPM + PO

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,493	0,6	0,493	95,2	47,6
6	0,951	0,6	0,967	186,6	93,3
8	1,388	0,6	1,418	273,7	136,9
10	1,708	0,6	1,752	338,1	169,0
22	3,937	0,6	3,992	770,4	385,2

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	47,6	55,7
6	93,3	92,6
8	136,9	129,5
10	169,0	166,4
22	385,2	387,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 18,44868
Abs. člen	q = -18,0904
Korelační koef.	r = 0,999016



# Protokol 14

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,6$

Kůže: 25.9.08/4

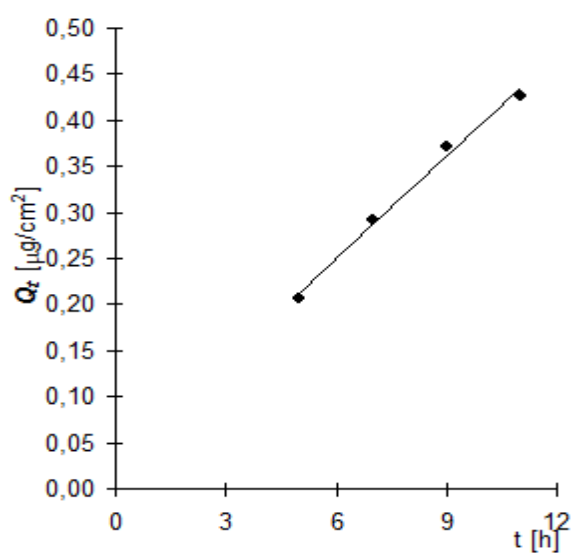
Donor: IPM + PO

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2
7	0,003	0,6	0,003	0,6	0,3
9	0,004	0,6	0,004	0,7	0,4
11	0,004	0,6	0,005	0,9	0,4

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,2	0,2
7	0,3	0,3
9	0,4	0,4
11	0,4	0,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 0,036865$
Abs. člen	$q = 0,029145$
Korelační koef.	$r = 0,995466$



# Protokol 15

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 25.9.08/4

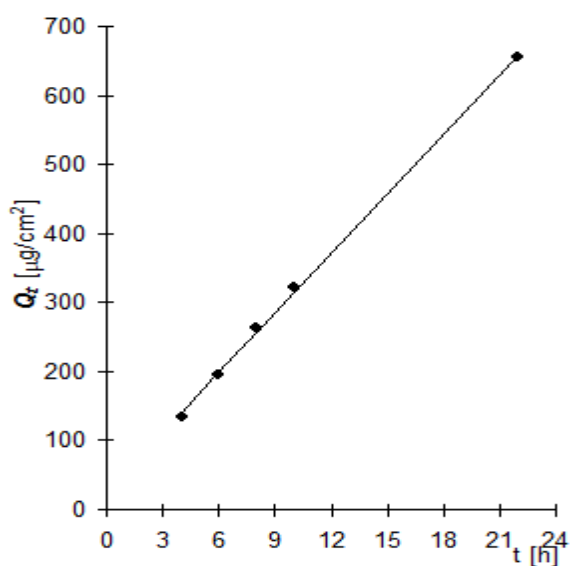
Donor: IPM + PO

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,510	0,6	1,510	265,7	132,9
6	2,172	0,6	2,224	391,4	195,7
8	2,908	0,6	2,984	525,1	262,6
10	3,567	0,6	3,669	645,7	322,9
22	7,314	0,6	7,439	1 309,2	654,6

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	132,9	141,2
6	195,7	198,7
8	262,6	256,2
10	322,9	313,7
22	654,6	658,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 28,75216
Abs. člen	q = 26,19526
Korelační koef.	r = 0,999337



## Protokol 16

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,8$

Kůže: 25.9.08/4

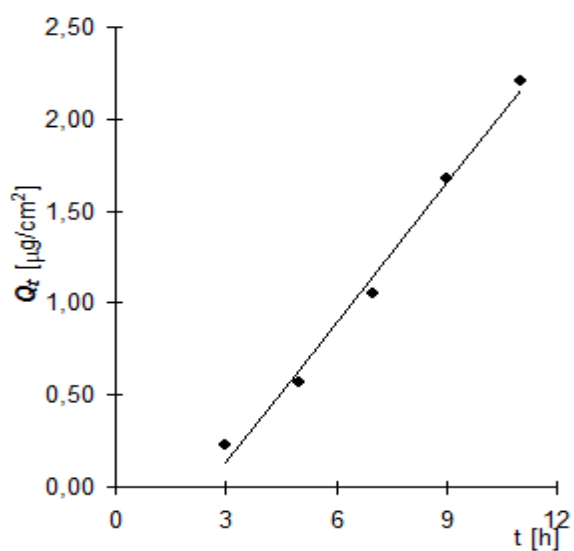
Donor: IPM + PO

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,003	0,6	0,003	0,5	0,2
5	0,007	0,6	0,007	1,1	0,6
7	0,012	0,6	0,012	2,1	1,0
9	0,019	0,6	0,020	3,3	1,7
11	0,026	0,6	0,026	4,4	2,2

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
3	0,2	0,1
5	0,6	0,6
7	1,0	1,1
9	1,7	1,7
11	2,2	2,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,253641$
Abs. člen	$q = -0,62984$
Korelační koef.	$r = 0,994954$



**Protokol 17**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,8$

Kůže: 25.9.08/10

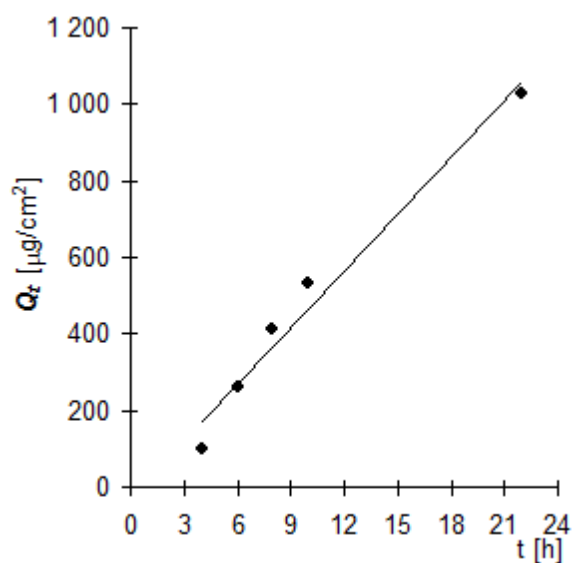
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,181	0,6	1,181	198,4	99,2
6	3,052	0,6	3,094	519,8	259,9
8	4,808	0,6	4,919	826,4	413,2
10	6,151	0,6	6,327	1 063,0	531,5
22	12,015	0,6	12,241	2 056,4	1 028,2

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	99,2	170,1
6	259,9	268,9
8	413,2	367,6
10	531,5	466,4
22	1028,2	1059,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 49,38608
Abs. člen	q = -27,4608
Korelační koef.	r = 0,987563



## Protokol 18

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16$

Kůže: 25.9.08/10

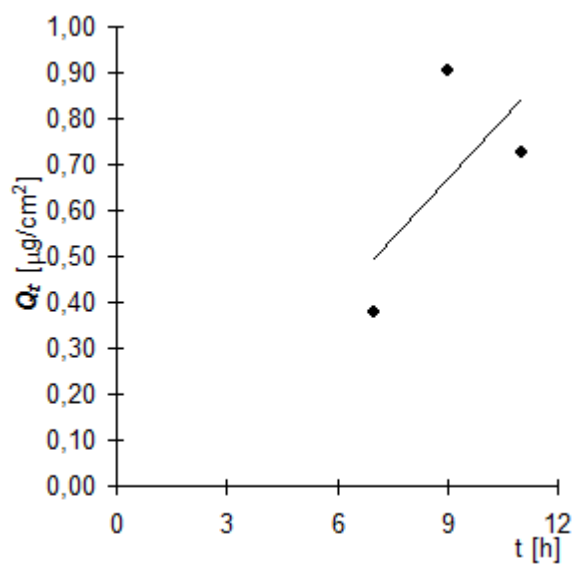
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,005	0,6	0,005	0,8	0,4
9	0,011	0,6	0,011	1,8	0,9
11	0,009	0,6	0,009	1,4	0,7

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
7	0,4	0,5
9	0,9	0,7
11	0,7	0,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 3$
Flux	$J = 0,0864$
Abs. člen	$q = -0,10853$
Korelační koef.	$r = 0,646249$



## Protokol 19

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,3$

Kůže: 25.9.08/10

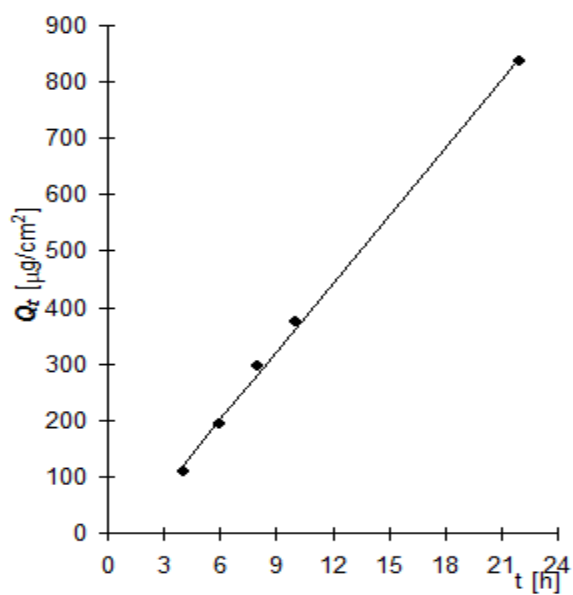
Donor: IPM

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,262	0,6	1,262	218,4	109,2
6	2,192	0,6	2,235	386,7	193,4
8	3,342	0,6	3,419	591,6	295,8
10	4,204	0,6	4,323	747,8	373,9
22	9,512	0,6	9,661	1 671,4	835,7

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	109,2	121,3
6	193,4	201,4
8	295,8	281,5
10	373,9	361,6
22	835,7	842,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 40,04217$
Abs. člen	$q = -38,8256$
Korelační koef.	$r = 0,999052$





**Protokol 20**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_f$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 25.9.08/10

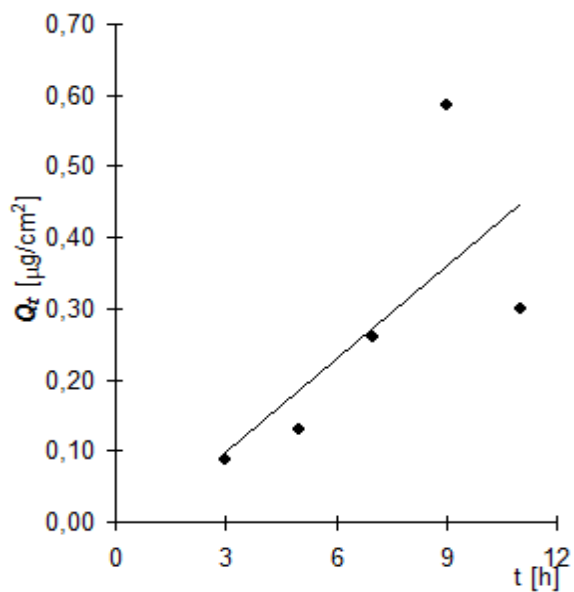
Donor: IPM

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_f$
3	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
5	0,002	0,6	0,002	0,3	0,1
7	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
9	0,007	0,6	0,007	1,2	0,6
11	0,003	0,6	0,004	0,6	0,3

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
3	0,1	0,1
5	0,1	0,2
7	0,3	0,3
9	0,6	0,4
11	0,3	0,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,043861$
Abs. člen	$q = -0,03459$
Korelační koef.	$r = 0,707117$



**Protokol 21**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 19,4

Kůže: 25.9.08/10

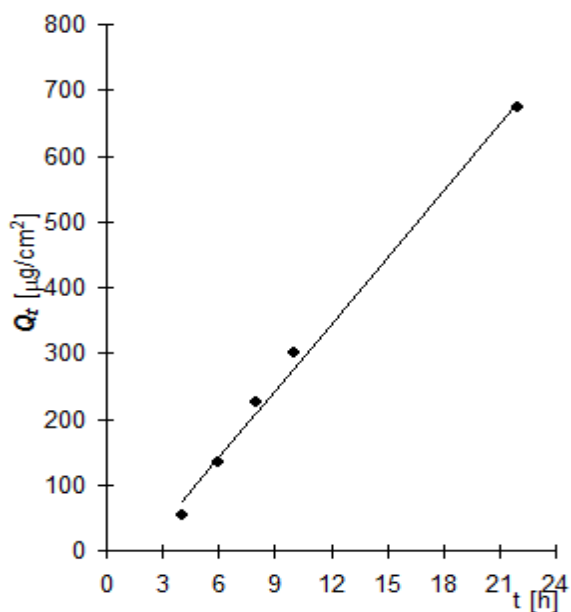
Donor: PUFR

Měření: MP/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,563	0,6	0,563	109,3	54,6
6	1,356	0,6	1,373	266,4	133,2
8	2,287	0,6	2,330	452,0	226,0
10	3,038	0,6	3,111	603,4	301,7
22	6,838	0,6	6,934	1 345,2	672,6

T	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	54,6	74,9
6	133,2	142,5
8	226,0	210,0
10	301,7	277,6
22	672,6	683,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 33,79231
Abs. člen	q = -60,2945
Korelační koef.	r = 0,996859



**Protokol 22**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,6$

Kůže: 25.9.08/10

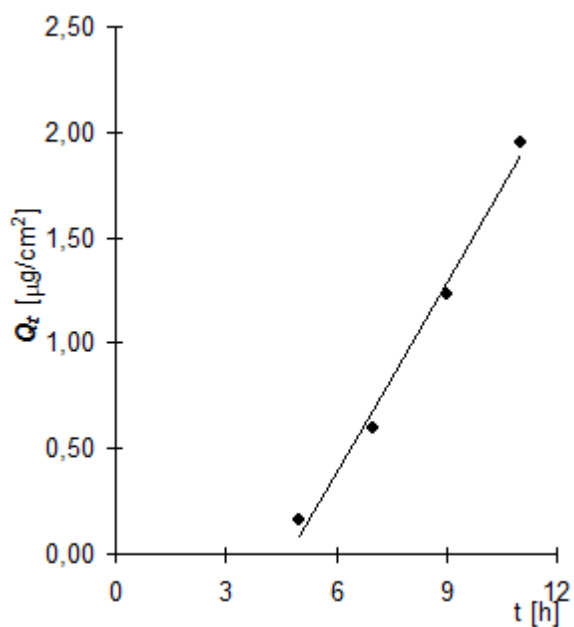
Donor: PUFR

Měření: KL/1

T	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
7	0,006	0,6	0,006	1,2	0,6
9	0,013	0,6	0,013	2,5	1,2
11	0,021	0,6	0,021	3,9	2,0

T	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,2	0,1
7	0,6	0,7
9	1,2	1,3
11	2,0	1,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,301113
Abs. člen	q = -1,4213
Korelační koef.	r = 0,994541



Protokol 23

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,2$

Kůže: 25.9.08/7

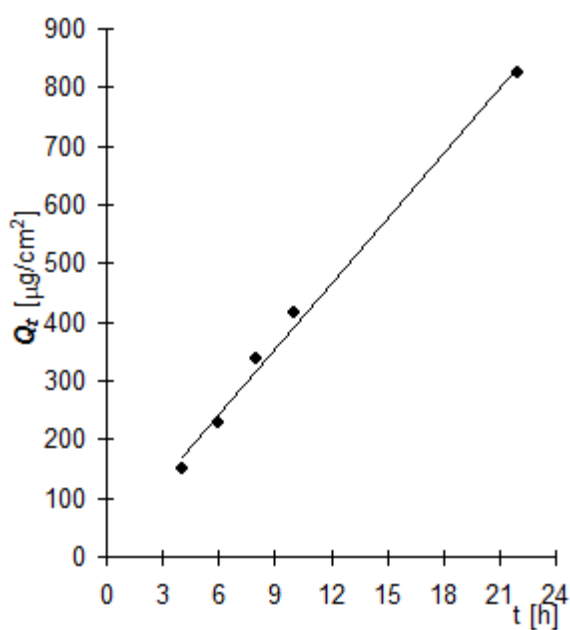
Donor: IPM + PO

Měření: MP/1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,555	0,6	1,555	298,6	149,3
6	2,347	0,6	2,396	459,9	230,0
8	3,433	0,6	3,508	673,5	336,7
10	4,207	0,6	4,316	828,7	414,4
22	8,453	0,6	8,588	1 648,9	824,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	149,3	168,8
6	230,0	242,9
8	336,7	316,9
10	414,4	391,0
22	824,4	835,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 37,01994
Abs. člen	q = 20,76553
Korelační koef.	r = 0,997084



**Protokol 24**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,7$

Kůže: 25.9.08/7

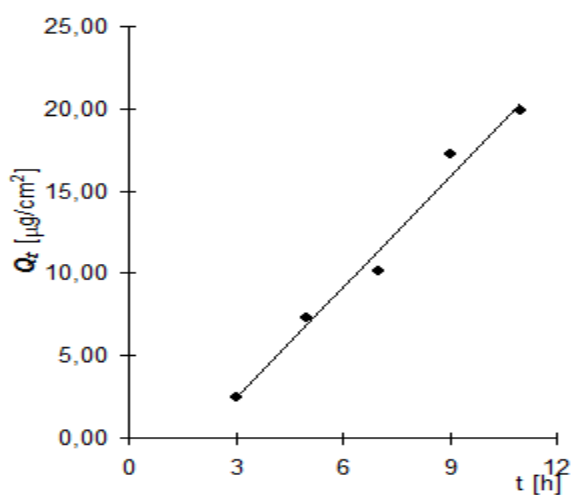
Donor: IPM + PO

Měření: KL/1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,026	0,6	0,026	5,0	2,5
5	0,077	0,6	0,078	14,6	7,3
7	0,105	0,6	0,108	20,2	10,1
9	0,181	0,6	0,185	34,5	17,3
11	0,206	0,6	0,212	39,7	19,9

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
3	2,5	2,5
5	7,3	6,9
7	10,1	11,4
9	17,3	15,9
11	19,9	20,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 2,235937
Abs. člen	q = -4,2502
Korelační koef.	r = 0,990106



**Protokol 25**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,4$

Kůže: 25.9.08/7

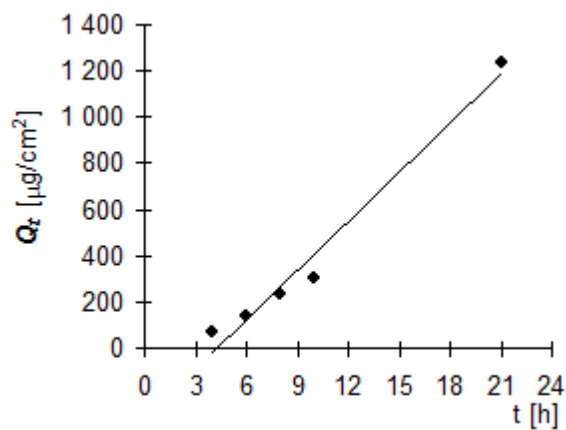
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,780	0,6	0,780	135,8	67,9
6	1,529	0,6	1,556	270,8	135,4
8	2,624	1,5	2,678	466,0	233,0
10	3,214	0,6	3,445	599,4	299,7
21	14,058	0,6	14,177	2 466,8	1 233,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	67,9	-17,7
6	135,4	124,2
8	233,0	266,1
10	299,7	408,1
21	1233,4	1188,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 70,9639847
Abs. člen	q = -301,57812
Korelační koef.	r = 0,98770996



**Protokol 26**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17$

Kůže: 25.9.08/7

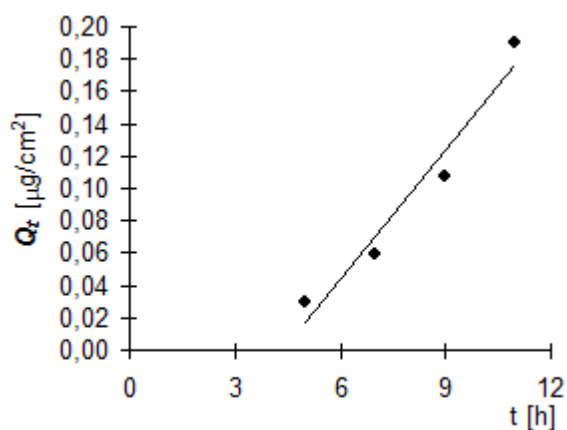
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,000	1,5	0,000	0,1	0,0
7	0,001	0,6	0,001	0,1	0,1
9	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
11	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,0	0,0
7	0,1	0,1
9	0,1	0,1
11	0,2	0,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,026514
Abs. člen	q = -0,1155
Korelační koef.	r = 0,977181



**Protokol 27**

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

$V_o = 18$

Kůže: 25.9.08/8

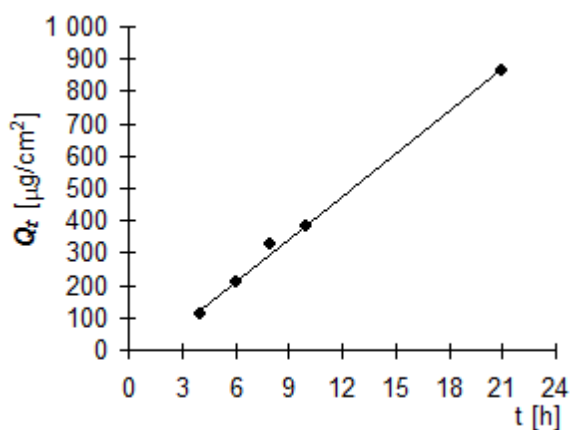
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,263	0,6	1,263	227,3	113,6
6	2,301	0,6	2,343	421,8	210,9
8	3,524	0,6	3,603	648,5	324,2
10	4,155	0,6	4,275	769,5	384,7
21	9,461	0,6	9,604	1 728,6	864,3

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	113,6	113,6
6	210,9	210,9
8	324,2	324,2
10	384,7	384,7
21	864,3	864,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 43,627282$
Abs. člen	$q = -47,984149$
Korelační koef.	$r = 0,99890218$





**Protokol 28**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 25.9.08/8

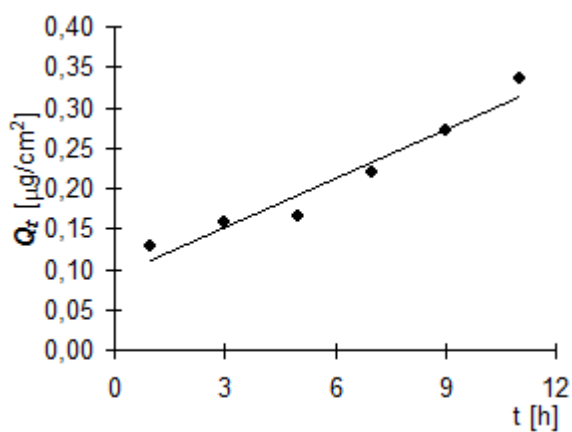
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,001	0,6	0,001	0,3	0,1
3	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
5	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
7	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2
9	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
11	0,004	0,6	0,004	0,7	0,3

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	0,1	0,1
3	0,2	0,2
5	0,2	0,2
7	0,2	0,2
9	0,3	0,3
11	0,3	0,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,020425
Abs. člen	q = 0,090072
Korelační koef.	r = 0,972507



**Protokol 29**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 25.9.08/5

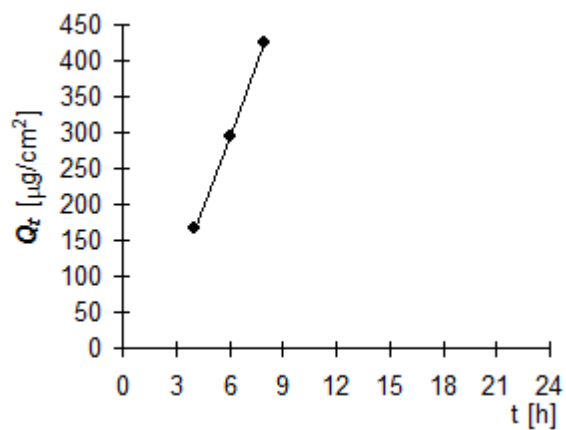
Donor: IPM

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,879	0,6	1,879	330,6	165,3
6	3,275	0,6	3,339	587,6	293,8
8	4,706	0,6	4,819	848,2	424,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	165,3	165,0
6	293,8	294,4
8	424,1	423,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 64,6959271
Abs. člen	q = -93,773123
Korelační koef.	r = 0,99999165



