



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ PENETRACE AKTIVNÍCH LÁTECH

DETERMINATION OF THE PENETRATION OF THE ACTIVE SUBSTANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Natálie Blažejová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1900/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Natálie Blažejová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Stanovení penetrace aktivních látek

Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše na dané téma.
- Simulace prostupu aktivních látek do kůže pomocí Francových cel, Strat-M membrán a prasečích uší.
- Analýza množství prošlé aktivní látky.
- Vyhodnocení výsledků analýz a porovnání výsledků pro různé druhy aktivních látek.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Natálie Blažejová
studentka

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřená na simulaci penetrace aktivních látek používaných v kosmetických přípravcích. Byla sepsána teoretická část, která se zaměřovala na základní charakteristiku aktivních látek používaných v kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. Byla popsána metoda stanovení těchto aktivních látek prostřednictvím Franzových difuzních cel, které slouží ke stanovení koncentrace aktivních látek prošlých skrze kůži použitím různých modelů kůže. Experimentální část byla zaměřena na simulaci penetrace dvou aktivních látek, bisabololu a ektoinu, které byly pro tuto práci poskytnuty kosmetickou firmou Nobilis Tilia. Bylo stanoveno množství těchto aktivních látek prostřednictvím Franzových difuzních cel, kdy byly použita syntetická Strat-M[®] membrána a membrána připravená z kůže prasečího ucha. Dále byla použita metoda tape-stripping, která slouží ke stanovení aktivní látky ve vrstvách kůže. Všechny vzorky byly následně analyzovány metodou UV-VIS spektrometrie a kapalinové chromatografie.

ABSTRACT

This thesis is focused on the simulation of penetration of active ingredients used in cosmetic products. A theoretical part was written which focused on the basic characteristics of active ingredients used in the cosmetic and pharmaceutical industry. A method for the determination of these actives by means of Franz diffusion cells, which are used to determine the concentration of actives passed through the skin using different skin models, was described. The experimental part focused on the simulation of the penetration of two active ingredients, bisabolol and ectoine, which were provided by the cosmetic company Nobilis Tilia for this work. The amount of these actives was determined through Franz diffusion cells, using a synthetic Strat-M[®] membrane and a membrane prepared from pig ear skin. Furthermore, the tape-stripping method was used to determine the active substance in the skin layers. All samples were then analysed by UV-VIS spectrometry and liquid chromatography.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bisabolol, ektoin, Franzova difuzní cela, prasečí kůže, Strat-M[®] membrána, tape-stripping.

KEYWORDS

Bisabolol, ectoin, Franz diffusion cell, pig skin, Strat-M[®] membrane, tape-stripping.

BLAŽEJOVÁ, Natálie. *Stanovení penetrace aktivních látek* [online]. Brno, 2024. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156921>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat mé vedoucí prof. Ing. Martině Klučákové Ph.D. za její vřelou ochotu, dobré vedení a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, přátelům a nejbližším za jejich podporu během celého mého studia.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
	2.1 Aktivní látky používané v kosmetice	7
	2.1.1 Bisabolol	8
	2.1.2 Ektoin	9
	2.1.3 Esenciální oleje používané v kosmetice	10
	2.2 Struktura a funkce kůže	10
	2.3 Transport látek přes kůži	12
	2.4 Metody stanovení aktivních látek	13
	2.4.1 Franzova difuzní cela	13
	2.4.2 Strat-M [®] membrána	14
	2.4.3 Prasečí kůže	15
	2.4.4 Metoda tape stripping	16
3	SOUČASNÝ STAV	18
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
	4.1