**Protokol 30**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,2$

Kůže: 25.9.08/5

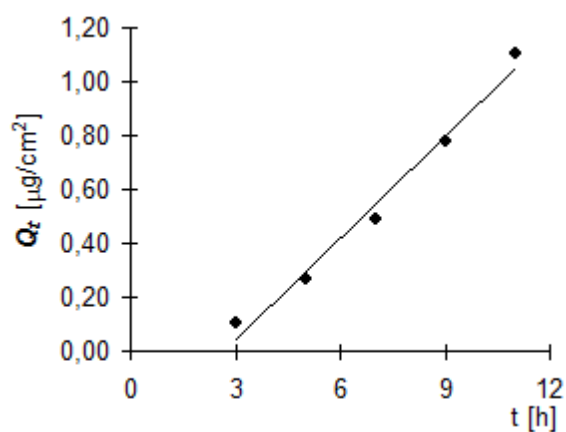
Donor: IPM

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
5	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
7	0,006	0,6	0,006	1,0	0,5
9	0,009	0,6	0,009	1,6	0,8
11	0,013	0,6	0,013	2,2	1,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
3	0,1	0,0
5	0,3	0,3
7	0,5	0,5
9	0,8	0,8
11	1,1	1,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,125769
Abs. člen	q = -0,33123
Korelační koef.	r = 0,991161



**Protokol 31**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,4$

Kůže: 25.9.08/8

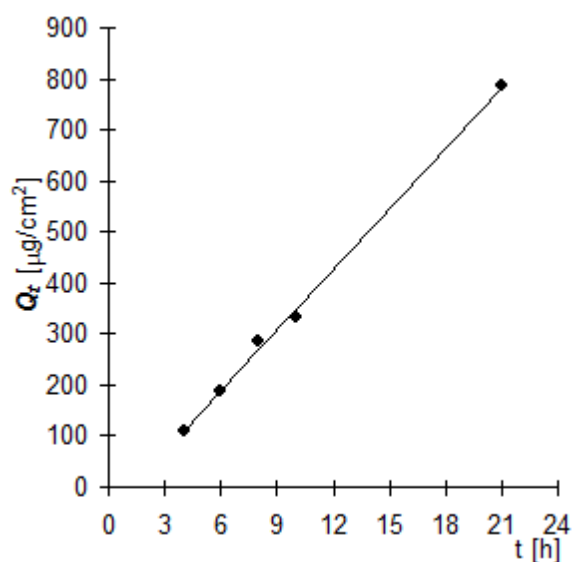
Donor: IPM

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,119	0,6	1,119	217,0	108,5
6	1,907	0,6	1,942	376,7	188,4
8	2,887	0,6	2,947	571,7	285,8
10	3,324	0,6	3,415	662,6	331,3
21	8,003	0,6	8,109	1 573,1	786,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	108,5	109,9
6	188,4	189,3
8	285,8	268,7
10	331,3	348,0
21	786,5	784,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 39,6825399
Abs. člen	q = -48,781443
Korelační koef.	r = 0,998955



**Protokol 32**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_f$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: 25.9.08/8

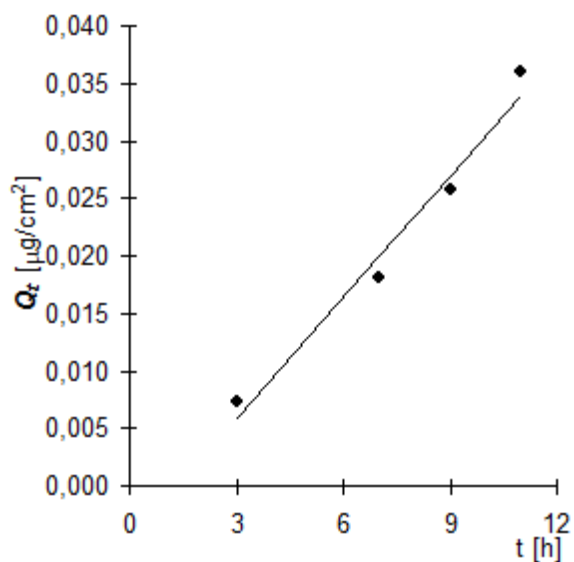
Donor: IPM

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_f$
3	0,000	0,6	0,000	0,0	0,0
7	0,000	0,6	0,000	0,0	0,0
9	0,000	0,6	0,000	0,1	0,0
11	0,000	0,6	0,000	0,1	0,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
3	0,0	0,0
7	0,0	0,0
9	0,0	0,0
11	0,0	0,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,003514
Abs. člen	q = -0,00458
Korelační koef.	r = 0,987868



**Protokol 33**

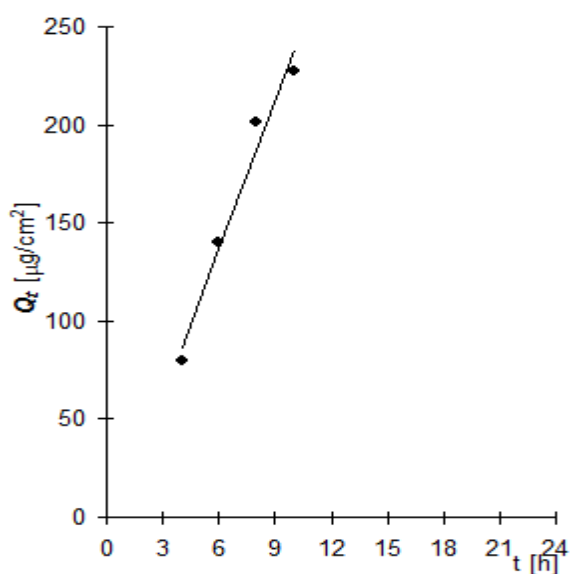
$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,4$
Kůže: 25.9.08/5
Donor: PUFR
Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,915	0,6	0,915	159,1	79,6
6	1,582	0,6	1,613	280,7	140,4
8	2,261	0,6	2,317	403,2	201,6
10	2,535	0,6	2,615	455,0	227,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	79,6	86,5
6	140,4	137,0
8	201,6	187,5
10	227,5	238,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 25,2484552
Abs. člen	q = -14,494614
Korelační koef.	r = 0,98586999



Protokol 34

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

$V_o = 16,8$

Kůže: 25.9.08/5

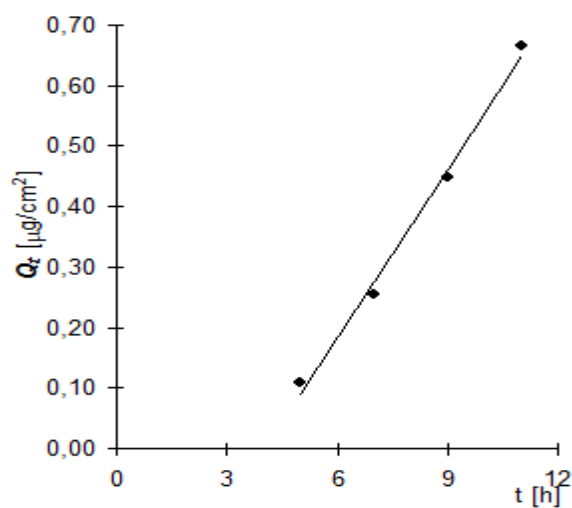
Donor: PUFR

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
7	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
9	0,005	0,6	0,005	0,9	0,4
11	0,008	0,6	0,008	1,3	0,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,1	0,1
7	0,3	0,3
9	0,4	0,5
11	0,7	0,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,093328
Abs. člen	q = -0,37749
Korelační koef.	r = 0,996335



Protokol 35

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,8$

Kůže: 25.9.08/8

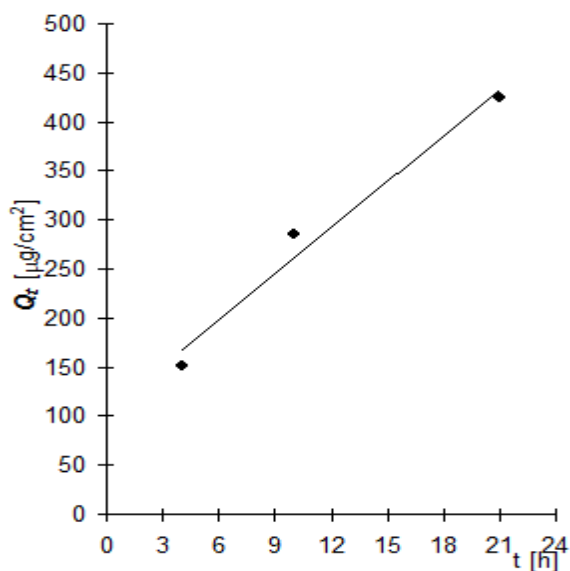
Donor: PUFR

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,704	0,6	1,704	303,4	151,7
10	3,169	0,6	3,200	569,6	284,8
21	4,669	0,6	4,777	850,3	425,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	151,7	167,0
10	284,8	261,1
21	425,2	433,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 15,6773106
Abs. člen	q = 104,312807
Korelační koef.	r = 0,98834984





Protokol 36

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 25.9.08/8

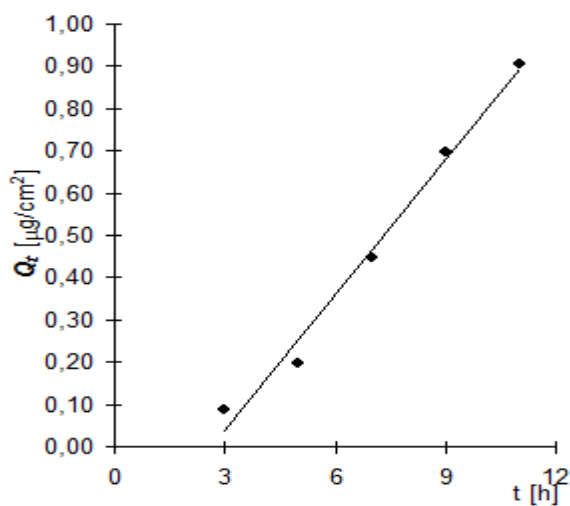
Donor: PUFR

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
5	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2
7	0,005	0,6	0,005	0,9	0,4
9	0,008	0,6	0,008	1,4	0,7
11	0,011	0,6	0,011	1,8	0,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
3	0,1	0,0
5	0,2	0,3
7	0,4	0,5
9	0,7	0,7
11	0,9	0,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,106884
Abs. člen	q = -0,28202
Korelační koef.	r = 0,993075



Protokol 37

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: 25.9.08/8

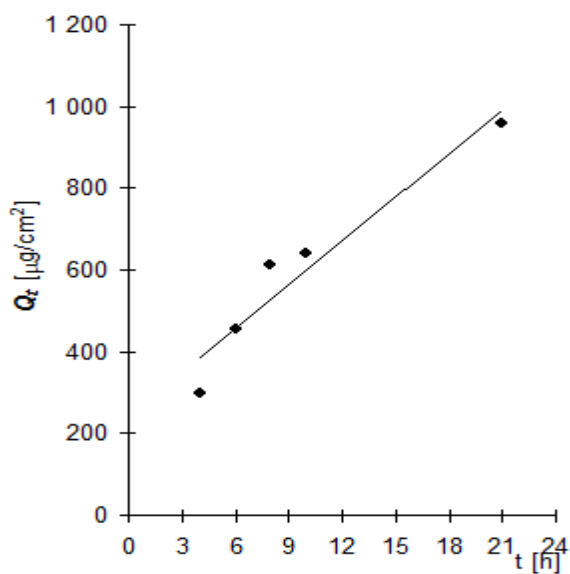
Donor: IPM + PO

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	3,145	0,6	3,145	597,6	298,8
6	4,702	0,6	4,801	912,3	456,1
8	6,283	0,6	6,434	1 222,5	611,3
10	6,555	0,6	6,758	1 284,1	642,0
21	9,872	0,6	10,085	1 916,2	958,1

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	298,8	386,8
6	456,1	458,0
8	611,3	529,2
10	642,0	600,4
21	958,1	991,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 35,5908356
Abs. člen	q = 244,468035
Korelační koef.	r = 0,96334641



Protokol 38

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,8$

Kůže: 25.9.08/8

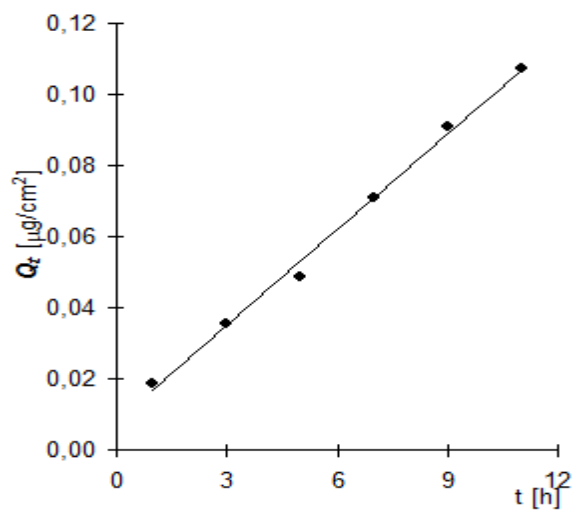
Donor: IPM + PO

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,000	0,6	0,000	0,0	0,0
3	0,000	0,6	0,000	0,1	0,0
5	0,001	0,6	0,001	0,1	0,0
7	0,001	0,6	0,001	0,1	0,1
9	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
11	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,0	0,0
3	0,0	0,0
5	0,0	0,1
7	0,1	0,1
9	0,1	0,1
11	0,1	0,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,009028
Abs. člen	q = 0,007809
Korelační koef.	r = 0,997738



**Protokol 39**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Kůže: 25.9.08/8

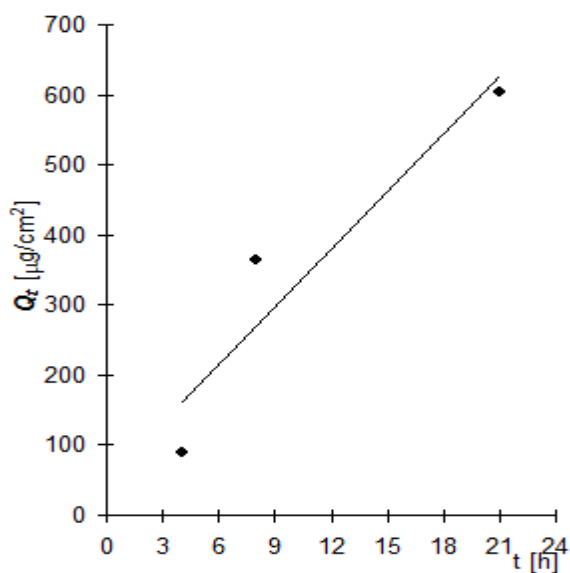
Donor: IPM + PO

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	0,941	0,6	0,941	177,8	88,9
8	3,851	0,6	3,858	729,2	364,6
21	6,391	0,6	6,395	1 208,7	604,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	88,9	160,9
8	364,6	270,5
21	604,3	626,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 27,3870363
Korelační koef.	r = 0,94378519



**Protokol 40**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Kůže: 25.9.08/8

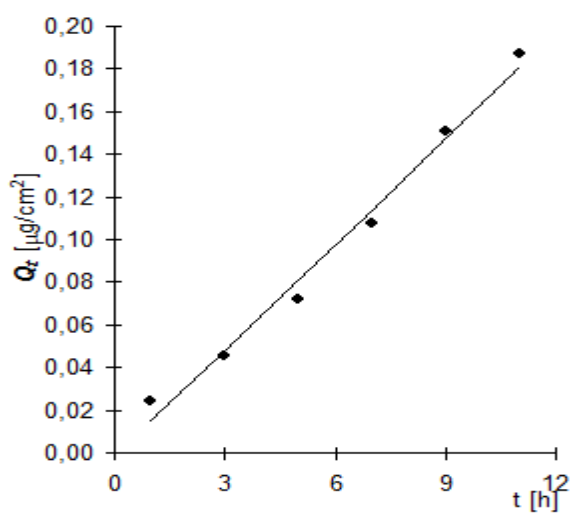
Donor: IPM + PO

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
1	0,000	0,6	0,000	0,0	0,0
3	0,000	0,6	0,000	0,1	0,0
5	0,001	0,6	0,001	0,1	0,1
7	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
9	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
11	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
1	0,0	0,0
3	0,0	0,0
5	0,1	0,1
7	0,1	0,1
9	0,2	0,1
11	0,2	0,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,01663
Abs. člen	q = -0,00199
Korelační koef.	r = 0,99296



**Protokol 41**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,5$

Kůže: 25.9.08/8

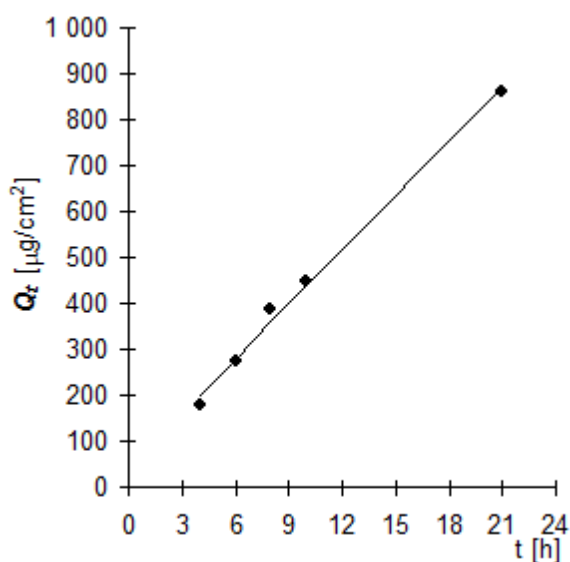
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	2,164	0,6	2,164	357,1	178,5
6	3,219	0,6	3,298	544,1	272,0
8	4,595	0,6	4,715	778,0	389,0
10	5,273	0,6	5,444	898,3	449,2
21	10,211	0,6	10,409	1 717,5	858,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	178,5	201,9
6	272,0	280,4
8	389,0	358,9
10	449,2	437,4
21	858,8	869,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 39,2439399
Abs. člen	q = 44,9104113
Korelační koef.	r = 0,99677044



**Protokol 42**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,6$

Kůže: 25.9.08/8

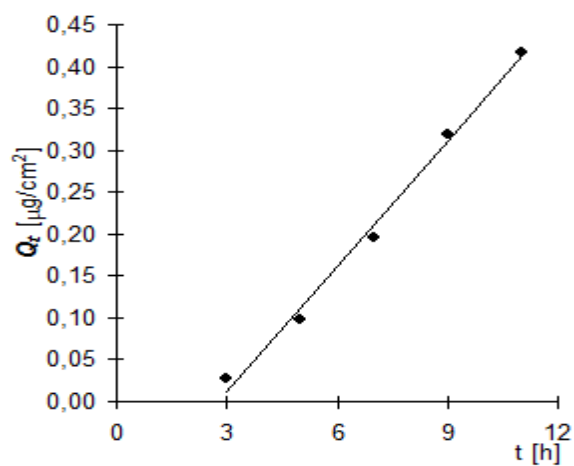
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,000	0,6	0,000	0,1	0,0
5	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
7	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2
9	0,004	0,6	0,004	0,6	0,3
11	0,005	0,6	0,005	0,8	0,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
3	0,0	0,0
5	0,1	0,1
7	0,2	0,2
9	0,3	0,3
11	0,4	0,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,0499
Abs. člen	q = -0,13739
Korelační koef.	r = 0,99619



**Protokol 43**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,7$

Kůže: 25.9.08/8

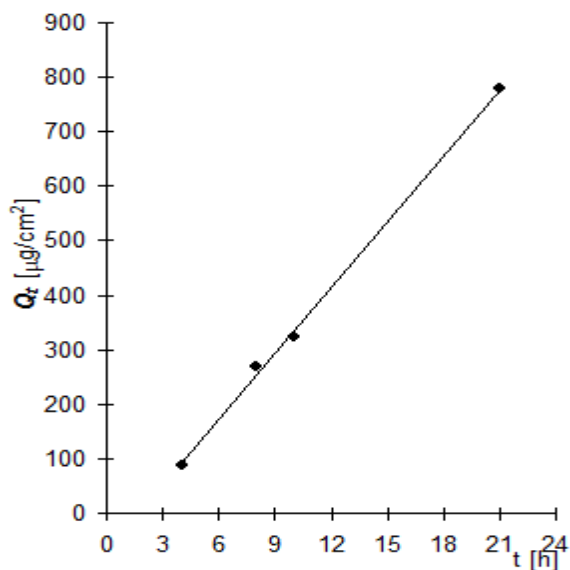
Donor: IPM

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,053	0,6	1,053	175,9	87,9
8	3,222	0,6	3,223	538,3	269,1
10	3,761	0,6	3,877	647,4	323,7
21	9,176	0,6	9,315	1 555,6	777,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	87,9	92,7
8	269,1	253,9
10	323,7	334,4
21	777,8	777,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 40,2888867
Abs. člen	q = -68,452084
Korelační koef.	r = 0,9992804





**Protokol 44**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17$

Kůže: 25.9.08/8

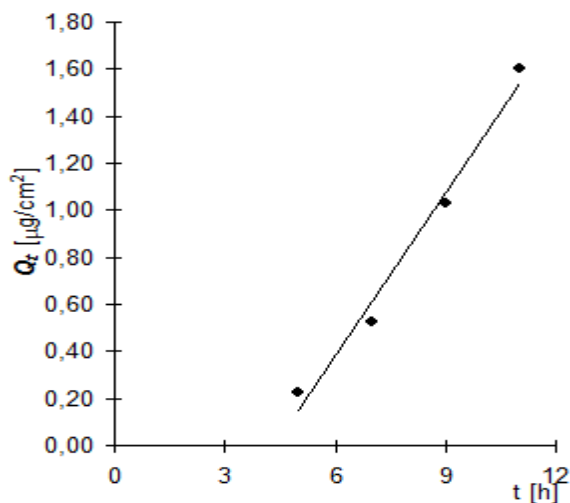
Donor: IPM

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,003	0,6	0,003	0,4	0,2
7	0,006	0,6	0,006	1,1	0,5
9	0,012	0,6	0,012	2,1	1,0
11	0,018	0,6	0,019	3,2	1,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,2	0,2
7	0,5	0,6
9	1,0	1,1
11	1,6	1,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,231677
Abs. člen	q = -1,00783
Korelační koef.	r = 0,991229



**Protokol 45**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,2$

Kůže: 25.9.08/5

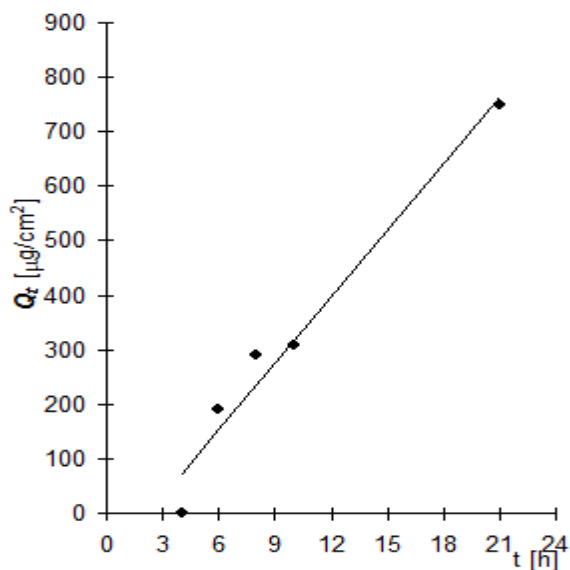
Donor: PUFR

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,989	0,6	1,989	381,9	191,0
8	2,969	0,6	3,031	582,0	291,0
10	3,123	0,6	3,218	617,9	308,9
21	7,709	0,6	7,810	1 499,4	749,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	191,0	153,2
8	291,0	234,7
10	308,9	316,3
21	749,7	764,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 40,7753213
Abs. člen	q = -91,466404
Korelační koef.	r = 0,98339747



**Protokol 46**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,8$

Kůže: 25.9.08/5

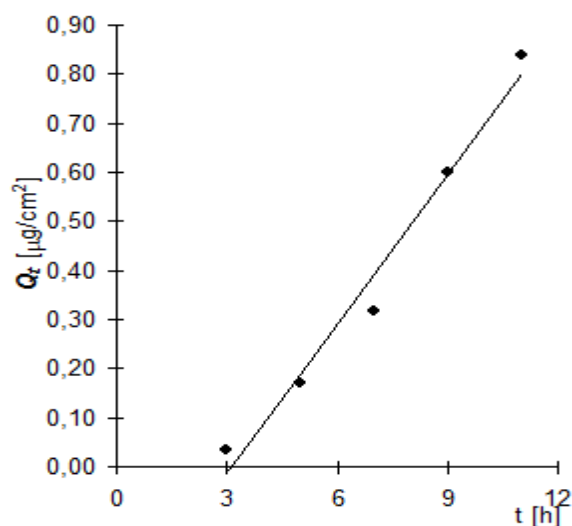
Donor: PUFR

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,000	0,6	0,000	0,1	0,0
5	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
7	0,003	0,6	0,003	0,6	0,3
9	0,006	0,6	0,006	1,2	0,6
11	0,009	0,6	0,009	1,7	0,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
3	0,0	0,0
5	0,2	0,2
7	0,3	0,4
9	0,6	0,6
11	0,8	0,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,101985
Abs. člen	q = -0,32143
Korelační koef.	r = 0,988337



**Protokol 47**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,4$

Kůže: 25.9.08/5

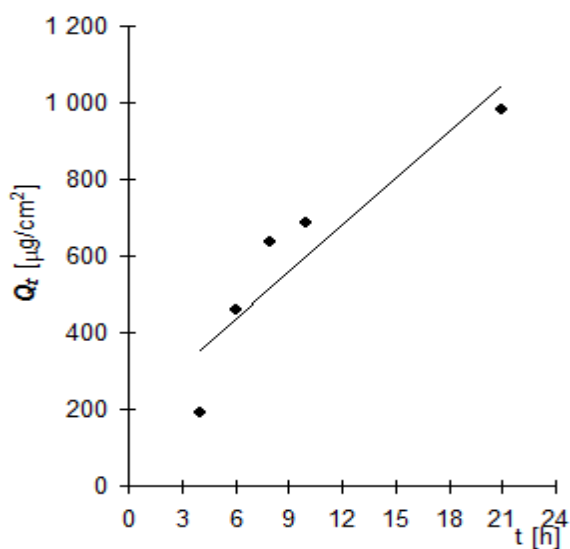
Donor: IPM + PO

Měření: MP/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
4	1,982	0,6	1,982	384,5	192,3
6	4,659	0,6	4,720	915,7	457,8
8	6,407	0,6	6,552	1 271,2	635,6
10	6,858	0,6	7,061	1 369,8	684,9
21	9,926	0,6	10,144	1 968,0	984,0

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
4	192,3	356,1
6	457,8	437,1
8	635,6	518,0
10	684,9	599,0
21	984,0	1044,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 40,4915682
Abs. člen	q = 194,103751
Korelační koef.	r = 0,92067081



**Protokol 48**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,2$

Kůže: 25.9.08/5

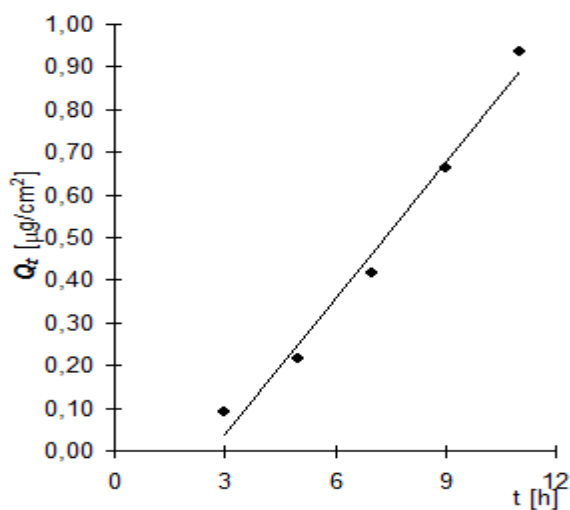
Donor: IPM + PO

Měření: KL/2

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
3	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
5	0,002	0,6	0,002	0,4	0,2
7	0,004	0,6	0,004	0,8	0,4
9	0,007	0,6	0,007	1,3	0,7
11	0,010	0,6	0,010	1,9	0,9

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
3	0,1	0,0
5	0,2	0,3
7	0,4	0,5
9	0,7	0,7
11	0,9	0,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,106744
Abs. člen	q = -0,28306
Korelační koef.	r = 0,990888



**Protokol 49**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_f$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,6$

Kůže: 25.9.08/5

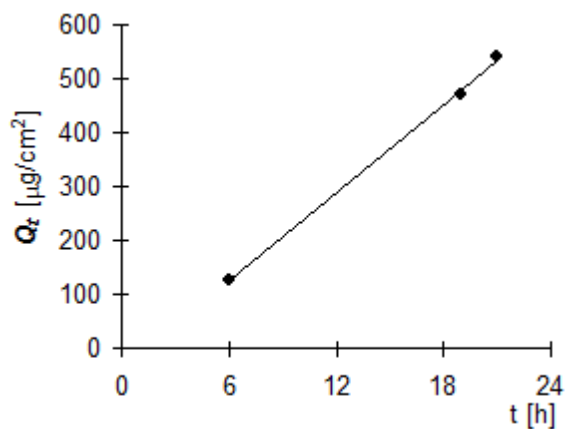
Donor: PUFR

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_f$
6	1,299	0,6	1,299	254,7	127,3
19	4,639	1,5	4,797	940,2	470,1
21	5,152	0,6	5,519	1 081,7	540,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	127,3	126,2
19	470,1	478,9
21	540,8	533,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 27,13559
Abs. člen	q = -36,6623
Korelační koef.	r = 0,999294



**Protokol 50**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,2$

Kůže: 25.9.08/5

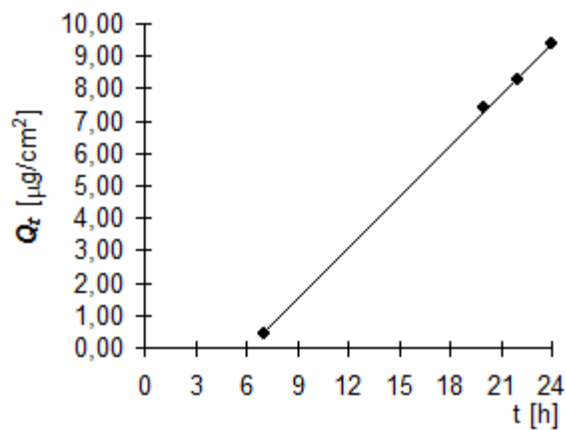
Donor: PUFR

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,005	0,6	0,005	0,9	0,5
20	0,077	0,6	0,081	14,8	7,4
22	0,088	0,6	0,091	16,6	8,3
24	0,100	0,6	0,103	18,7	9,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
7	0,5	0,5
20	7,4	7,3
22	8,3	8,3
24	9,4	9,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,524332
Abs. člen	q = -3,19774
Korelační koef.	r = 0,999866



**Protokol 51**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18$

Kůže: 25.9.08/5

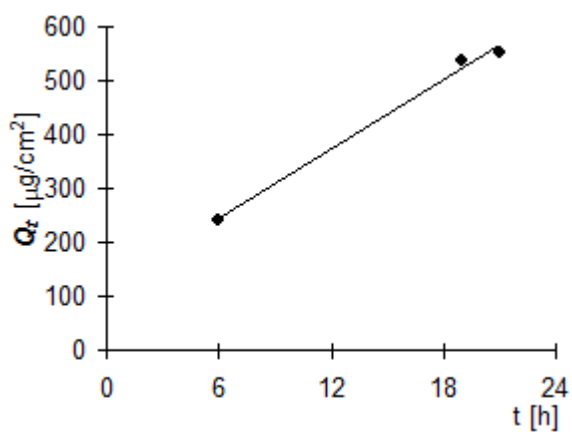
Donor: PUFR

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	2,689	0,6	2,689	484,0	242,0
19	5,753	0,6	5,970	1 074,6	537,3
21	5,951	0,6	6,150	1 106,9	553,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	242,0	242,0
19	537,3	537,3
21	553,5	553,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 21,46675
Abs. člen	q = 115,0856
Korelační koef.	r = 0,997041





**Protokol 52**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,5$

Kůže: 25.9.08/5

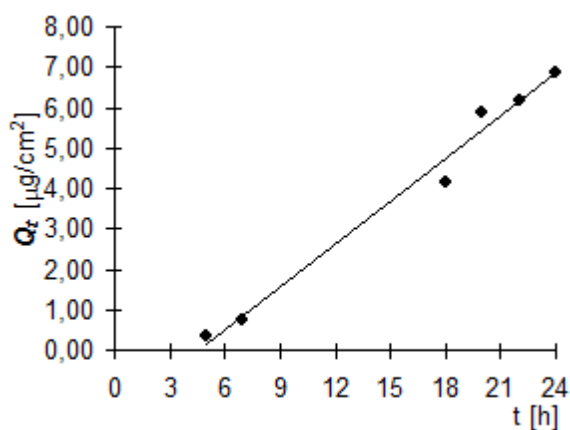
Donor: PUFR

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,004	0,6	0,004	0,6	0,3
7	0,009	0,6	0,009	1,5	0,8
18	0,050	0,6	0,050	8,3	4,2
20	0,069	0,6	0,071	11,7	5,9
22	0,072	0,6	0,075	12,4	6,2
24	0,080	0,6	0,083	13,7	6,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,3	0,3
7	0,8	0,8
18	4,2	4,2
20	5,9	5,9
22	6,2	6,2
24	6,9	6,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,352292
Abs. člen	q = -1,61194
Korelační koef.	r = 0,99325



$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18$

Kůže: 25.9.08/5

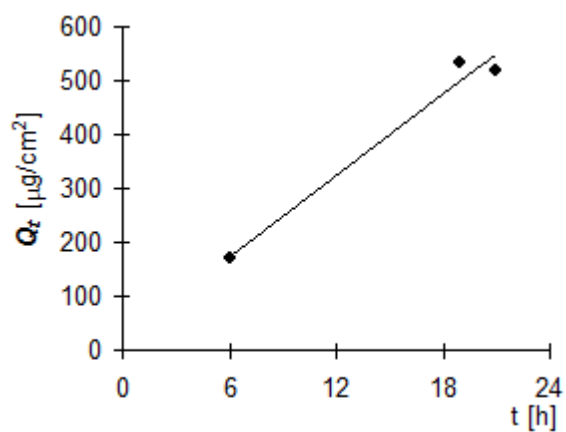
Donor: PUFR

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,901	0,6	1,901	342,1	171,0
19	5,746	0,6	5,934	1 068,2	534,1
21	5,559	0,6	5,757	1 036,3	518,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	171,0	175,7
19	534,1	498,9
21	518,1	548,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 24,8602
Abs. člen	q = 26,57639
Korelační koef.	r = 0,986908



**Protokol 54**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu\text{g}$ ] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,3$

Kůže: 25.9.08/5

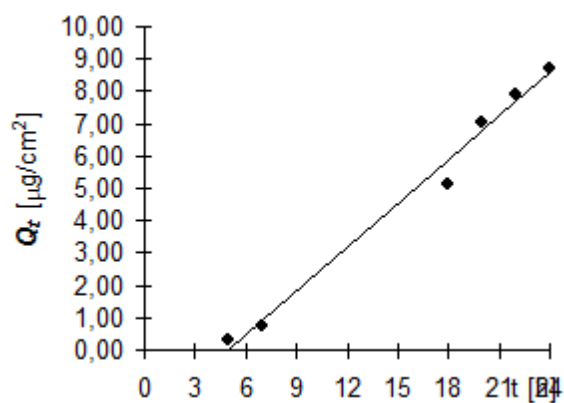
Donor: PUFR

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,004	0,6	0,004	0,6	0,3
7	0,009	0,6	0,009	1,5	0,7
18	0,062	0,6	0,063	10,2	5,1
20	0,084	0,6	0,086	14,1	7,0
22	0,094	0,6	0,097	15,8	7,9
24	0,104	0,6	0,107	17,5	8,7

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
5	0,3	0,0
7	0,7	0,9
18	5,1	5,9
20	7,0	6,8
22	7,9	7,7
24	8,7	8,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,452068
Abs. člen	q = -2,25964
Korelační koef.	r = 0,993521



**Protokol 55**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18$

Kůže: 25.9.08/4

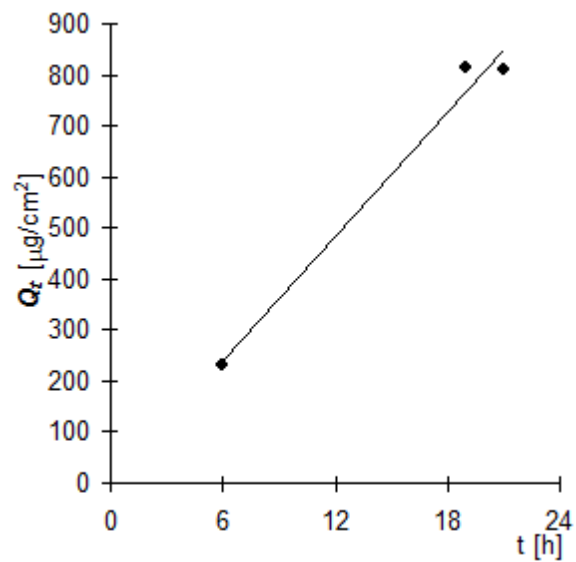
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	2,563	0,6	2,563	461,4	230,7
19	8,662	0,6	9,025	1 624,6	812,3
21	8,682	0,6	8,982	1 616,8	808,4

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
6	230,7	236,8
19	812,3	766,6
21	808,4	848,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 40,75017
Abs. člen	q = -7,69838
Korelační koef.	r = 0,991707



**Protokol 56**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,7$

Kůže: 25.9.08/4

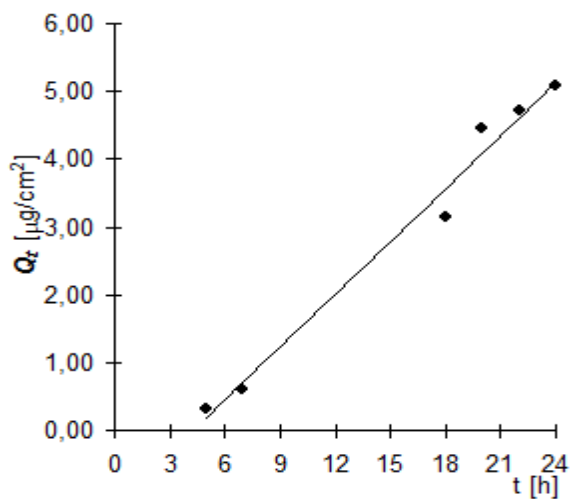
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,004	0,6	0,004	0,7	0,3
7	0,007	0,6	0,007	1,2	0,6
18	0,037	0,6	0,038	6,3	3,2
20	0,052	0,6	0,053	8,9	4,5
22	0,054	0,6	0,056	9,4	4,7
24	0,059	0,6	0,061	10,2	5,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,3	0,2
7	0,6	0,7
18	3,2	3,6
20	4,5	4,1
22	4,7	4,6
24	5,1	5,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,260436
Abs. člen	q = -1,11377
Korelační koef.	r = 0,992112



**Protokol 57**

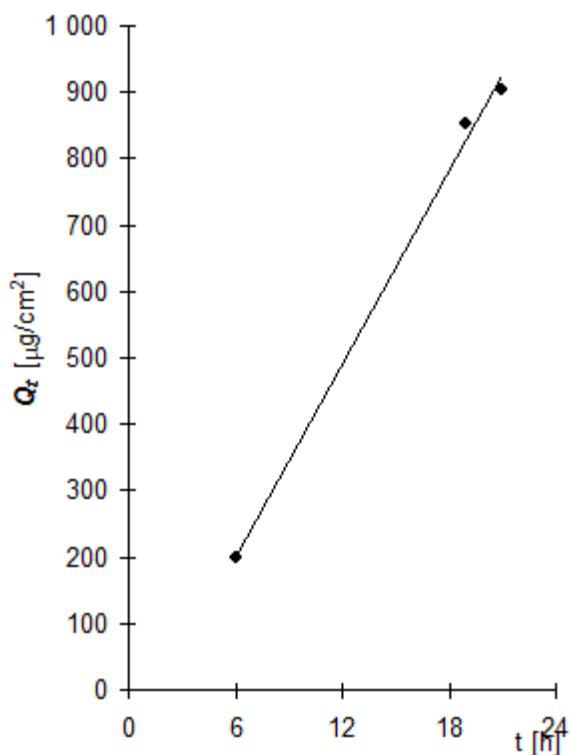
$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,1$
Kůže: 25.9.08/4
Donor: PUFR + PG
Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	2,083	0,6	2,083	397,9	198,9
19	8,608	0,6	8,911	1 701,9	851,0
21	9,194	0,6	9,474	1 809,5	904,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	198,9	202,0
19	851,0	828,2
21	904,7	924,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 48,16878
Abs. člen	q = -87,0364
Korelační koef.	r = 0,998509



**Protokol 58**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 25.9.08/4

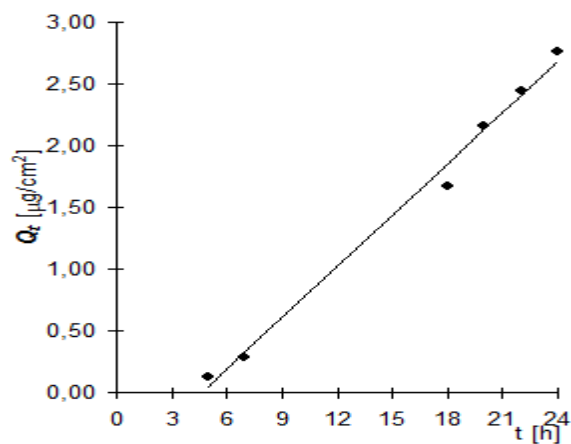
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
7	0,003	0,6	0,003	0,6	0,3
18	0,019	0,6	0,019	3,3	1,7
20	0,024	0,6	0,025	4,3	2,2
22	0,027	0,6	0,028	4,9	2,4
24	0,030	0,6	0,031	5,5	2,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,1	0,0
7	0,3	0,3
18	1,7	1,9
20	2,2	2,1
22	2,4	2,4
24	2,8	2,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,138982
Abs. člen	q = -0,64881
Korelační koef.	r = 0,996264



Protokol 59

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,1$

Kůže: 25.9.08/4

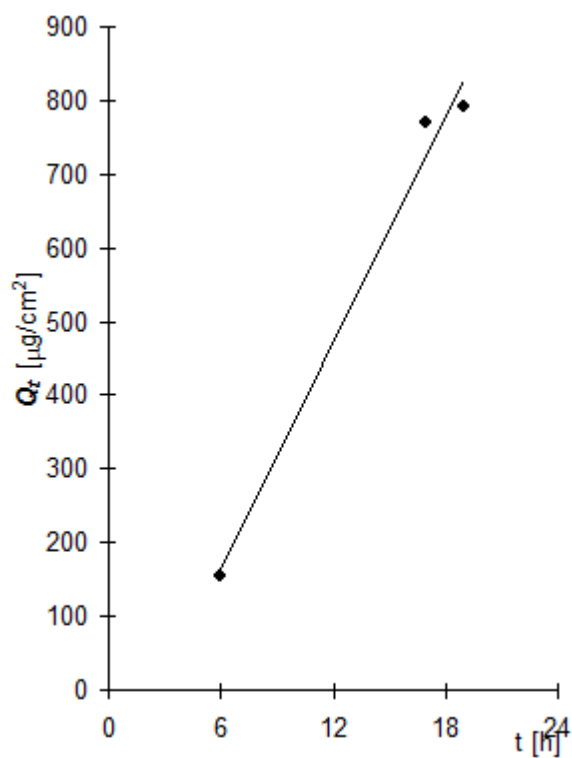
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,822	0,6	1,822	311,6	155,8
17	8,925	0,6	8,989	1 537,1	768,5
19	8,937	0,6	9,253	1 582,2	791,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	155,8	162,5
17	768,5	725,3
19	791,1	827,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 51,16938
Abs. člen	q = -144,545
Korelační koef.	r = 0,99373





**Protokol 60**

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

$V_o = 16$

Kůže: 25.9.08/4

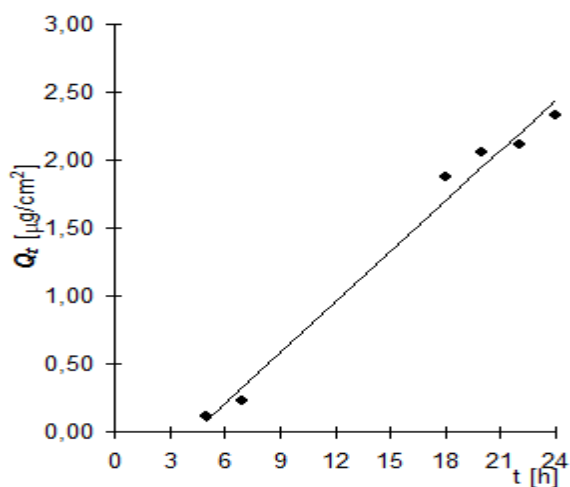
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
7	0,003	0,6	0,003	0,4	0,2
18	0,023	0,6	0,023	3,7	1,9
20	0,025	0,6	0,026	4,1	2,1
22	0,025	0,6	0,026	4,2	2,1
24	0,028	0,6	0,029	4,7	2,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,1	0,1
7	0,2	0,3
18	1,9	1,7
20	2,1	1,9
22	2,1	2,2
24	2,3	2,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,12451
Abs. člen	q = -0,54142
Korelační koef.	r = 0,992541



**Protokol 61**

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

$V_o = 17$

Kůže: 25.9.08/5

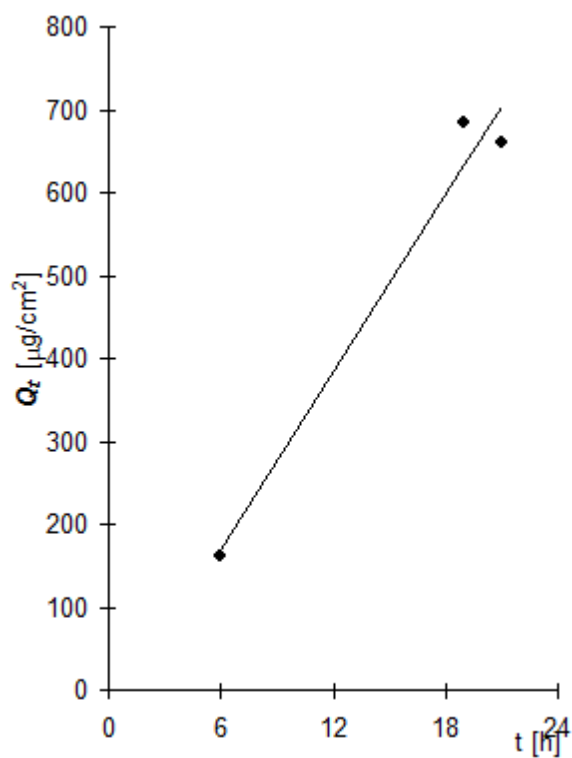
Donor: IPM

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,902	0,6	1,902	323,4	161,7
19	7,764	0,6	8,046	1 367,9	683,9
21	7,483	0,6	7,767	1 320,3	660,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	161,7	168,5
19	683,9	632,9
21	660,2	704,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 35,72617
Abs. člen	q = -45,8683
Korelační koef.	r = 0,986677



**Protokol 62**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 16,3

Kůže: 25.9.08/5

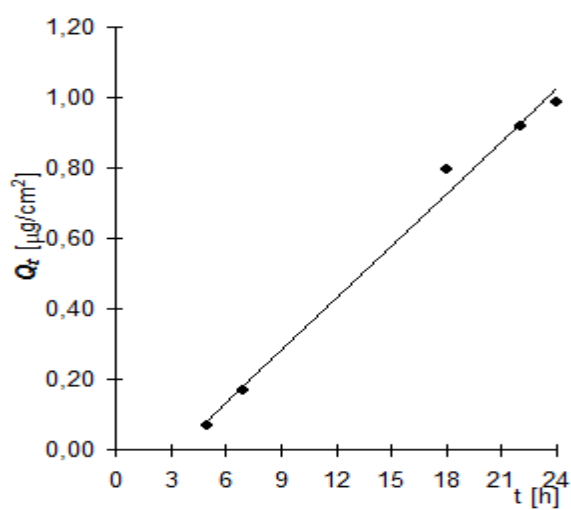
Donor: IPM

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,001	0,6	0,001	0,1	0,1
7	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
18	0,010	0,6	0,010	1,6	0,8
22	0,011	0,6	0,011	1,8	0,9
24	0,012	0,6	0,012	2,0	1,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,1	0,1
7	0,2	0,2
18	0,8	0,7
22	0,9	0,9
24	1,0	1,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,049858
Abs. člen	q = -0,16948
Korelační koef.	r = 0,995571



**Protokol 63**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 20$

Kůže: 25.9.08/3

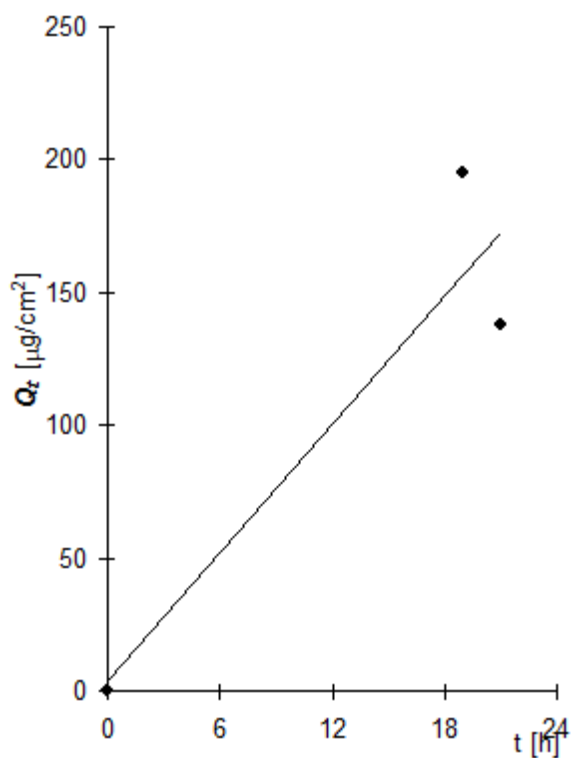
Donor: IPM

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
19	1,853	0,6	1,953	390,5	195,3
21	1,320	0,6	1,379	275,8	137,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
19	195,3	156,7
21	137,9	172,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 8,053289
Abs. člen	q = 3,67441
Korelační koef.	r = 0,930029



**Protokol 64**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 18

Kůže: 25.9.08/3

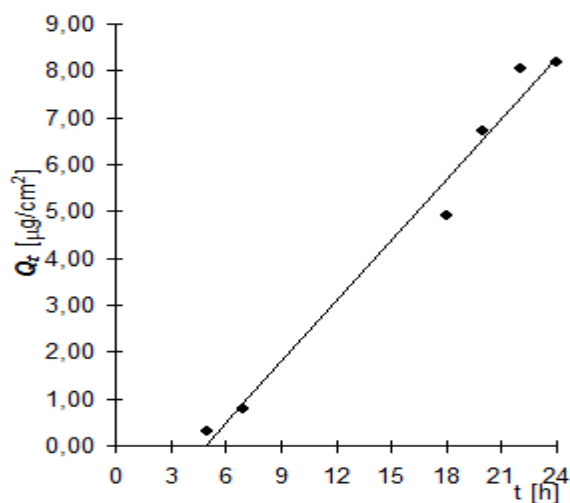
Donor: IPM

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,004	0,6	0,004	0,6	0,3
7	0,009	0,6	0,009	1,6	0,8
18	0,054	0,6	0,054	9,8	4,9
20	0,073	0,6	0,075	13,4	6,7
22	0,087	0,6	0,089	16,1	8,0
24	0,088	0,6	0,091	16,4	8,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,3	0,0
7	0,8	0,9
18	4,9	5,7
20	6,7	6,6
22	8,0	7,4
24	8,2	8,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,43451
Abs. člen	q = -2,12801
Korelační koef.	r = 0,990852



**Protokol 65**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,2$

Kůže: 25.9.08/5

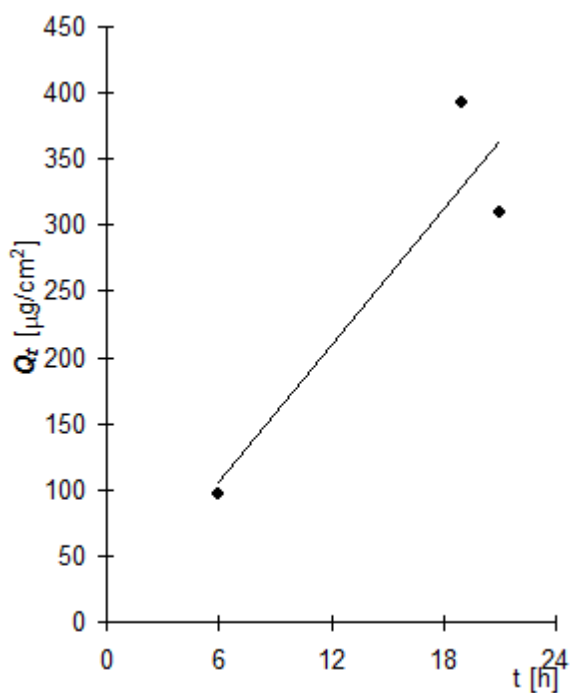
Donor: IPM

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,009	0,6	1,009	193,8	96,9
19	3,855	0,6	4,087	784,6	392,3
21	3,102	0,6	3,230	620,2	310,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	96,9	105,2
19	392,3	329,8
21	310,1	364,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 17,2702
Abs. člen	q = 1,626788
Korelační koef.	r = 0,922581



**Protokol 66**

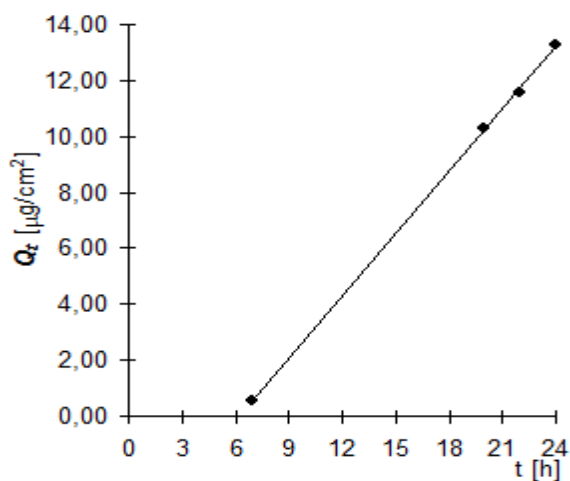
$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,5$
Kůže: 25.9.08/5
Donor: IPM
Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,006	0,6	0,006	1,1	0,5
20	0,115	0,6	0,118	20,6	10,3
22	0,128	0,6	0,133	23,2	11,6
24	0,147	0,6	0,152	26,6	13,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
7	0,5	0,5
20	10,3	10,2
22	11,6	11,7
24	13,3	13,2

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,746488
Abs. člen	q = -4,70043
Korelační koef.	r = 0,999878



**Protokol 67**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,4$

Kůže: 25.9.08/4

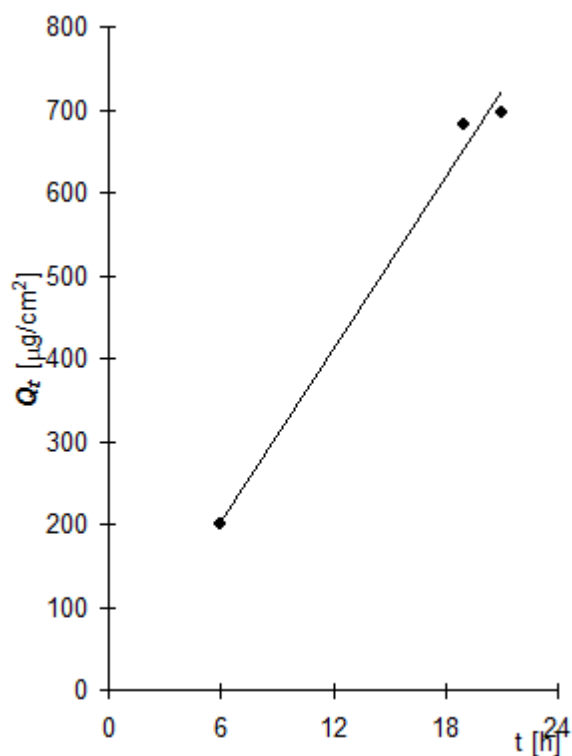
Donor: IPM + PO

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	2,055	0,6	2,055	398,7	199,3
19	6,818	0,6	7,041	1 366,0	683,0
21	6,953	0,6	7,171	1 391,2	695,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	199,3	203,4
19	683,0	652,7
21	695,6	721,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 34,56436
Abs. člen	q = -4,01084
Korelační koef.	r = 0,994925





**Protokol 68**

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

$V_o = 18,5$

Kůže: 25.9.08/4

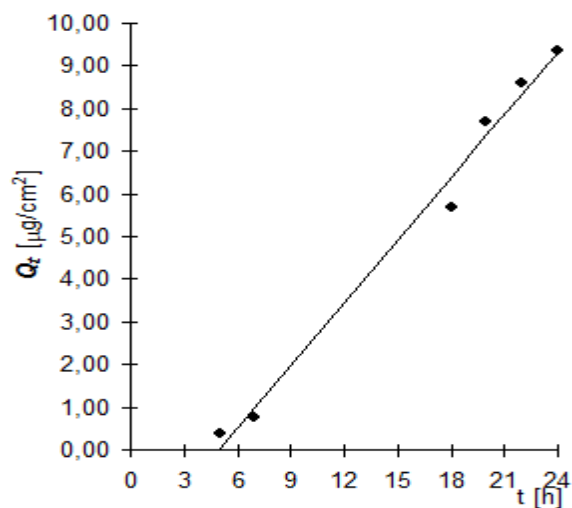
Donor: IPM + PO

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,004	0,6	0,004	0,7	0,4
7	0,008	0,6	0,008	1,5	0,8
18	0,061	0,6	0,061	11,4	5,7
20	0,081	0,6	0,083	15,4	7,7
22	0,090	0,6	0,093	17,2	8,6
24	0,098	0,6	0,101	18,7	9,4

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
5	0,4	0,0
7	0,8	1,0
18	5,7	6,4
20	7,7	7,4
22	8,6	8,3
24	9,4	9,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,48987
Abs. člen	q = -2,42837
Korelační koef.	r = 0,99467



**Protokol 69**

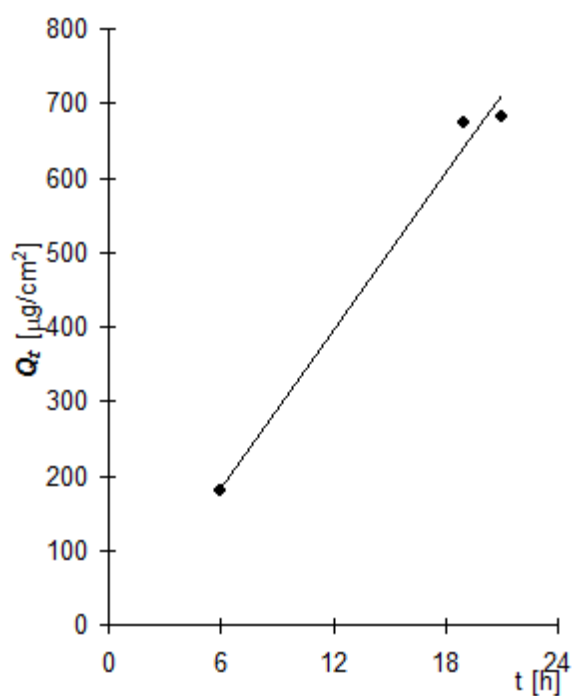
$V_o$	[ml]
$t$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,7$
Kůže: 25.9.08/4
Donor: IPM + PO
Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,821	0,6	1,821	358,7	179,3
19	6,633	0,6	6,836	1 346,7	673,4
21	6,721	0,6	6,929	1 365,1	682,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	179,3	183,7
19	673,4	640,6
21	682,5	710,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 35,14658
Abs. člen	q = -27,1674
Korelační koef.	r = 0,994267



**Protokol 70**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 19

Kůže: 25.9.08/4

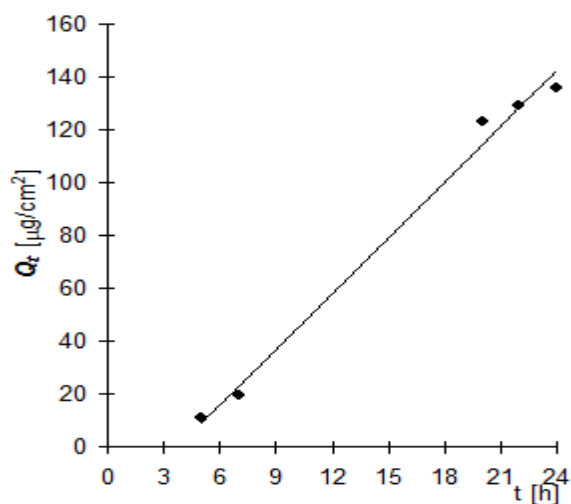
Donor: IPM + PO

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,114	0,6	0,114	21,7	10,9
7	0,198	0,6	0,202	38,4	19,2
20	1,274	0,6	1,296	246,3	123,1
22	1,316	0,6	1,357	257,8	128,9
24	1,389	0,6	1,432	272,1	136,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	10,9	9,1
7	19,2	23,2
20	123,1	114,6
22	128,9	128,6
24	136,0	142,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 7,02904
Abs. člen	q = -26,0285
Korelační koef.	r = 0,995672



**Protokol 71**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,5$

Kůže: 25.9.08/4

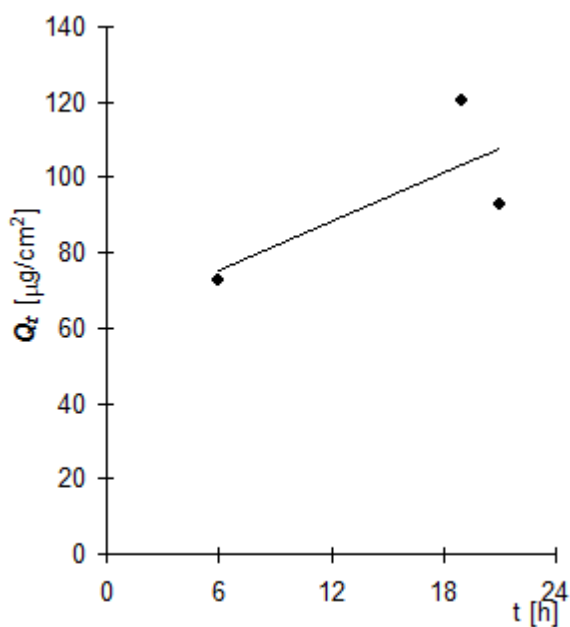
Donor: IPM + PO

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	0,832	0,6	0,832	145,6	72,8
19	1,306	0,6	1,378	241,1	120,6
21	1,013	0,6	1,060	185,5	92,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	72,8	75,1
19	120,6	103,3
21	92,7	107,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 2,1726
Abs. člen	q = 62,05235
Korelační koef.	r = 0,737497



**Protokol 72**

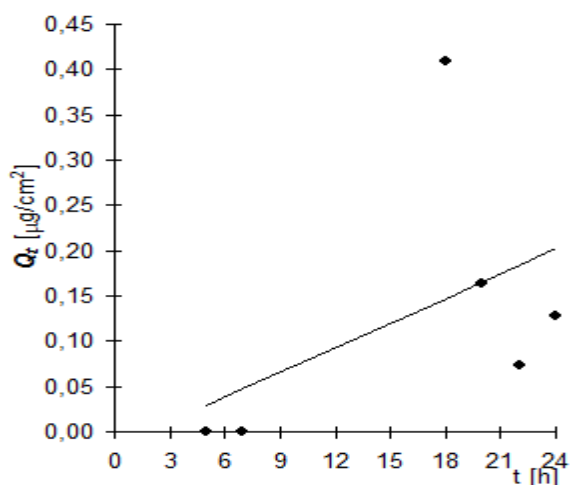
$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 15,5$
Kůže: 25.9.08/4
Donor: IPM + PO
Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
18	0,005	0,6	0,005	0,8	0,4
20	0,002	0,6	0,002	0,3	0,2
22	0,001	0,6	0,001	0,1	0,1
24	0,002	0,6	0,002	0,3	0,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	0,409	0,147
20	0,163	0,165
22	0,074	0,184
24	0,127	0,202

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,009107
Abs. člen	q = -0,01681
Korelační koef.	r = 0,479909



**Protokol 73**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19$

Kůže: 25.9.08/3

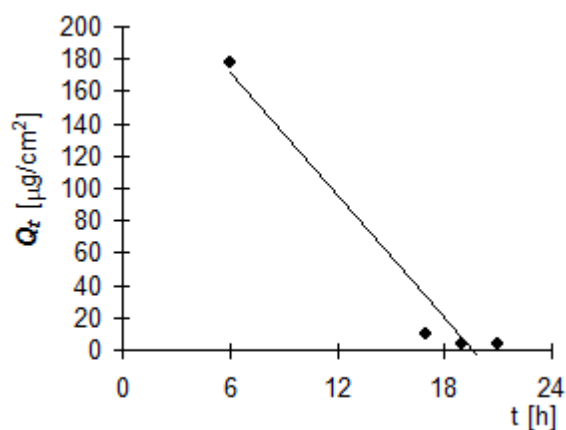
Donor: PUFR

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,877	0,6	1,877	356,7	178,3
17	0,040	0,6	0,099	18,9	9,5
19	0,035	1,5	0,039	7,3	3,7
21	0,031	0,6	0,034	6,6	3,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	178,3	171,5
17	9,5	32,9
19	3,7	7,7
21	3,3	-17,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = -12,6005
Abs. člen	q = 247,1427
Korelační koef.	r = -0,97644



**Protokol 74**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,9$

Kůže: 25.9.08/3

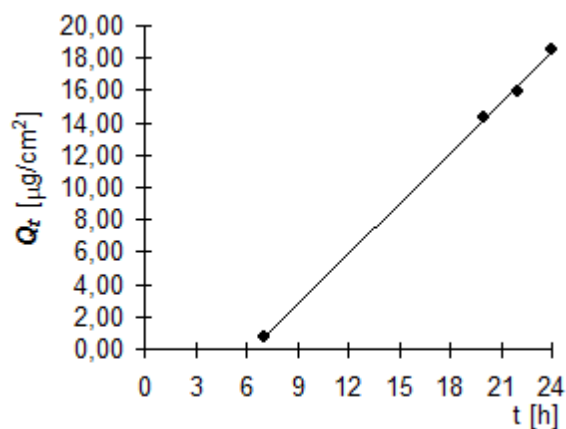
Donor: PUFR

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,008	0,6	0,008	1,5	0,8
18	0,096	1,5	0,097	17,3	8,7
20	0,153	0,6	0,161	28,8	14,4
22	0,173	0,6	0,178	31,9	15,9
24	0,201	0,6	0,207	37,1	18,5

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
7	0,8	0,8
20	14,4	14,2
22	15,9	16,3
24	18,5	18,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1,035865
Abs. člen	q = -6,49829
Korelační koef.	r = 0,999531



**Protokol 75**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,5$

Kůže: 25.9.08/3

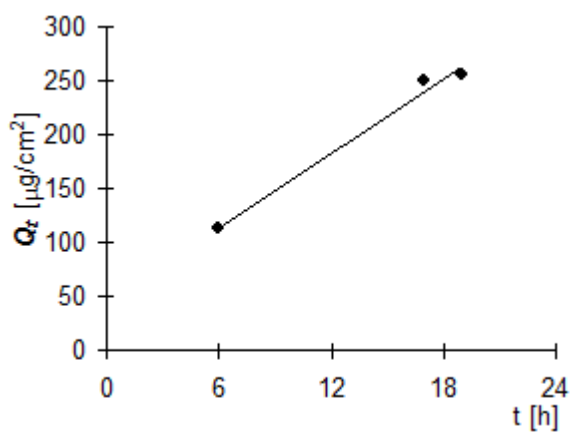
Donor: PUFR

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,153	0,6	1,153	224,8	112,4
17	2,530	0,6	2,566	500,3	250,1
19	2,543	0,6	2,622	511,4	255,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	112,4	112,4
17	250,1	250,1
19	255,7	255,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 11,52724
Abs. člen	q = 44,69363
Korelační koef.	r = 0,994046





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

$V_o = 17$

Kůže: 25.9.08/3

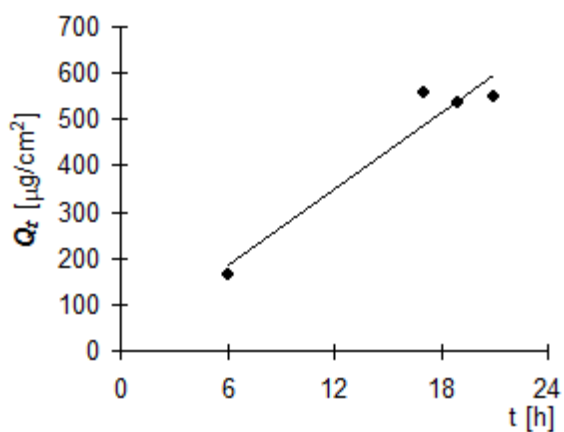
Donor: PUFR

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_f$
6	1,956	0,6	1,956	332,5	166,2
17	6,492	0,6	6,561	1 115,4	557,7
19	6,088	0,6	6,320	1 074,4	537,2
21	6,223	0,6	6,446	1 095,8	547,9

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
6	166,2	184,6
17	557,7	486,6
19	537,2	541,5
21	547,9	596,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 27,44919
Abs. člen	q = 19,93683
Korelační koef.	r = 0,963826



**Protokol 78**

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

$V_o = 17,1$

Kůže: 25.9.08/3

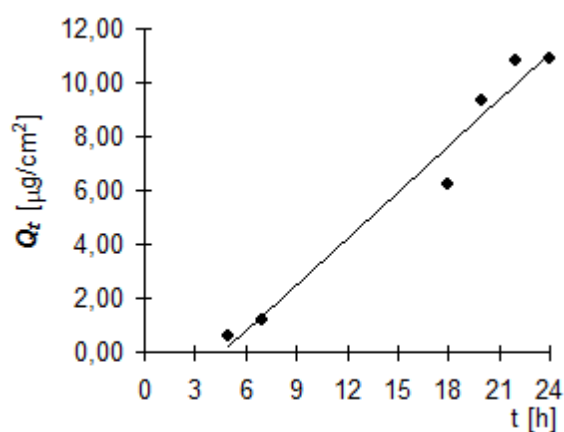
Donor: PUFR

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,007	0,6	0,007	1,2	0,6
7	0,014	0,6	0,014	2,4	1,2
18	0,072	0,6	0,073	12,4	6,2
20	0,107	0,6	0,110	18,7	9,4
22	0,123	0,6	0,126	21,6	10,8
24	0,123	0,6	0,128	21,8	10,9

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
5	0,6	0,2
7	1,2	1,3
18	6,2	7,7
20	9,4	8,8
22	10,8	10,0
24	10,9	11,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,574129
Abs. člen	q = -2,67044
Korelační koef.	r = 0,984615



**Protokol 79**

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

$V_o = 19$

Kůže: 25.9.08/4

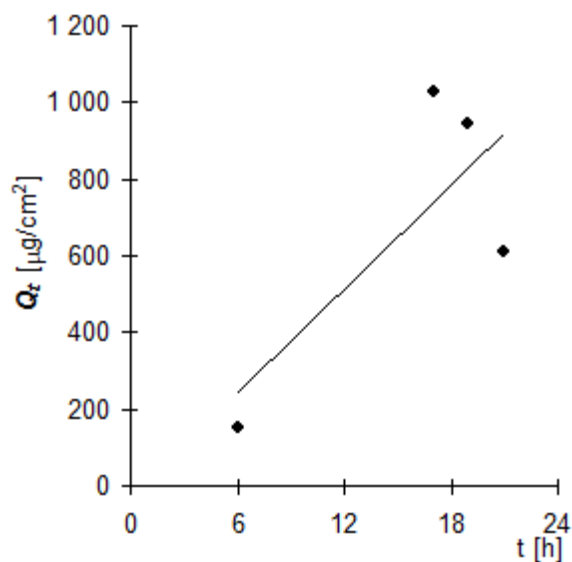
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,602	0,6	1,602	304,3	152,2
17	10,744	0,6	10,794	2 050,9	1 025,5
19	9,587	0,6	9,928	1 886,3	943,1
21	6,105	0,6	6,418	1 219,5	609,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	152,2	243,8
17	1025,5	738,9
19	943,1	828,9
21	609,7	918,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 45,0065
Abs. člen	q = -26,2242
Korelační koef.	r = 0,760354



**Protokol 80**

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

$V_o = 18,4$

Kůže: 25.9.08/4

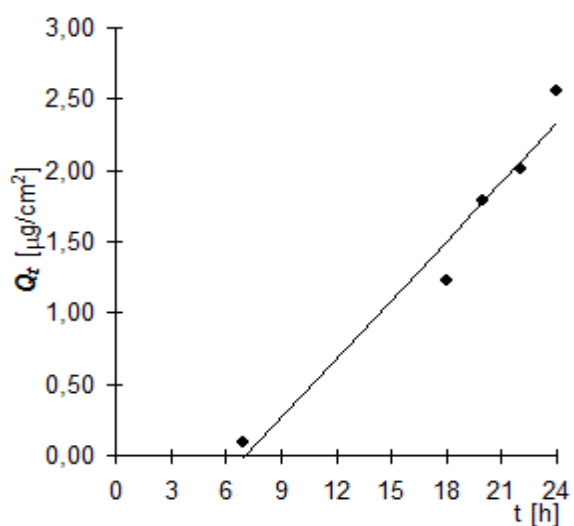
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
18	0,013	0,6	0,013	2,4	1,2
20	0,019	0,6	0,019	3,6	1,8
22	0,021	0,6	0,022	4,0	2,0
24	0,027	0,6	0,028	5,1	2,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
7	0,1	0,0
18	1,2	1,5
20	1,8	1,8
22	2,0	2,1
24	2,6	2,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,138406
Abs. člen	q = -0,98558
Korelační koef.	r = 0,980091



**Protokol 81**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Kůže: 25.9.08/4

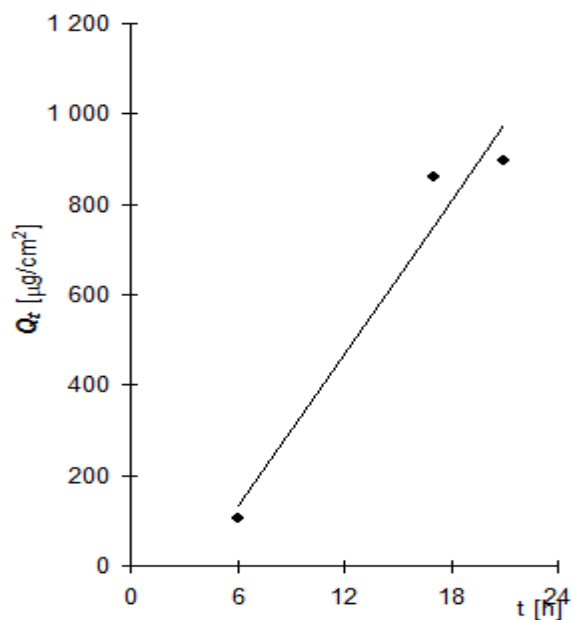
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,189	0,6	1,189	209,2	104,6
17	9,723	0,6	9,764	1 718,4	859,2
21	10,161	0,6	10,176	1 791,0	895,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	104,6	133,5
17	859,2	750,7
21	895,5	975,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 56,1037
Abs. člen	q = -203,084
Korelační koef.	r = 0,975958



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

$V_o = 16,2$

Kůže: 25.9.08/4

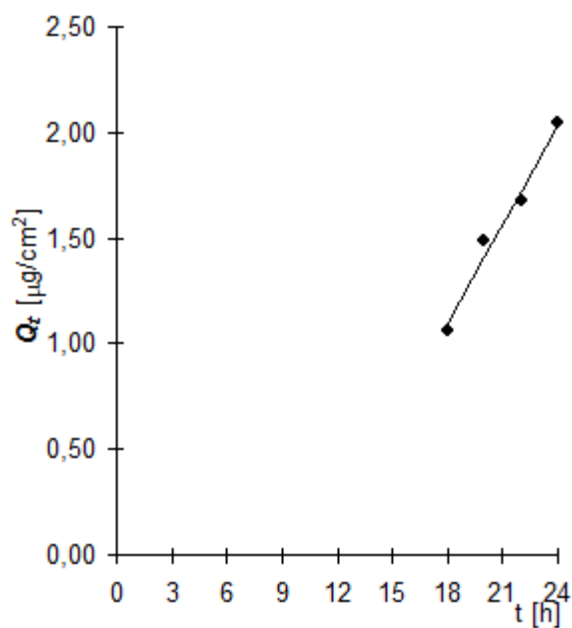
Donor: PUF<sub>R</sub> + PG

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
18	0,013	0,6	0,013	2,1	1,1
20	0,018	0,6	0,018	3,0	1,5
22	0,020	0,6	0,021	3,4	1,7
24	0,024	0,6	0,025	4,1	2,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	1,1	1,1
20	1,5	1,4
22	1,7	1,7
24	2,0	2,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,156713
Abs. člen	q = -1,72337
Korelační koef.	r = 0,990729



**Protokol 83**

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

$V_o = 17,4$

Kůže: 25.9.08/4

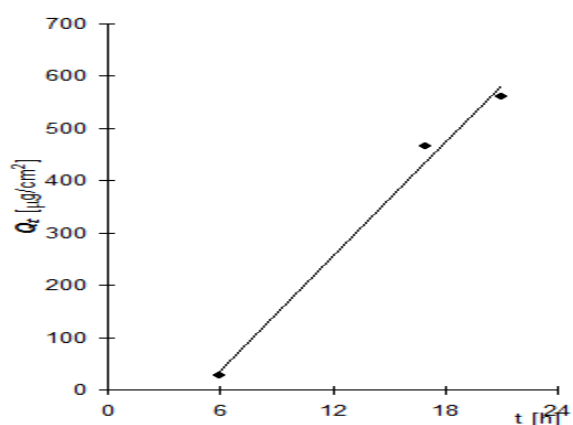
Donor: PUFR + PG

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	0,325	0,6	0,325	56,5	28,2
17	5,347	0,6	5,358	932,4	466,2
21	6,441	0,6	6,448	1 122,0	561,0

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
6	28,2	36,1
17	466,2	436,8
21	561,0	582,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 3
Flux	J = 36,42976
Abs. člen	q = -182,5
Korelační koef.	r = 0,995693



**Protokol 84**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,2$

Kůže: 25.9.08/4

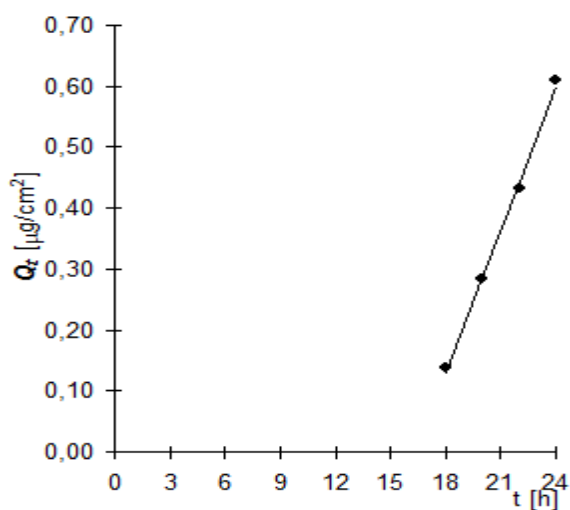
Donor: PUFR + PG

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
18	0,002	0,6	0,002	0,3	0,1
20	0,003	0,6	0,004	0,6	0,3
22	0,005	0,6	0,005	0,9	0,4
24	0,007	0,6	0,008	1,2	0,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	0,1	0,1
20	0,3	0,3
22	0,4	0,4
24	0,6	0,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,078064
Abs. člen	q = -1,27386
Korelační koef.	r = 0,998729





**Protokol 85**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 16,3

Kůže: 25.9.08/3

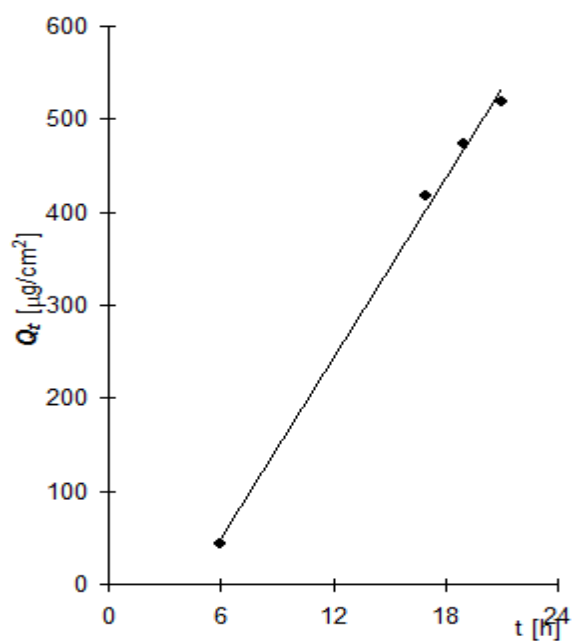
Donor: IPM

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	0,538	0,6	0,538	87,7	43,8
17	5,093	0,6	5,113	833,5	416,7
19	5,617	0,6	5,805	946,3	473,1
21	6,141	0,6	6,355	1 035,9	517,9

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
6	43,8	48,1
17	416,7	403,3
19	473,1	467,8
21	517,9	532,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 32,28477
Abs. člen	q = -145,578
Korelační koef.	r = 0,998447



**Protokol 86**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 16,4

Kůže: 25.9.08/3

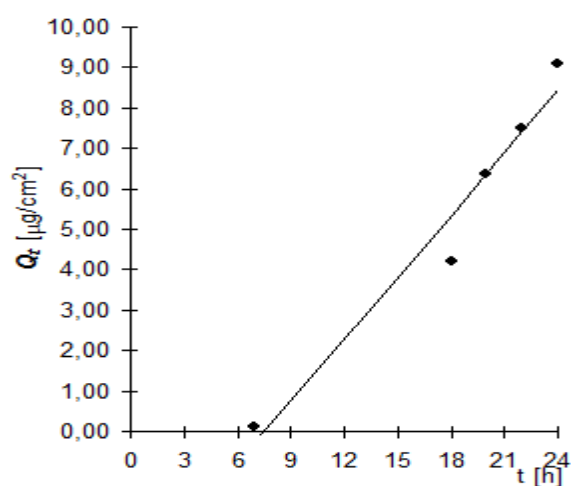
Donor: IPM

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
18	0,051	0,6	0,051	8,4	4,2
20	0,076	0,6	0,078	12,8	6,4
22	0,089	0,6	0,092	15,0	7,5
24	0,107	0,6	0,111	18,2	9,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
7	0,1	-0,3
18	4,2	5,4
20	6,4	6,4
22	7,5	7,4
24	9,1	8,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,511971
Abs. člen	q = -3,85721
Korelační koef.	r = 0,979875



**Protokol 87**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 19,4$

Kůže: 25.9.08/3

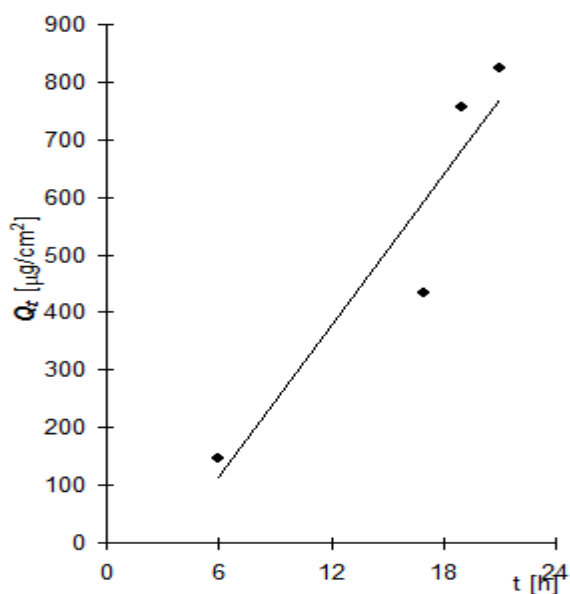
Donor: IPM

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	1,511	0,6	1,511	293,1	146,6
17	4,416	0,6	4,462	865,7	432,9
19	7,668	0,6	7,806	1 514,4	757,2
21	8,243	0,6	8,485	1 646,1	823,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	146,6	113,5
17	432,9	594,6
19	757,2	682,1
21	823,0	769,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 43,73848
Abs. člen	q = -148,967
Korelační koef.	r = 0,937117



**Protokol 88**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,3$

Kůže: 25.9.08/3

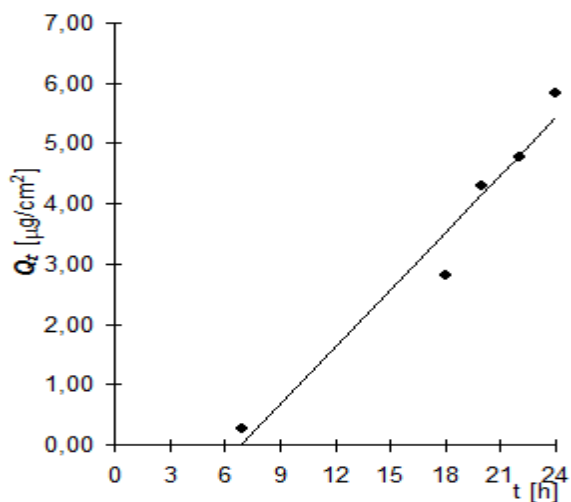
Donor: IPM

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
7	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
18	0,030	0,6	0,031	5,6	2,8
20	0,046	0,6	0,047	8,6	4,3
22	0,050	0,6	0,052	9,5	4,8
24	0,062	0,6	0,064	11,6	5,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
7	0,3	0,0
18	2,8	3,5
20	4,3	4,2
22	4,8	4,8
24	5,8	5,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 5
Flux	J = 0,317936
Abs. člen	q = -2,19908
Korelační koef.	r = 0,979602



**Protokol 89**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,9$

Kůže: 25.9.08/3

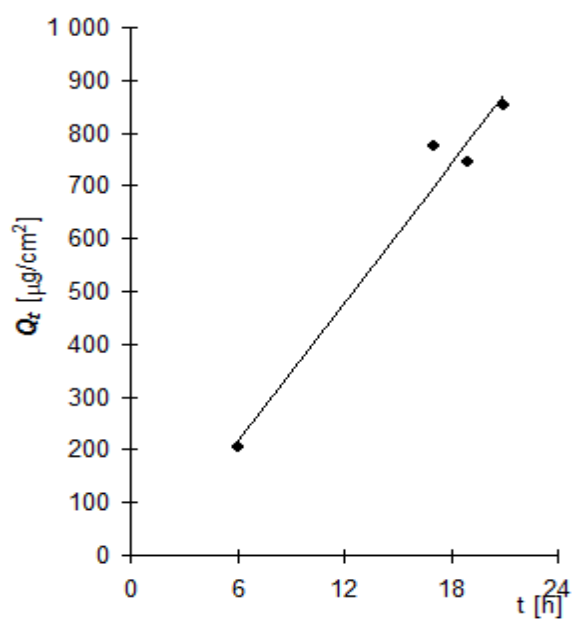
Donor: IPM

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	2,273	0,6	2,273	406,9	203,5
17	8,578	0,6	8,655	1 549,2	774,6
19	8,037	0,6	8,327	1 490,5	745,2
21	9,227	0,6	9,506	1 701,6	850,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	203,5	218,6
17	774,6	698,0
19	745,2	785,2
21	850,8	872,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 43,58523
Abs. člen	q = -42,9438
Korelační koef.	r = 0,984445



**Protokol 90**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,1$

Kůže: 29.3.08/3

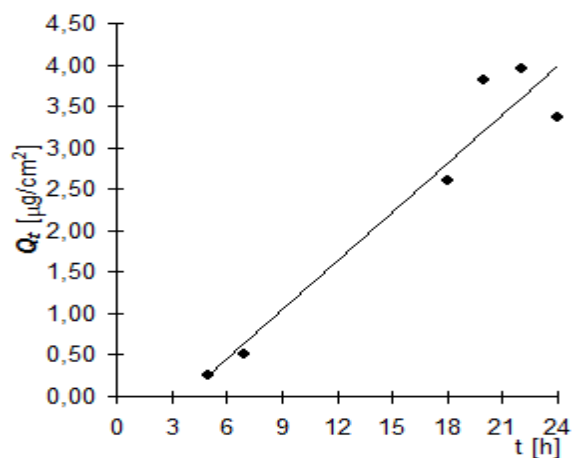
Donor: IPM

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,003	0,6	0,003	0,5	0,3
7	0,006	0,6	0,006	1,0	0,5
18	0,032	0,6	0,032	5,2	2,6
20	0,046	0,6	0,047	7,6	3,8
22	0,047	0,6	0,049	7,9	4,0
24	0,040	0,6	0,042	6,7	3,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,3	0,2
7	0,5	0,6
18	2,6	2,8
20	3,8	3,2
22	4,0	3,6
24	3,4	4,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,197594
Abs. člen	q = -0,74209
Korelační koef.	r = 0,964097



**Protokol 91**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 17,5

Kůže: 25.9.08/3

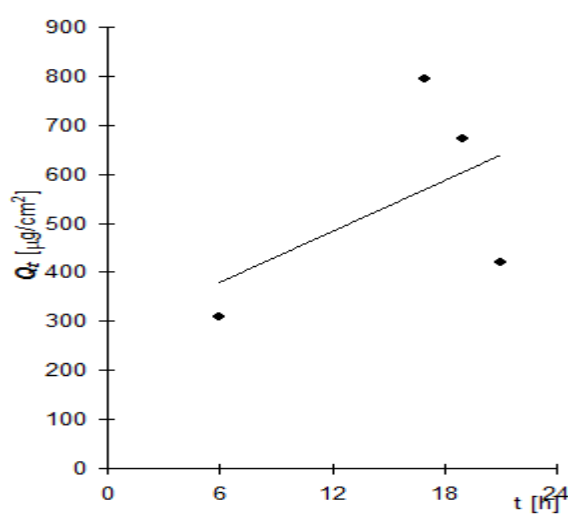
Donor: IPM + PO

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	3,543	0,6	3,543	620,0	310,0
17	8,962	0,6	9,084	1 589,7	794,8
19	7,360	0,6	7,671	1 342,5	671,2
21	4,526	0,6	4,789	838,0	419,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	310,0	378,6
17	794,8	570,6
19	671,2	605,5
21	419,0	640,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 17,45557
Abs. člen	q = 273,845
Korelační koef.	r = 0,524262



**Protokol 92**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 17

Kůže: 25.9.08/3

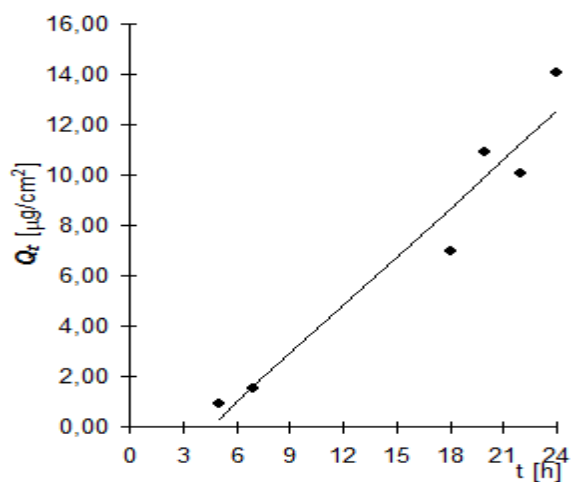
Donor: IPM + PO

Měření: P3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,011	0,6	0,011	1,8	0,9
7	0,017	0,6	0,018	3,0	1,5
18	0,081	0,6	0,082	13,9	7,0
20	0,125	0,6	0,128	21,8	10,9
22	0,114	0,6	0,118	20,1	10,1
24	0,161	0,6	0,166	28,1	14,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,9	0,3
7	1,5	1,6
18	7,0	8,7
20	10,9	10,0
22	10,1	11,3
24	14,1	12,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,642588
Abs. člen	q = -2,88259
Korelační koef.	r = 0,971599





**Protokol 93**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 17,1

Kůže: 25.9.08/1

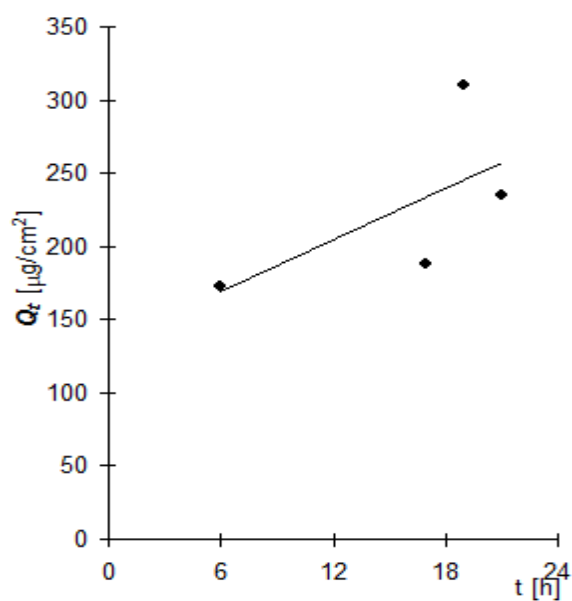
Donor: IPM + PO

Měření: MP/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	2,025	0,6	2,025	346,4	173,2
17	2,122	0,6	2,193	375,0	187,5
19	3,553	0,6	3,630	620,8	310,4
21	2,613	0,6	2,741	468,6	234,3

t	$Q_t$ (exp)	$Q_t$ (teor)
6	173,2	169,6
17	187,5	233,6
19	310,4	245,3
21	234,3	256,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 5,824247
Abs. člen	q = 134,6126
Korelační koef.	r = 0,631542



**Protokol 94**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

Vo = 16,3

Kůže: 25.9.08/1

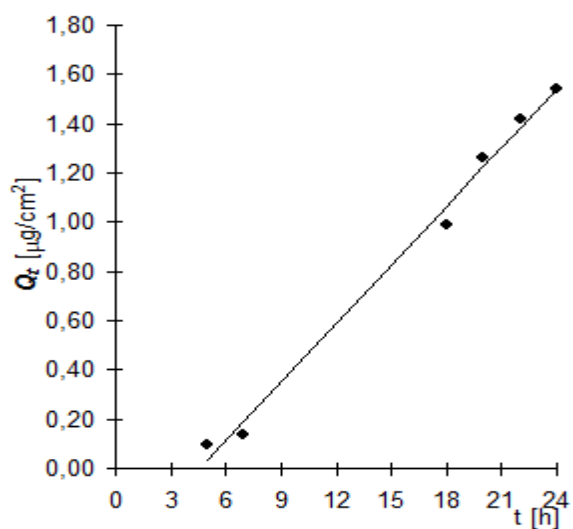
Donor: IPM + PO

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
5	0,001	0,6	0,001	0,2	0,1
7	0,002	0,6	0,002	0,3	0,1
18	0,012	0,6	0,012	2,0	1,0
20	0,015	0,6	0,015	2,5	1,3
22	0,017	0,6	0,017	2,8	1,4
24	0,018	0,6	0,019	3,1	1,5

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
5	0,1	0,0
7	0,1	0,2
18	1,0	1,1
20	1,3	1,2
22	1,4	1,4
24	1,5	1,5

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 0,079279
Abs. člen	q = -0,3616
Korelační koef.	r = 0,99616



**Protokol 95**

$V_o$	[ml]
T	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,5$

Kůže: 25.9.08/1

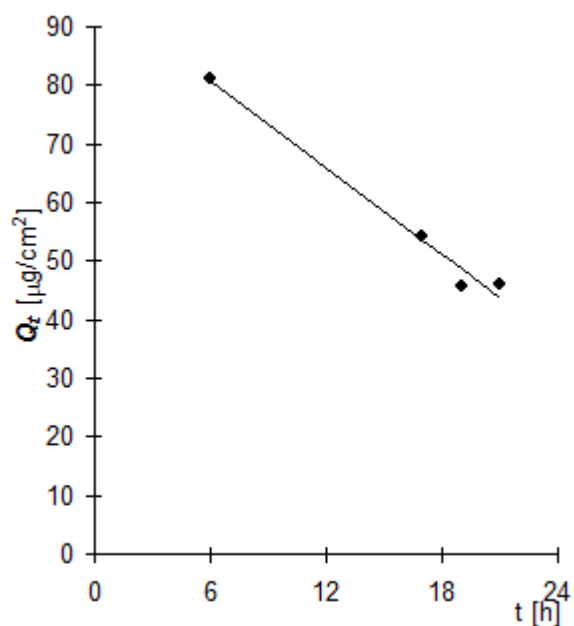
Donor: IPM + PO

Měření: MP/1

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
6	0,928	0,6	0,928	162,4	81,2
17	0,588	0,6	0,620	108,5	54,2
19	0,500	0,6	0,521	91,2	45,6
21	0,508	0,6	0,526	92,0	46,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
6	81,2	80,9
17	54,2	53,7
19	45,6	48,7
21	46,0	43,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = -2,47723
Abs. člen	q = 95,77994
Korelační koef.	r = -0,991



**Protokol 96**

$V_o$	[ml]
$T$	[h]
$C_{nk}$	[mg/100ml]
$\Delta V_{dop}$	[ml]
$C_k$	[mg/100ml]
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o$
$Q_t$	[ $\mu$ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,5$

Kůže: 25.9.08/1

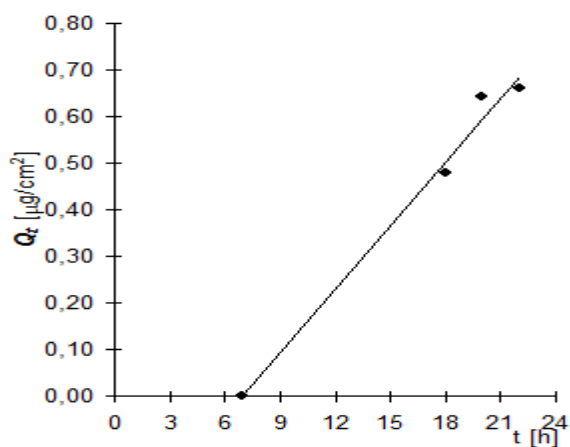
Donor: IPM + PO

Měření: KL/3

t	$C_{nk}$	$\Delta V_{dop}$	$C_k$	$Q_t$	$Q_t$
18	0,006	0,6	0,006	1,0	0,5
20	0,008	0,6	0,008	1,3	0,6
22	0,008	0,6	0,008	1,3	0,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	0,5	0,5
20	0,6	0,6
22	0,7	0,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 0,045639
Abs. člen	q = -0,31944
Korelační koef.	r = 0,993669



## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při provádění permeačních pokusů byly využity poznatky z experimentů prováděných v předchozích letech na katedře farmaceutické technologie Faf UK HK.

Jak methylparaben tak kyselina listová byly použity v množství, které po celou dobu permeace zajišťovalo dostatečné množství difunzibilní formy léčiva.

Pro stanovení koncentrace MP a KL ve vzorcích získaných při jednotlivých odběrech akceptorového média byla využita HPLC, protože plně vyhovuje požadavkům na rychlé a citlivé stanovení s potřebou minimálního množství vzorku. Zvolené podmínky (viz kapitoly 4.6 a 4.7) umožnily dobře rozlišit jednotlivé píky na chromatogramu s retenčními časy pohybujícími se kolem 2,5 min u methylparabenu a kolem 3,5 min u kyseliny listové.

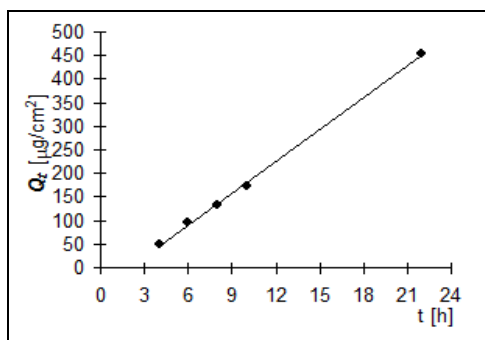
Pro přepočítání plochy pod píkem na koncentraci byly použity následující kalibrační rovnice:

$$\text{Plocha píku} = 1507,52 [\text{mg}/100 \text{ ml}] - 282,67; r = 0,99876 \text{ pro MP}$$

$$\text{Plocha píku} = 947,12 [\text{mg}/100 \text{ ml}] + 2,50; r = 0,99968 \text{ pro KL}$$

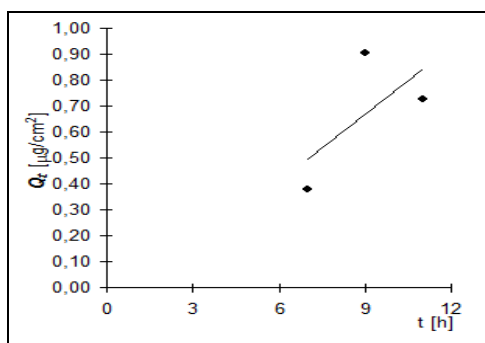
Údaje získané na HPLC byly vyhodnoceny pomocí excelové šablony pro zpracování permeačních pokusů s korekcí odebraných a doplněných objemů akceptorového média.<sup>54</sup> V této šabloně byly také sestaveny průběhy permeací stanovované látky v čase. V každém takto sestaveném průběhu byl, pokud to bylo možné, nalezen úsek ustálené permeace (viz graf č.1 pro vzorek č.3). Krajiní body, které vybočovaly z lineárního průběhu bylo nutné vyloučit, stejně tak i hodnoty, které vybočovaly pravděpodobně z důvodu experimentální chyby.

Graf č.1: Úsek ustálené permeace vzorku MP (převzatý z protokolu č. 3)



V některých případech byly z dalšího vyhodnocování vyloučeny celé vzorky. Důvodem nepoužití vzorku pro další zpracovávání byl fakt, že v grafu závislosti  $Q_t$  na čase nelze nalézt úsek ustálené permeace (viz např. **graf č. 2** pro vzorek vyhodnocený v protokolu 18. Jako kritérium pro nezařazení vzorku pro další hodnocení byl zvolen korelační koeficient menší než 0,9.

*Graf č.2: Množství permeantu (KL) prošlého kožním štěpem  $Q_t$  v závislosti na čase (převzatý z protokolu č. 18)*



Z úseku ustálené permeace byl vypočítán flux  $J$  [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ ] methylparabenu či kyseliny listové jako hlavní parametr sledovaný při permeačních pokusech. Získané fluxy byly pro stejnou látku ve stejném médiu rozdílné, což dokazuje, že transdermální permeace látek je ovlivněna individuálními vlastnostmi kůže a tudíž je třeba vždy zaznamenat jaká kůže byla pro pokusy použita, případně přesněji, jaká část kůže ucha byla užita, jak je uvedeno pro třetí měření (viz **4.3.1. Rozložení vzorků kůže v 3. měření**). Každá kůže mohla mít různé podmínky při jejím zpracování (např. delší čas skladování).

Protokoly pro jednotlivé buňky jsou uvedeny v části **5 DOKUMENTACE**. Získané údaje z jednotlivých měření byly uspořádány do souhrnných **tabulek č. 1, 2 a 3**.

Tab. č.1: Souhrnné výsledky z 1. měření prováděného 11.-12.5.2009 (červeně zvýrazněné vzorky byly kvůli  $r$  menšímu než 0,9 z dalšího zpracování vyloučeny)

Číslo protokolu	Číslo buňky	Permeace	Použitá Kůže	Donor	Počet bodů	J [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ ]	q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	r
1	1.	MP/1	25.9.08/2	PUFR + PG	3	19,40	-66,14	0,99976
2		KL/1			6	0,08	0,29	0,98866
3	2.	MP/1	25.9.08/4	PUFR + PG	5	22,54	-44,88	0,99955
4		KL/1			3	0,09	-0,29	0,99768
5	3.	MP/1	25.9.08/2	IPM	5	31,94	-59,44	0,99993
6		KL/1			5	0,63	-1,44	0,99584
7	4.	MP/1	25.9.08/4	IPM	5	27,82	-44,89	0,99998
8		KL/1			5	0,06	-0,05	0,99907
9	5.	MP/1	25.9.08/2	PUFR	5	25,55	-50,69	0,99932
10		KL/1			4	0,74	-3,13	0,99227
11	6.	MP/1	25.9.08/4	PUFR	5	12,81	36,60	0,99118
12		KL/1			5	0,13	-0,27	0,99637
13	7.	MP/1	25.9.08/4	IPM + PO	5	18,45	-18,09	0,99902
14		KL/1			4	0,04	0,03	0,99547
15	8.	MP/1	25.9.08/4	IPM + PO	5	28,75	26,20	0,99934
16		KL/1			5	0,25	-0,63	0,99495
17	9.	MP/1	25.9.08/10	PUFR + PG	5	49,39	-27,46	0,98756
18		KL/1			3	0,09	-0,11	0,64625
19	10.	MP/1	25.9.08/10	IPM	5	40,04	-38,83	0,99905
20		KL/1			5	0,04	-0,03	0,70712
21	11.	MP/1	25.9.08/10	PUFR	5	33,79	-60,29	0,99686
22		KL/1			4	0,30	-1,42	0,99454
23	12.	MP/1	25.9.08/7	IPM + PO	5	37,02	20,77	0,99708
24		KL/1			5	2,24	-4,25	0,99011

Tab. č.2: Souhrnné výsledky z 2. měření prováděného 18.-20.5.2009

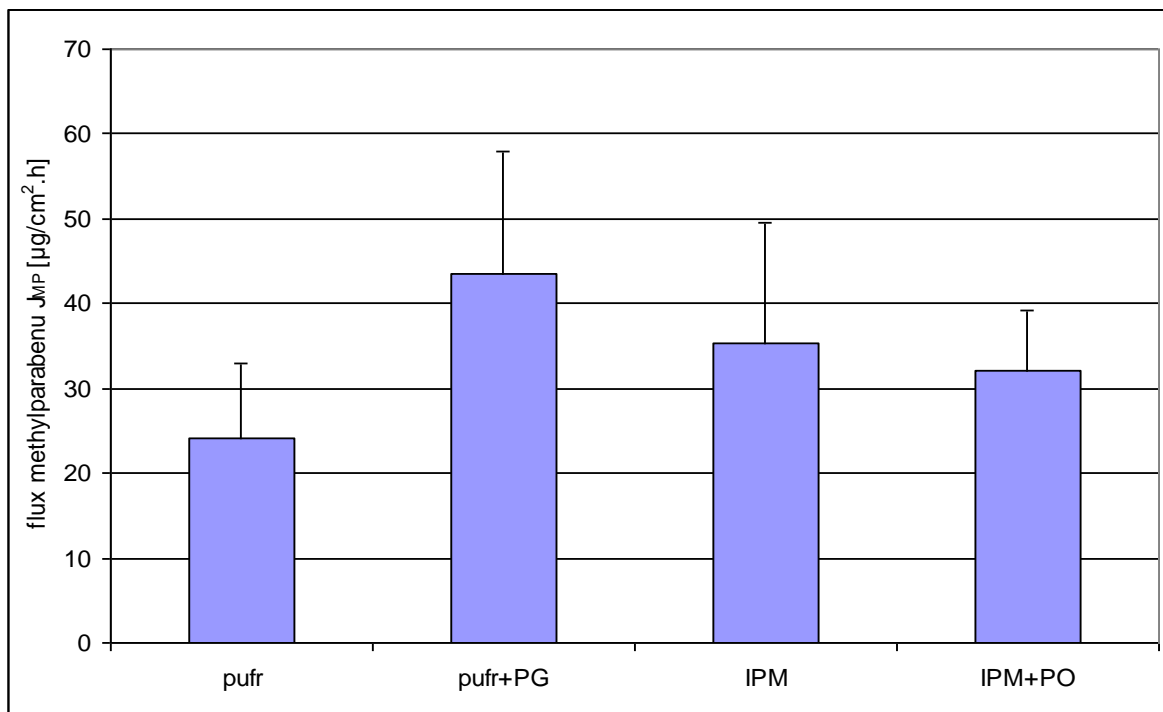
Číslo protokolu	Číslo buňky	Permeace	Použitá kůže	Donor	Počet bodů	J [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ]	q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	R
25	1.	MP/2	25.9.08/7	PUFR + PG	5	70,96	-301,58	0,98771
26		KL/2			4	0,03	-0,12	0,97718
27	2.	MP/2	25.9.08/8	PUFR + PG	5	43,63	-47,98	0,99890
28		KL/2			6	0,02	0,09	0,97251
29	3.	MP/2	25.9.08/5	IPM	3	64,70	-93,77	0,99999
30		KL/2			5	0,13	-0,33	0,99116
31	4.	MP/2	25.9.08/8	IPM	5	39,68	-48,78	0,99896
32		KL/2			4	0,00	0,00	0,98787
33	5.	MP/2	25.9.08/5	PUFR	4	25,25	-14,49	0,98587
34		KL/2			4	0,09	-0,38	0,99634
35	6.	MP/2	25.9.08/8	PUFR	3	15,68	104,31	0,98835
36		KL/2			5	0,11	-0,28	0,99307
37	7.	MP/2	25.9.08/8	IPM + PO	5	35,59	244,47	0,96335
38		KL/2			6	0,01	0,01	0,99774
39	8.	MP/2	25.9.08/8	IPM + PO	3	27,39	51,37	0,94379
40		KL/2			6	0,02	0,00	0,99296
41	9.	MP/2	25.9.08/8	PUFR + PG	5	39,24	44,91	0,99677
42		KL/2			5	0,05	-0,14	0,99619
43	10.	MP/2	25.9.08/8	IPM	4	40,29	-68,45	0,99928
44		KL/2			4	0,23	-1,01	0,99123
45	11.	MP/2	25.9.08/5	PUFR	5	40,78	-91,47	0,98340
46		KL/2			5	0,10	-0,32	0,98834
47	12.	MP/2	25.9.08/5	IPM + PO	5	40,49	194,10	0,92067
48		KL/2			5	0,11	-0,28	0,99089



Tab. č.3: Souhrnné výsledky z 3. měření prováděného 11.-12.8.2009 (červeně zvýrazněné hodnoty, byly kvůli  $r$  menšímu než 0,9 z dalšího zpracování vyloučeny)

Číslo protokolu	Číslo buňky	Permeace	Použitá Kůže	Donor	Počet bodů	J [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ]	q [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	r
49	1.	MP/3	25.9.08/5	PUFR	3	27,14	-36,66	0,99929
50		KL/3			4	0,52	-3,20	0,99987
51	2.	MP/3	25.9.08/5	PUFR	3	21,47	115,09	0,99704
52		KL/3			6	0,35	-1,61	0,99325
53	3.	MP/3	25.9.08/5	PUFR	3	24,86	26,58	0,98691
54		KL/3			6	0,45	-2,26	0,99352
55	4.	MP/3	25.9.08/4	PUFR + PG	3	40,75	-7,70	0,99171
56		KL/3			6	0,26	-1,11	0,99211
57	5.	MP/3	25.9.08/4	PUFR + PG	3	48,17	-87,04	0,99851
58		KL/3			6	0,14	-0,65	0,99626
59	6.	MP/3	25.9.08/4	PUFR + PG	3	51,17	-144,54	0,99373
60		KL/3			6	0,12	-0,54	0,99254
61	7.	MP/3	25.9.08/5	IPM	3	35,73	-45,87	0,98668
62		KL/3			5	0,05	-0,17	0,99557
63	8.	MP/3	25.9.08/3	IPM	3	8,05	3,67	0,93003
64		KL/3			6	0,43	-2,13	0,99085
65	9.	MP/3	25.9.08/5	IPM	3	17,27	1,63	0,92258
66		KL/3			4	0,75	-4,70	0,99988
67	10.	MP/3	25.9.08/4	IPM + PO	3	34,56	-4,01	0,99492
68		KL/3			6	0,49	-2,43	0,99467
69	11.	MP/3	25.9.08/4	IPM + PO	3	35,15	-27,17	0,99427
70		KL/3			5	7,03	-26,03	0,99567
71	12.	MP/3	25.9.08/4	IPM + PO	3	2,17	62,05	0,73750
72		KL/3			6	0,01	-0,02	0,47991
73	13.	MP/3	25.9.08/3	PUFR	4	-12,60	247,14	-0,9764
74		KL/3			4	1,04	-6,50	0,99953
75	14.	MP/3	25.9.08/3	PUFR	3	11,53	44,69	0,99405
76		KL/3			6	0,35	-1,80	0,99259
77	15.	MP/3	25.9.08/3	PUFR	4	27,45	19,94	0,96383
78		KL/3			6	0,57	-2,67	0,98462
79	16.	MP/3	25.9.08/4	PUFR + PG	4	45,01	-26,22	0,76035
80		KL/3			5	0,14	-0,99	0,98009
81	17.	MP/3	25.9.08/4	PUFR + PG	3	56,10	-203,08	0,97596
82		KL/3			4	0,16	-1,72	0,99073
83	18.	MP/3	25.9.08/4	PUFR + PG	3	36,43	-182,50	0,99569
84		KL/3			4	0,08	-1,27	0,99873
85	19.	MP/3	25.9.08/3	IPM	4	32,28	-145,58	0,99845
86		KL/3			5	0,51	-3,86	0,97988
87	20.	MP/3	25.9.08/3	IPM	4	43,74	-148,97	0,93712
88		KL/3			5	0,32	-2,20	0,97960
89	21.	MP/3	29.3.08/3	IPM	4	43,59	-42,94	0,98445
90		KL/3			6	0,20	-0,74	0,96410
91	22.	MP/3	25.9.08/3	IPM + PO	4	17,46	273,85	0,52426
92		KL/3			6	0,64	-2,88	0,97160
93	23.	MP/3	25.9.08/1	IPM + PO	4	5,82	134,61	0,63154
94		KL/3			6	0,08	-0,36	0,99616
95	24.	MP/3	25.9.08/1	IPM + PO	4	-2,48	95,78	-0,9910
96		KL/3			4	0,05	-0,32	0,99367

Graf č.3: Souhrnné průměry fluxů methylparabenu  $J_{MP}$  z použitých donorů ze všech měření (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)

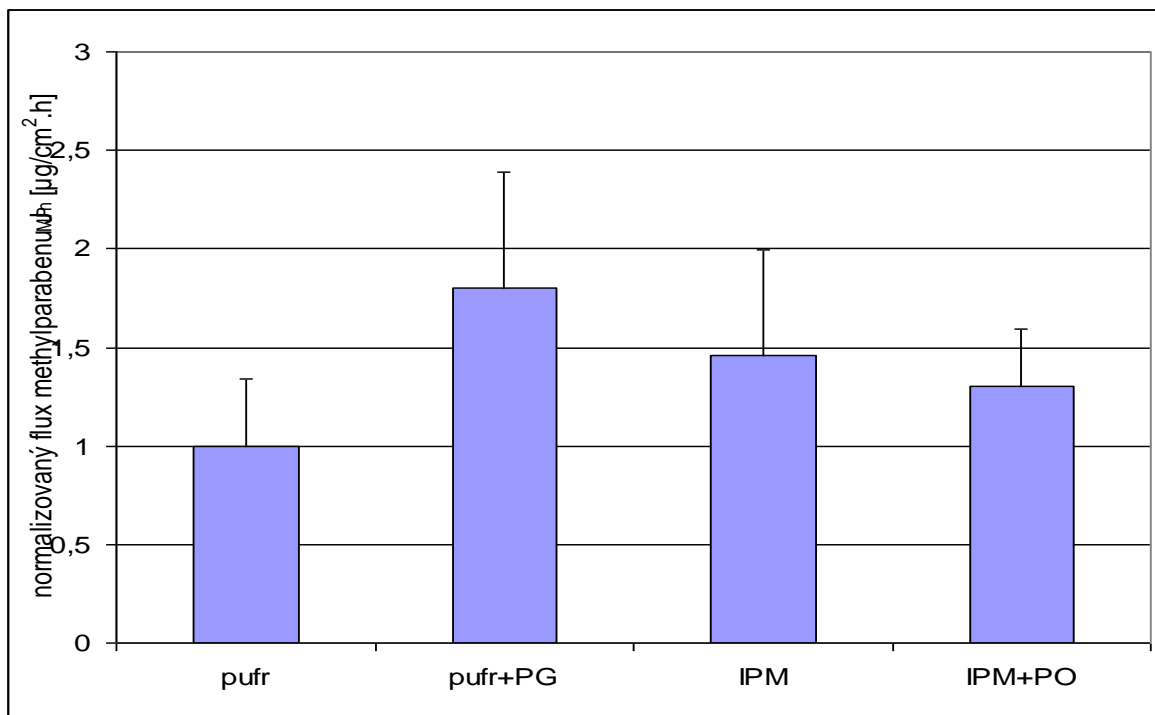


**Graf č. 3** ukazuje rozdíly fluxů methylparabenu v jednotlivých donorových prostředích. Na první pohled je viditelný nejvyšší průměrný flux pro methylparaben z pufru+PG a nejnižší z pufru. Rozdíly mezi průměrnými fluxy methylparabenu z jednotlivých donorových prostředí jsou však statisticky nevýznamná kvůli velké variabilitě dat (vyjádřené směrodatnými odchylkami). Aby se tato variabilita snížila a tím se zvýraznily potenciální rozdíly průměrných fluxů látek z jednotlivých donorů, byla provedena normalizace dat.

Pro výpočet normalizovaných hodnot fluxů z daných donorů použitých pro pokusy byly zvoleny data fluxů z pufru, jako donorového média shodného s akceptorovým, čímž byly eliminovány vlivy vyplývající z rozdílnosti akceptorových a donorových médií.

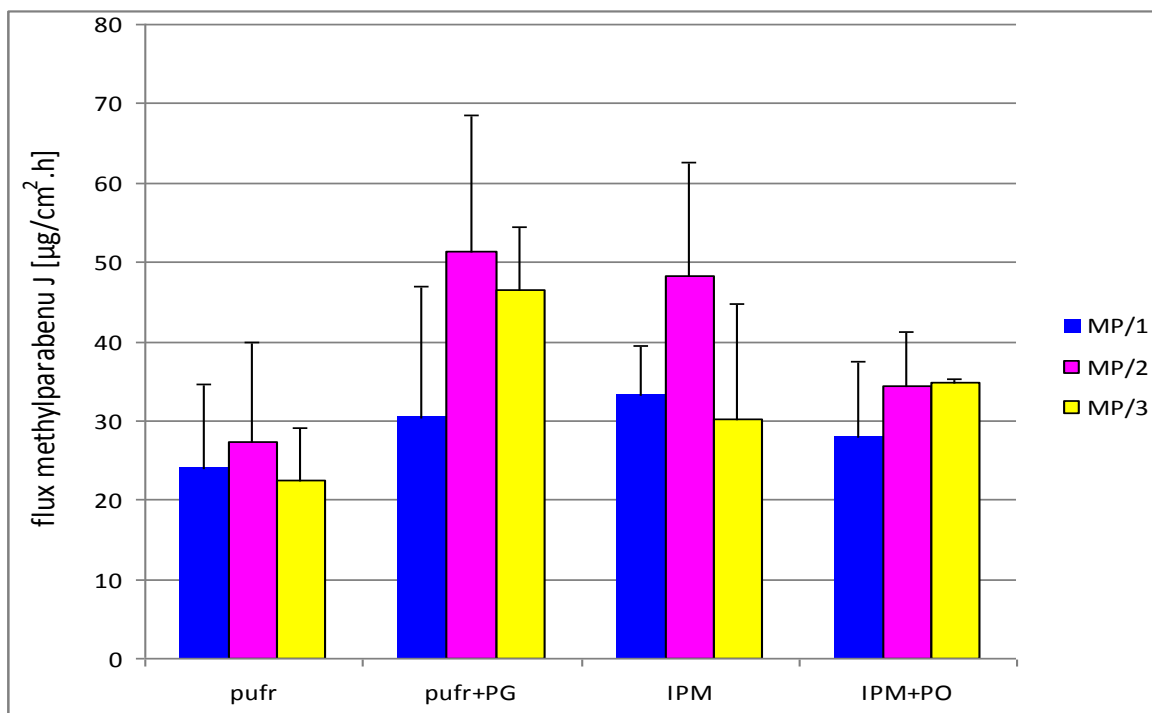
Fluxy MP z každé permeace byly normalizovány vydělením průměrným fluxem MP z donorového roztoku pufru z téže permeace. Z takto získaných normalizovaných hodnot byly opět vypočítány průměry - jak pro jednotlivá měření, tak i pro data shrnutá ze všech měření a byly z nich sestaveny **grafy č. 4 a 6**.

Graf č.4: Poměry normalizovaných fluxů methylparabenu  $J_{MPn}$  z použitých donorů shrnutý ze všech měření (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)



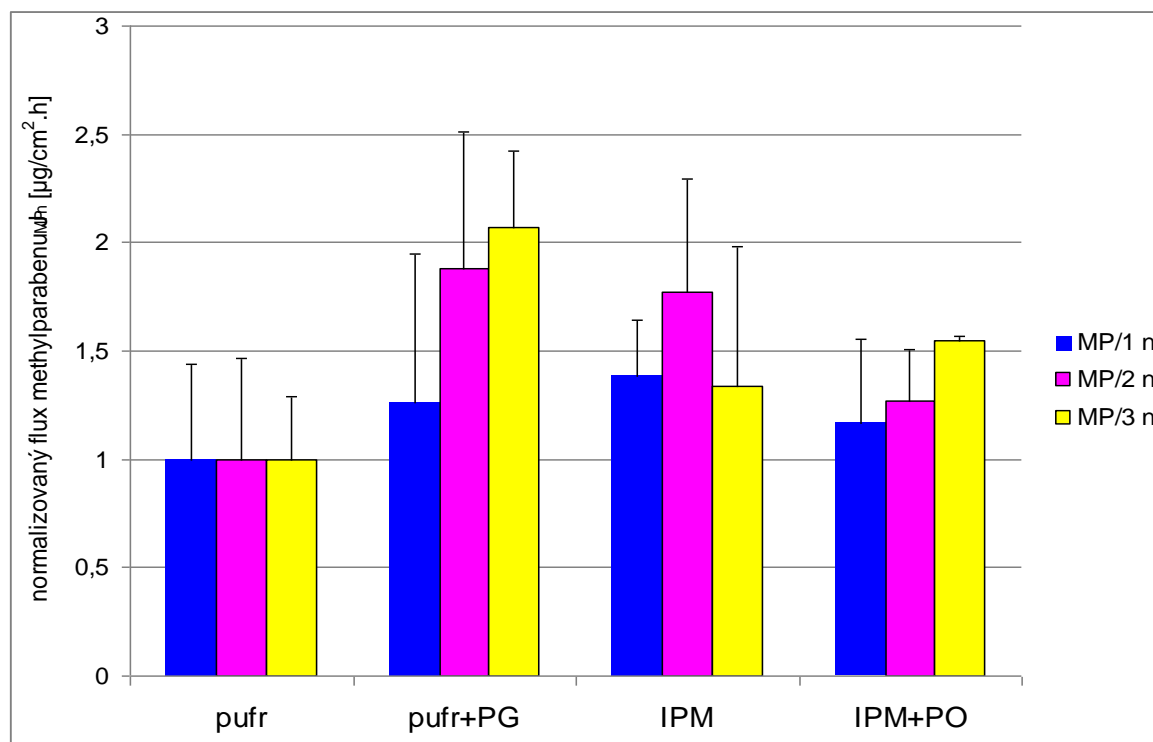
Na **grafu č. 4** je vidět, že rozdíly mezi průměry fluxů methylparabenu v jednotlivých prostředích zůstávají i po normalizaci dat stejné. Methylparaben stále prochází nejlépe z pufru+PG nejhůře z pufru, ale velká variabilita dat stále neumožňuje tyto rozdíly považovat za statisticky signifikantní.

Graf č.5: Průměry fluxů methylparabenu  $J_{MP}$  z použitých donorů v jednotlivých měřeních (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)



**Graf č.5** ukazuje rozdíly mezi jednotlivými měřeními. Mohou být způsobeny nepatrně odlišnými podmínkami při jednotlivých měřeních. Např. teplota lázně se pohybovala u 1. měření v rozmezí 32,2-33,3°C, u 2. měření v rozmezí 37,2-38,5°C a u 3. měření v rozmezí 31,5-32,5°C. To by mohlo také vysvětlit zvýšení fluxů u 2. měření.

Graf č.6: Průměry normalizovaných fluxů methylparabenu  $J_{MPn}$  z použitých donorů v jednotlivých měřeních (úsečky znázorňují směrodatné odchytky)



**Graf č. 6** zobrazuje průměry normalizovaných fluxů pro jednotlivá měření. Můžeme vidět, že se rozdíly mezi jednotlivými měřeními výrazně nezměnily, i když by se snížila variabilita dat. Zřetelným rozdílem oproti předchozímu grafu je relativně vyšší průměrný flux MP v pufru + PG pro třetí měření než u fluxu ze 2. měření, což u nenormalizovaných hodnot bylo právě naopak.

Tab. č.4: Hodnoty průměrů fluxů  $J_{MP}$  a normalizovaných fluxů  $J_{MPn}$  methylparabenu z jednotlivých donorů a jejich směrodatné odchytky (SD) a relativní směrodatné odchytky (RSD)

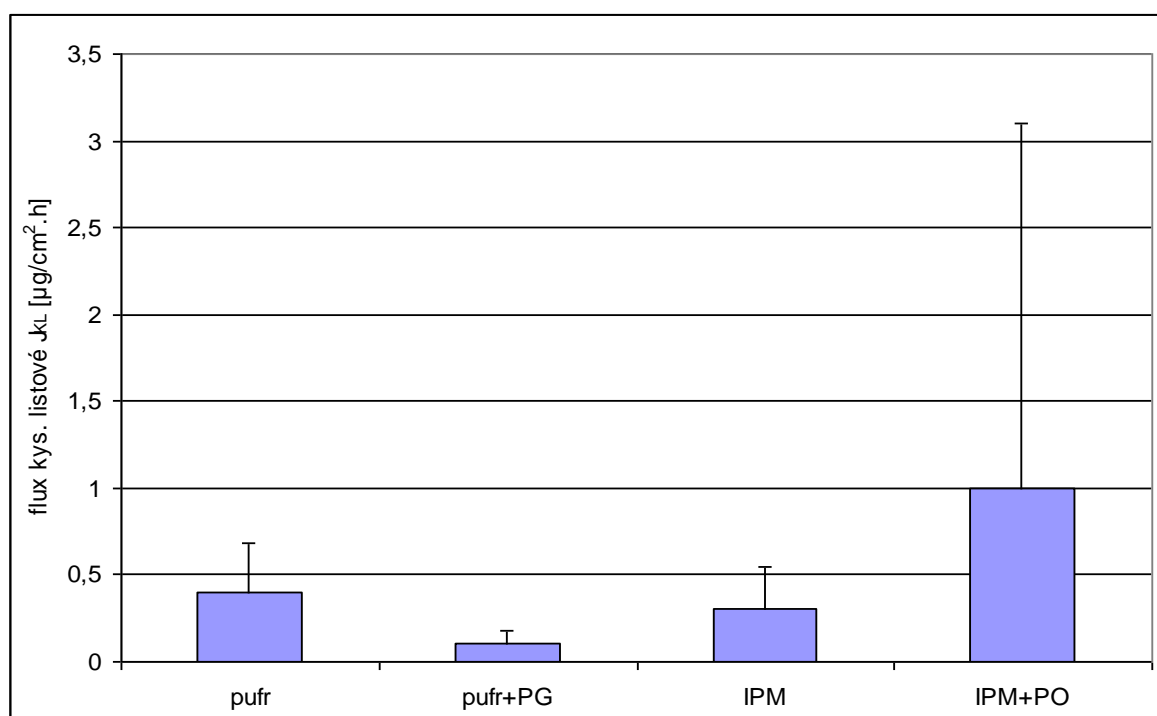
MP	$J_{MP}$ [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ]	SD	RSD	$J_{MPn}$ [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ]	SD	RSD
Pufr	24,2	8,7	36,0%	1,00	0,34	34,1%
pufr+PG	43,4	14,6	33,6%	1,80	0,59	32,7%
IPM	35,4	14,2	40,0%	1,46	0,54	36,8%
IPM+PO	32,2	7,0	21,7%	1,30	0,29	22,5%

Na hodnotách RSDv **tabulce č.4** můžeme vidět zřetelněji rozdíly ve variabilitě dat před a

po normalizaci. Relativní směrodatné odchylky se ve všech případech, kromě IPM + PO, snížily, ale pouze nepatrně. Rozdíly mezi jednotlivými donory stále nejsou statisticky významné.

Stejným způsobem jako u MP byla zpracována i data pro KL.

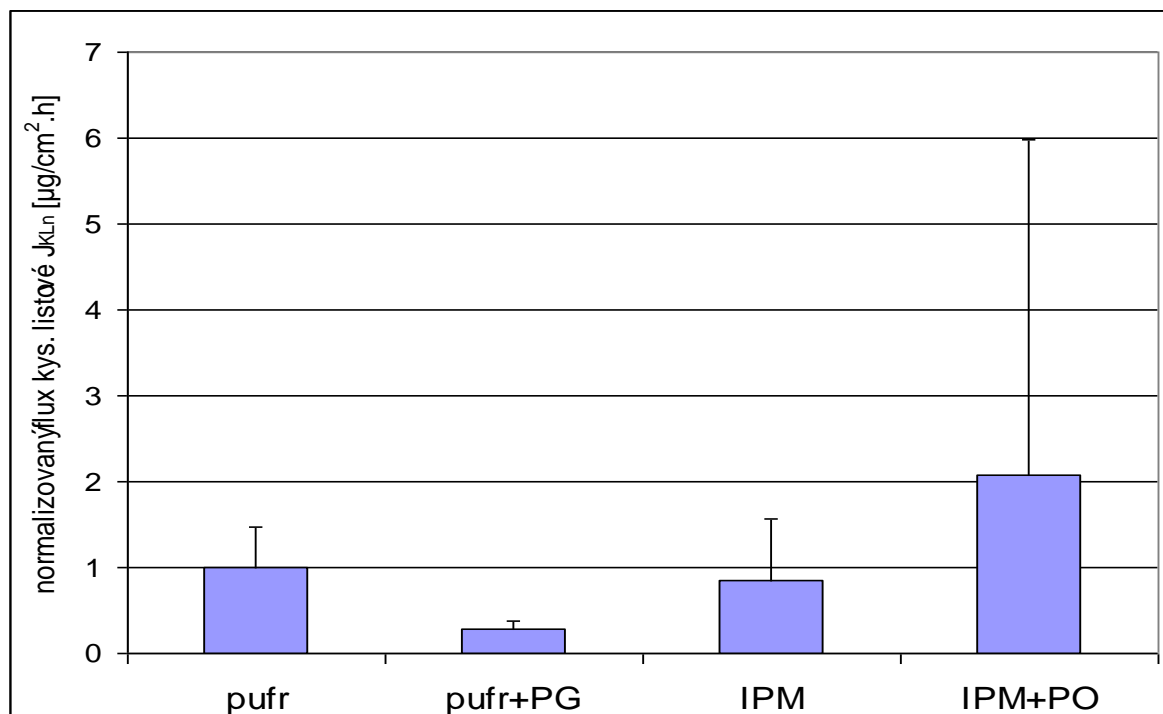
*Graf č.7: Průměry fluxů kyseliny listové  $J_{KL}$  z použitých donorů shrnutých ze všech měření (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)*



Z **grafu č. 7** je na první pohled zřetelný rozdíl v hodnotách fluxů kyseliny listové oproti výše uvedeným fluxům methylparabenu. Fluxy kyseliny listové se pohybují do hodnot okolo  $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ , zatímco u methylparabenu se pohybovaly do hodnot blízcích se  $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ , což je více než desetinásobek. Můžeme z toho usoudit, že MP obecně prochází před kůží lépe než KL, bez ohledu na použité donorové prostředí.

V grafu také můžeme pozorovat fakt, že kyselina listová nejlépe prochází z prostředí IPM+PO, kde je ale také viditelná velmi markantní směrodatná odchylka. I směrodatné odchylky u ostatních donorů jsou dosti velké. Rozdíly v permeaci mezi jednotlivými prostředími jsou tedy opět statisticky nevýznamné.

Graf č.8: Průměry normalizovaných fluxů kyseliny listové  $J_{KL}$  z použitých donorů shrnutých ze všech měření (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)



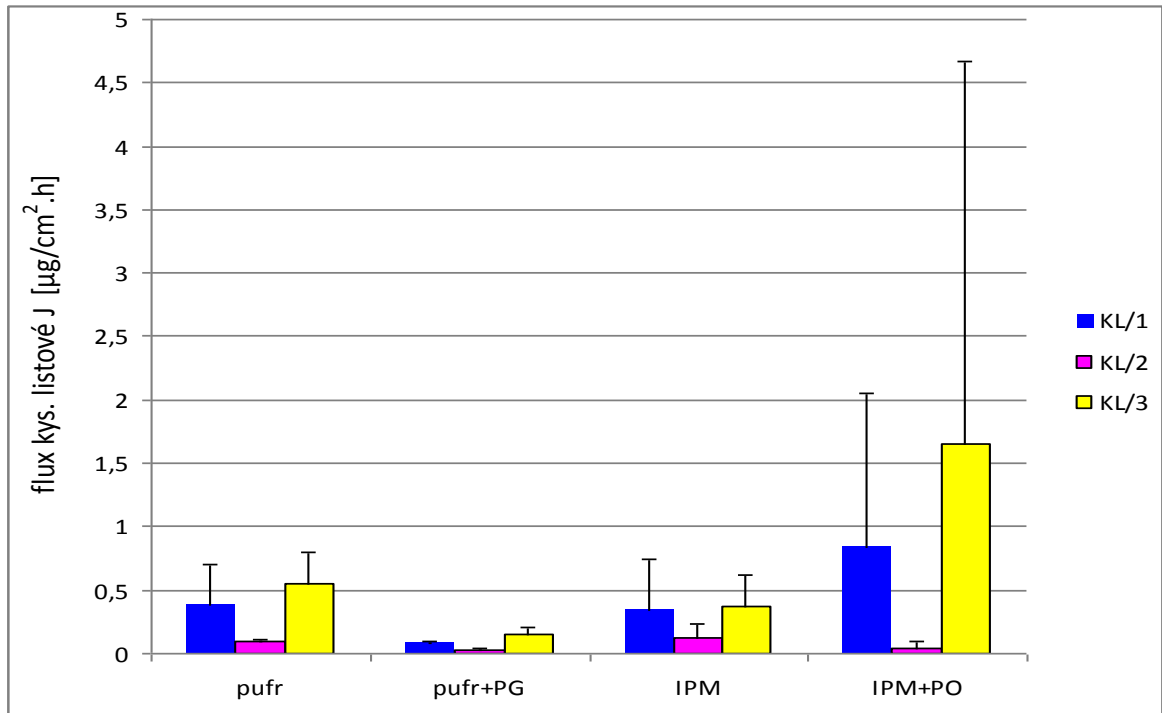
Z grafu č.8 vidíme, že i po normalizování hodnot fluxů ve vztahu k pufru jako donoru se pořadí podle rychlosti průchodu kyseliny listové v jednotlivých donorech nemění. Nejlépe prochází z IMP+PO. Je také vidět, že se směrodatné odchylky normalizací spíše zvýšily, což je zřetelněji patrné z tabulky č.5 uvedené níže. Proto musíme opět konstatovat, že ani po normalizování dat nejsou rozdíly v průchodu KL z jednotlivých prostředí statisticky významné.

Tab. č.5: Fluxy  $J_{KL}$  a normalizovaných fluxy  $J_{KLn}$  kyseliny listové z jednotlivých donorů a jejich směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD).

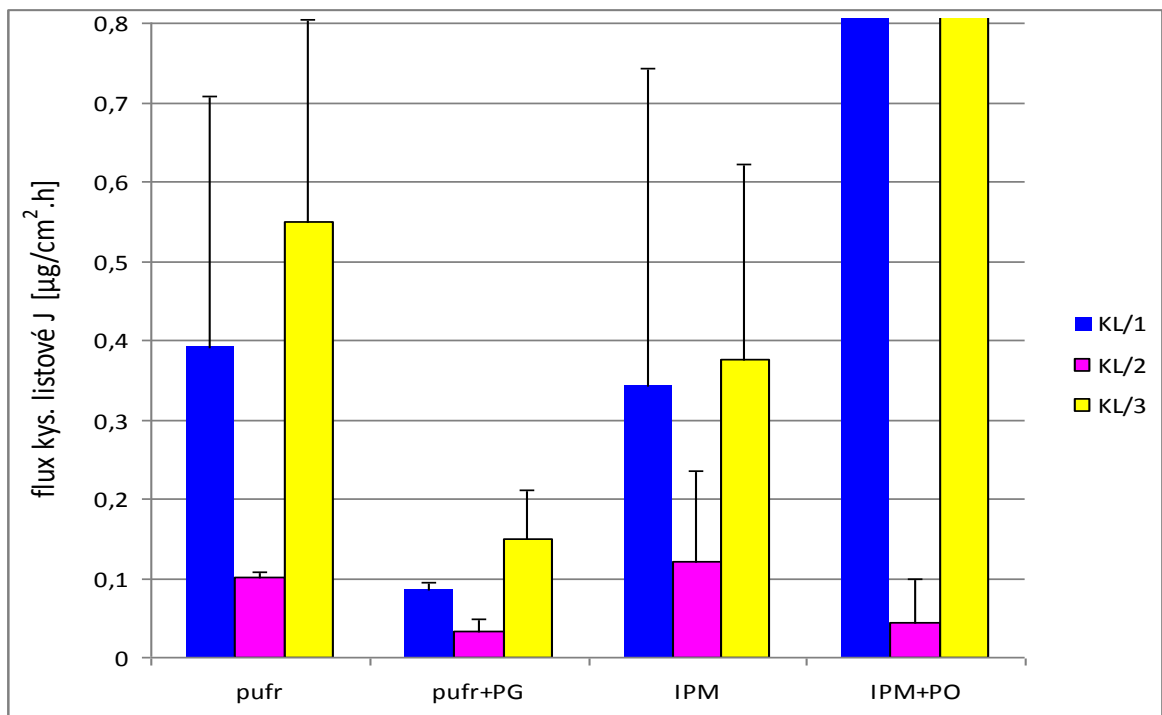
KL	$J_{KL}$ [µg/cm².h]	SD	RSD	$J_{KLn}$ [µg/cm².h]	SD	RSD
Pufr	0,398	0,290	72,9%	1,00	0,47	46,5%
pufr+PG	0,106	0,069	65,0%	0,28	0,11	40,1%
IPM	0,300	0,250	83,1%	0,86	0,72	83,4%
IPM+PO	1,00	2,10	211,4%	2,08	3,91	188,2%

V tabulce č.5 je vidět, že se relativní směrodatné odchylky ve všech případech snížily. Rozdíly mezi jednotlivými donory i přesto zůstávají statisticky nevýznamné.

Graf č. 9: Průměry fluxů kyseliny listové  $J_{KL}$  z použitých donorů v jednotlivých měřeních (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)



Graf č. 9a: Průměry normalizovaných fluxů kyseliny listové  $J_{KL}$  z použitých donorů v jednotlivých měřeních (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)- výsek z grafu 9.



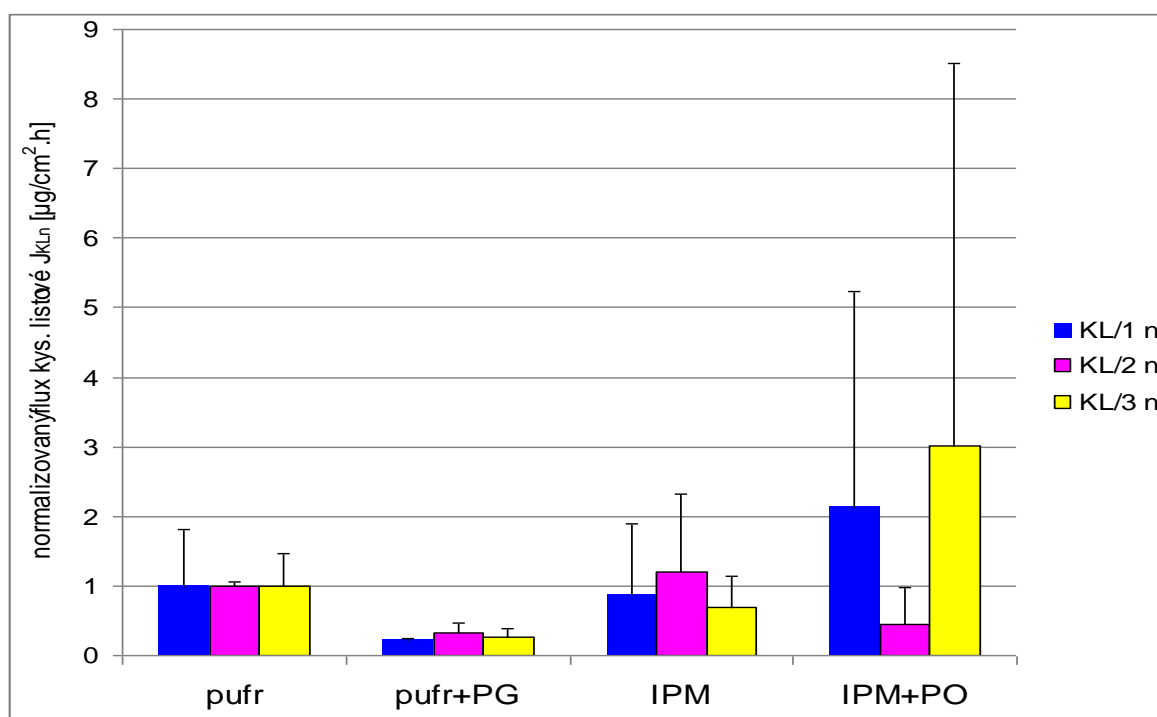


Na **grafu č. 9 a 9a** můžeme vidět rozdíly průchodu kyseliny listové mezi jednotlivými měřeními. Je vidět výrazný rozdíl mezi druhým a třetím měřením. Opět je zde vidět markantní směrodatná odchylka pro donorový roztok IPM+PO s rozdílem oproti předchozímu grafu fluxů KL, že je možné rozpoznat pravděpodobnou příčinu právě ve 3. měření (buňka č. 11. viz protokol č. 70.)

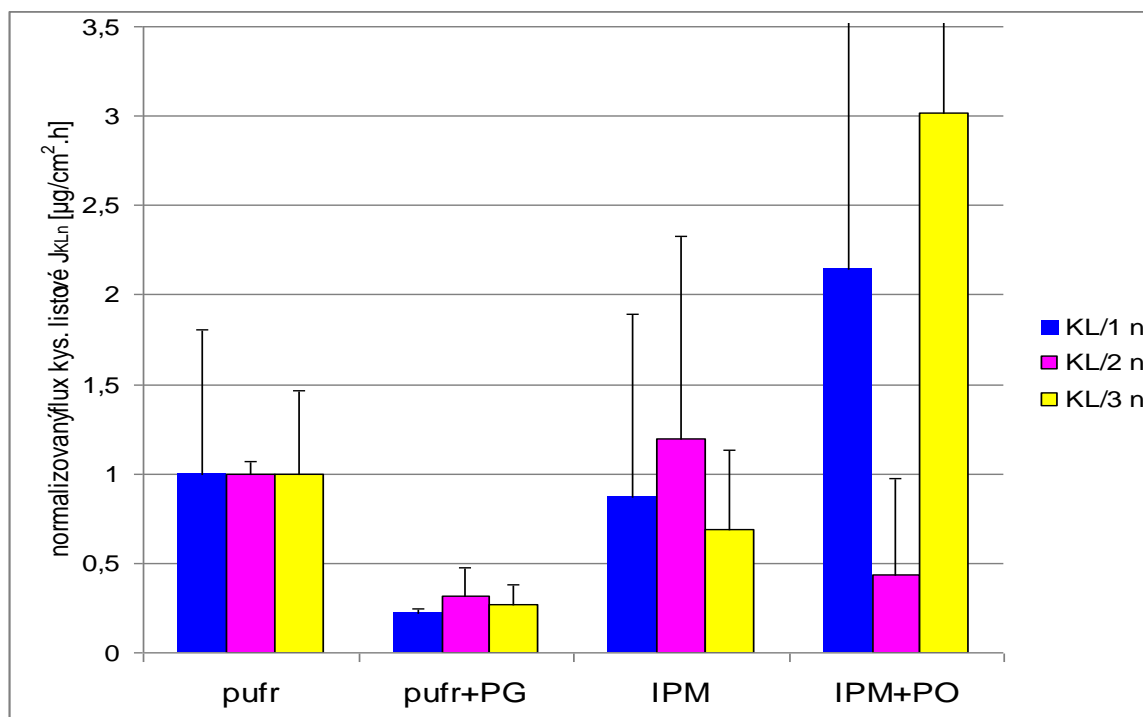
Opět můžeme rozdíly mezi jednotlivými permeacemi vysvětlit rozdílnými podmínkami. Teplota ve vodní lázni s buňkami se u prvního měření pohybovala v rozmezí 31,5-33,2°C, u druhého mezi 34,2-37,3°C a u třetího 32,5-34,0°C. Důvodem podstatně nižších fluxů u 2. měření může být mimo jiné vyšší teplota v lázni.

Také nestabilita kyseliny listové na světle a v teple může přispívat k velké variabilitě získaných dat.

*Graf č.10: Průměry normalizovaných fluxů kyseliny listové  $J_{KL}$  z použitých donorů v jednotlivých měřeních (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)*



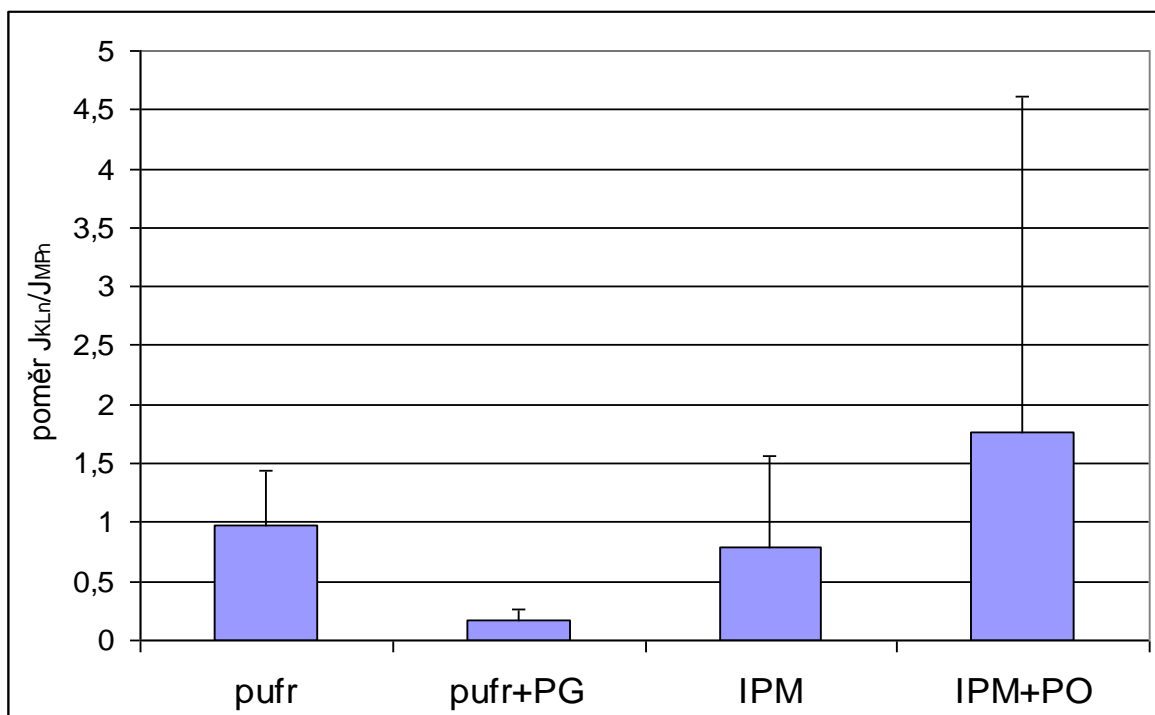
Graf č.10a: Průměry normalizovaných fluxů kyseliny listové  $J_{KL}$  z použitých donorů v jednotlivých měřeních (úsečky znázorňují směrodatné odchylky) - výsek z grafu 10



Ani v případě **grafu č.10**, potažmo **10a** normalizování fluxů nepřineslo výrazné zlepšení. Můžeme vidět, že se rozdíly mezi jednotlivými měřeními výrazně nezměnily oproti předchozímu grafu nenormalizovaných fluxů kyseliny listové v jednotlivých měřeních. Můžeme vidět jen určitý rozdíl mezi hodnotami průměrných fluxů před normalizací a po ní u donorů pufr+PG a IPM, kde se normalizační hodnoty u 2. měření zvýšily na hodnoty vyšší než u 1. a 3. měření. Výše popsané rozdíly opět nejsou statisticky významné.

Pokud by se vhodným uplatněním zohlednění prostupnosti jednotlivých kožních štěpů pro MP na hodnoty fluxů KL přes tytéž kožní štěpy snížila variabilita takto ošetřených dat, bylo by možno považovat MP za vhodný marker pro hodnocení transdermální propustnosti pro KL. Tato korekce byla provedena vydělením normalizovaných fluxů kys. Listové  $J_{KLn}$  normalizovanými fluxy methylparabenu  $J_{MPn}$ . Průměry z takto získaných poměrů  $J_{KLn}/J_{MPn}$  jsou znázorněny v **grafu č. 11** a spolu se svými směrodatnými odchylkami (SD) a relativními směrodatnými odchylkami (RSD) uvedeny v **tab. č. 6**.

*Graf č.11: Průměry poměrů normalizovaných fluxů kyseliny listové ku methylparabenu  $J_{KLn}/J_{MPn}$  v jednotlivých donorech shrnuté ze všech měření (úsečky znázorňují směrodatné odchylky)*



*Tab. č.6: Poměry normalizovaných fluxů kyseliny listové a methylparabenu  $J_{KL}/J_{MP}$  z jednotlivých donorů a jejich směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD).*

	$J_{KLn}/J_{MPn}$	SD	RSD
<b>Pufr</b>	0,98	0,46	46,3%
<b>Pufr+PG</b>	0,18	0,09	52,2%
<b>IPM</b>	0,78	0,77	98,9%
<b>IPM+PO</b>	1,76	2,86	162,4%

Z **tabulky č.6** je zřejmé, že v prostředí IPM+PO je směrodatná odchylka větší než poměr fluxů kyseliny listové a methylparabenu, což je způsobeno výrazně vybočující hodnotou fluxu kyseliny listové z 3. měření (buňka č. 11. viz protokol č. 70).

Porovnání hodnot relativních směrodatných odchylek z normalizovaných fluxů kyseliny listové (viz **tab. č.5**) a relativních směrodatných odchylek z poměrů normalizovaných fluxů kyseliny listové ku normalizovaným fluxům methylparabenu (viz **tab. č.6**) ukazuje, že u pufru+PG a IPM se variabilita dat zvýšila. Z toho vyplývá, že methylparaben není v těchto prostředích vhodným markerem pro hodnocení propustnosti kožních štěpů pro kyselinu listovou.

Pro zjištění míry korelace mezi fluxy kys. listové  $J_{MP}$  a fluxy methylparabenu  $J_{KL}$  z použitých donorů byl vypočten Spearmanův koeficient pořadové korelace  $\rho^{55}$  (viz tab. č. 7).

*Tab. č. 7: Hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu*

	$\rho$	n	kritické hodnoty <sup>56</sup>	H1
<b>Pufr</b>	0,082	11	0,6091	Y
<b>pufr + PG</b>	0,091	10	0,6364	Y
<b>IPM</b>	-0,418	11	0,6091	Y
<b>IPM + PO</b>	0,262	8	0,6905	Y

$\rho$  je Spearmanův korelační koeficient,  $n$  je počet měření, Hypotéza 1: "Flux kys. listové a flux methylparabenu jsou nezávislé na hl. významnosti  $p=0,05$ " prokázána byla (Y), nebyla (N).

Ani u jednoho z donorů nebyla touto metodou vyvrácena hypotéza, že fluxy kys. listové a methylparabenu jsou na sobě nezávislé.

Methylparaben tudíž není vhodným markerem pro transdermální permeaci kyseliny listové z použitých donorových médií.

## 7 ZÁVĚRY

1. *Byly zjištěny následující průměry fluxů  $J_{MP}$  methylparabenu z jednotlivých donorů:*

$$J_{MP} = 24,2 \pm 8,7 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z TRIS pufu}$$

$$J_{MP} = 43,4 \pm 14,6 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z TRIS pufu s PG}$$

$$J_{MP} = 35,4 \pm 14,2 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z IPM}$$

$$J_{MP} = 32,2 \pm 7,0 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z IPM s PO}$$

Methylparaben nejlépe prochází z prostředí TRIS pufu s PG, ale kvůli velké variabilitě dat jsou rozdíly v transdermální propustnosti pro methylparaben z jednotlivých donorových prostředích statisticky nevýznamné.

2. *Dále byly zjištěny následující průměry fluxů  $J_{KL}$  kyseliny listové z jednotlivých donorů*

$$J_{KL} = 0,398 \pm 0,290 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z TRIS pufu}$$

$$J_{KL} = 0,106 \pm 0,069 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z TRIS pufu s PG}$$

$$J_{KL} = 0,300 \pm 0,250 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z IPM}$$

$$J_{KL} = 1,000 \pm 2,100 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h z IPM s PO}$$

Kyselina listová nejlépe prochází z prostředí IPM s PO, ale kvůli velké variabilitě dat jsou rozdíly v transdermální propustnosti kyseliny listové z jednotlivých donorových prostředích statisticky nevýznamné.

3. *Byly vypočítány normalizované fluxy kyseliny listové  $J_{KLn}$  a poměry normalizovaných fluxů kys. listové ku normalizovaným fluxům methylparabenu  $J_{KLn}/J_{MPn}$  z jednotlivých donorů pro všechna měření.*

$$J_{KLn} = 1,00 \pm 0,47 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h, RSD 46,5\% z TRIS pufu}$$

$$J_{KLn} = 0,28 \pm 0,11 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h, RSD 40,1\% z TRIS pufu s PG}$$

$$J_{KLn} = 0,86 \pm 0,72 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h, RSD 83,4\% z IPM}$$

$$J_{KLn} = 2,08 \pm 3,91 \text{ } \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{h, RSD 188,2\% z IPM s PO}$$

$J_{KLn}/J_{MPn} = 0,98 \pm 0,46$ , RSD 46,3% z TRIS pufu

$J_{KLn}/J_{MPn} = 0,18 \pm 0,09$ , RSD 52,2% z TRIS pufu s PG

$J_{KLn}/J_{MPn} = 0,78 \pm 0,77$ , RSD 98,9% z IPM

$J_{KLn}/J_{MPn} = 1,76 \pm 2,86$ , RSD 162,4% z IPM s PO

*Z porovnání jejich relativních směrodatných odchylek (RSD) vyplývá, že methylparaben není v prostředí TRIS pufu s PG a v prostředí IPM vhodným markerem pro hodnocení propustnosti kožních štěpů pro kyselinu listovou*

*4. Hodnocením míry korelace mezi fluxy kys. listové  $J_{MP}$  a fluxy methylparabenu  $J_{KL}$  z použitých donorů pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace bylo zjištěno, že ani v jednom z použitých donorových prostředí není methylparaben vhodným markerem transdermální permeability kys. listové.*

*5. Pro další experimenty bych doporučovala použít jiný marker pro hodnocení transdermální propustnosti kyseliny listové z námi použitých prostředí, případně zvolit jiná donorová prostředí se stejným markerem.*

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>MP</b>	Metylparaben
<b>PG</b>	Propylenglykol
<b>IPM</b>	Isopropylmyristát
<b>PO</b>	Parafinový olej
<b>KL</b>	Kyselina listová
<b>HPLC</b>	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<b>OECD</b>	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Cooperation and Development)
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)
<b>TDDS</b>	Transdermální podání léčiv (Transdermal Drug Delivery systém)
<b>TEWL</b>	Transepidermální ztráta vody (Transepidermal Water Loss)
<b>TER</b>	Elektrický odpor kůže (Transcutaneous Electrical Resistance)
<b>V<sub>o</sub> [ml]</b>	Celkové množství akceleračního média (receptorové tekutiny)
<b>V<sub>dop</sub> [ml]</b>	Množství doplňovaného akceptorového média
<b>C<sub>nk</sub> [mg/100 ml]</b>	Nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
<b>C<sub>k</sub> [mg/100 ml]</b>	Korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
<b>t [h]</b>	Čas
<b>Q<sub>t</sub> [μg]</b>	Množství permeantu prošlého kožní membránou
<b>J [μg/cm<sup>2</sup>.h]</b>	Flux
<b>J<sub>MP</sub> [μg/cm<sup>2</sup>.h]</b>	Flux methylparabenu
<b>J<sub>MPn</sub> [μg/cm<sup>2</sup>.h]</b>	Normalizovaný flux methylparabenu
<b>J<sub>KL</sub> [μg/cm<sup>2</sup>.h]</b>	Flux kyseliny listové
<b>J<sub>KLn</sub> [μg/cm<sup>2</sup>.h]</b>	Normalizovaný flux kyseliny listové
<b>q [μg/cm<sup>2</sup>]</b>	Absolutní člen
<b>SD</b>	Směrodatná odchylka
<b>RSD</b>	Relativní směrodatná odchylka
<b>n</b>	Počet nanesených bodů
<b>r</b>	Korelační koeficient

## 9 POUŽITÁ LITERATURA

---

- <sup>1</sup> KOMÁREK, P.; RABIŠKOVÁ, M., et al. *Technologie léků*. Třetí, přepracované a doplněné vydání. Praha : Galen, 2006. Absorpce léčiv z léků dermálních a transdermálních, s. 174-178.
- <sup>2</sup> WILIAMS, A. *Transdermal and Topical Drug Delivery: From Theory to Clinical Practice* [online]. London, UK : Pharmaceutical Press, 2004 [cit. 2010-03-02]. Dostupné z WWW: <<http://www.worldcat.org/title/transdermal-and-topical-drug-delivery-from-theory-to-clinical-practice/oclc/53123369>>.
- <sup>3</sup> HADAŠOVÁ, E. Lipozomální lékové formy pro topickou aplikaci. *Remedia*. 2006, 16, s. 509-513.
- <sup>4</sup> TROJAN, S., et al. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2003. Fyziologie kůže, s. 417-422.
- <sup>5</sup> ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. 1. vydání. Praha : Grada Publishing, a.s., 1997. Anatomie kůže, s. 559-574.
- <sup>6</sup> CHEN, L.; LIAN, G.; HAN, L. Modeling transdermal penetration. Part I. Predicting skin permeability of both hydrophobic and hydrophilic solutes. *AIChE J.* 2009, 56, s. 1136-1146.
- <sup>7</sup> TANNER, T.; MARKS, R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Research and Technol.* 2008, 14, s. 249-260.
- <sup>8</sup> KOTINGOVÁ, L.; BORSKÁ, L.; FIALA, Z. Testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. *Chem. Listy*. 2009, 103, s. 533-539.
- <sup>9</sup> BARBERO, A.M.; FRASH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. *Toxicol. in Vitro*. 2008, 23, s. 1-13.
- <sup>10</sup> DIEMBECK, W. Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, 1999, 37, 2-3, s. 191-205. Cit. dle 8.
- <sup>11</sup> ŠEVČÍK, P.; ADAM, Z. Transdermální buprenorfin. *Remedia*. 2006, 16, s. 514-521.
  
- <sup>12</sup> MOGHIMI, H.; NOORANI, N. ; ZARGHI, A. . Stereoselective permeation of tretinoin and isotretinoin through enhancer-treated rat skin. II. Effects of lipophilic penetration enhancers. *Iran. J. Pharm. Res.* 2004, 3, s. 17-22. Dostupný také z WWW: <<http://www.ijpr-online.com/Docs/20041/IJPR226.htm>>.



- 
- <sup>13</sup> *Razor Gator* [online]. 2010 [cit. 2010-06-02]. Stratum Corneum. Dostupné z WWW: <<http://www.razor-gator.com/SkinAcidsPhotos/Stratum-Corneum.htm>>.
- <sup>14</sup> LAMPE, M.A., et al. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variation. *Lipid Res.* 1983, 24, s. 120-130. Cit. dle 9.
- <sup>15</sup> MIYAJIMA, K., et al. Effects of absorption enhancers and lipid-composition on drug permeability through the model membrane using stratum corneum lipids. *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42, s. 1345-1347. Cit. dle 9.
- <sup>16</sup> LAW, S., et al. Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. *Arch. Oral Biol.* 1995, 40, s. 1085-1091. Cit. dle 9.
- <sup>17</sup> NORLEN, L., et al. Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 1999, 112, s. 72-77. Cit. dle 9.
- <sup>18</sup> ASBILL, Ch.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: Local versus transdermal activity. *Pharm. Sci Technol. Today.* 2000, 3, s. 36-41.
- <sup>19</sup> HRABÁLEK, A., et al. Akceleranty trasdermální penetrace. *Chem. Listy.* 1999, 93, s. 107-119.
- <sup>20</sup> ALIKHAN, A.; FARAHMAND, S.; MAIBACH, H.I. Correlating percutaneous absorption with physicochemical parameters *in vivo* in man: agricultural, steroid, and other organic compounds. *J. Appl. Toxicol.* 2009, 29, s. 590-596.
- <sup>21</sup> *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption.* Paris : OECD, 2004. 31 s.
- <sup>22</sup> DURACHER, L., et al. The influence of alcohol, propylene glycol and 1,2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised skin. *Int. J. Pharm.* 2009, 374, s. 39-45.
- <sup>23</sup> BARRY, B. W. *Dermatological Formulation: Percutaneous Absorption.* New York : Marcel Dekker, 1983. 480 s.. Cit. dle 22
- <sup>24</sup> BOUCAUD, A.; MACHE, L.; ARBEILLE, B. *In vitro* study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. *Int. J. Pharm.* 2001, 228, s. 69-77. Cit. dle 22.
- <sup>25</sup> GUY, R. Iontophoresis-recent development. *Pharm. Pharmacol.*, 1997, 50, s. 371-374. Cit. dle 22.

- 
- <sup>26</sup> BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Release*, 1987, 6, s. 85-97. Cit. dle 22.
- <sup>27</sup> WALKER, R.B.; SMITH, E.W. The role of percutaneous penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1996, 18, s. 295-301.
- <sup>28</sup> *Wikipedia* [online]. 2009 [cit. 2010-10-12]. *In vivo*. Dostupné z WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/In\\_vivo](http://cs.wikipedia.org/wiki/In_vivo)>.
- <sup>29</sup> *Wikipedia* [online]. 2009 [cit. 2010-10-12]. *In vitro*. Dostupné z WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/In\\_vitro](http://cs.wikipedia.org/wiki/In_vitro)>.
- <sup>30</sup> VECCHIA, B.E.; BUNGE, A. *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology*. Boca Raton : CRC Press, 2006. Animal models: A comparison of permability coefficients for excised skin from humans and animals, s. 305-333. Cit. dle 9.
- <sup>31</sup> WALKER, M.; DUGARD, P.H.; SCOTT, R.C. *In vitro* percutaneous-absorption studies - a comparison of human and laboratory species. *Hum. Toxicol.* 2007, 2, s. 220-229. Cit. dle 9.
- <sup>32</sup> CALABRESE, E.J. Gastrointestinal and dermal absorption: interspecies differences. *Drug Metab. Rev.* 1984, 15, s. 1013-1032. Cit. dle 9.
- <sup>33</sup> MEYER, W.; NEURAND, R.; SCHWARZ, K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Current Probl. Derm.* 1978, 7, s. 39-52. Cit dle 9.
- <sup>34</sup> MONTEIRO-RIVIERE, N.; RIVIERE, J.E. *Advances in Swine in Biomedical Research*. New York : Plenum Press, 1996. The pig as a model for cutaneous pharmacology and toxicology research, s. 425-458. Cit. dle 9.
- <sup>35</sup> *Standartní operační postup Laboratoře transdermálních penetrací*. Hradec Králové : UK, Faf HK, Katedra farmaceutické technologie, 2007. 5 s.
- <sup>36</sup> BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F.; CONGDON, E.R. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982, 62, s. 481-488. Cit. dle 9.
- <sup>37</sup> HARRISON, S.M.; BARRY, B.W.; DUGARD, P.H. Effect of freezing on human-skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36, s. 261-262. Cit dle 9.
- <sup>38</sup> AHLSTROM, L.A.; CROSS, S.E.; MILLS, P.C. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2007, 30, s. 456-463. Cit. dle 9.

- 
- <sup>39</sup> HAWKINS, G.S.; REIFENRATH, W.G. Influence of skin source, penetration cell fluid, and partition coefficient on *in vitro* skin penetration. *J. Pharm. Sci.* 1986, 75, s. 378-811. Cit. dle 9.
- <sup>40</sup> ATRUX-TALLAU, N., et al. Qualitative and quantitative comparison of heat separated epidermis and dermatomed skin in percutaneous absorption studies. *Arch. Dermatol. Res.* 2007, 299, s. 507-511. Cit. dle 9.
- <sup>41</sup> HENNING, A., et al. Influence of human skin specimens consisting of different skin layers on the result of *in vitro* permeation experiments. *Skin Pharmacol Physiol.* 2008, 21, s. 81-88. Cit. dle 9.
- <sup>42</sup> NOVOTNÝ, J., et al. Dimethylamino Acid Esters as Biodegradable and Reversible Transdermal Permeation Enhancers: Effects of Linking Chain Length, Chirality and Polyfluorination. *Pharm. Res.* 2009, 26, 4, s. 811-821..
- <sup>43</sup> DELANNE, T.; LELIÈVRE, D.; COTOVIO, J. Towards a standardized trans-epithelial electrical resistance measurement on *in vitro* cutaneous and ocular reconstructed models . In *ALTEX Archiv -Suppl. Linz 08* [online]. Künsnacht : ALTEX Edition, 2008 [cit. 2010-05-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.altex.ch/resources/delanne.pdf>>.
- <sup>44</sup> DAVIES, D.J.; WARD, R.J.; HEYLINGS, J.R. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for *in vitro* percutaneous absorption studie. *Toxicol. in Vitro.* 2004, 18, s. 351-358.
- <sup>45</sup> *Wikipedia* [online]. 2010 [cit. 2010-10-15]. Methylparaben. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Methylparaben>>.
- <sup>46</sup> JEWELL, Ch., et al. Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007, 225, s. 221-228.
- <sup>47</sup> ELDER, R.L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *J. Am. Coll. Toxicol.* 1984, 3, s. 147-209. Cit. dle 48.
- <sup>48</sup> DARBRE, P.D.; HARVEY, P.W. Parabens esters: review of recent studies of endocrine toxicity discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxikol.* 2008, 28, s. 561-578.

- 
- <sup>49</sup> JANJUA, N.R., et al. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body application and reproductive and thyroid hormone levels in human. *Environ. Sci. Technic.* 2007, 41, s. 5564-5570. Cit dle 48
- <sup>50</sup> *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.* 12th ed. Rahway, New Jersey : Merck and Co., Inc., 1996. Folic Acid, s. 715..
- <sup>51</sup> *Wikipedia* [online]. 2010 [cit. 2010-10-15]. Kyselina listová. Dostupné z WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_listov%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_listov%C3%A1)>.
- <sup>52</sup> Chemoprevention Branch and Agent Development Committee. Clinical development plan: folic acid. *J. Cell. Biochem.* 1996, 26S, s. 100-113.
- <sup>53</sup> *IPCS INCHEM* [online]. 1992 [cit. 2010-02-15]. Folic Acid. Dostupné z WWW: <<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/folicaci.htm>>.
- <sup>54</sup> KLEMERA P., DOLEŽAL P., BERKA P. Šablona pro zpracování výsledků permeačních pokusů., FaF UK HK, 2008
- <sup>55</sup> *Minnesota State University Moorhead* [online]. 2010 [cit. 2010-05-10]. Calculating Correlation with the Excel Spreadsheet Program. Dostupné z WWW: <<http://www.mnstate.edu/wasson/ed602calccorr.htm>; >.
- <sup>56</sup> ZVÁROVÁ, J. *Základy statistiky pro biomedicínské obory* [online].: Computer Based Learning Unit, University of Leeds., 1999 [cit. 2010-05-10]. Kritické hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu. Dostupné z WWW: <<http://new.euomise.org/czech/tajne/ucebnice/html/html/node15.html#kritSpearman>>.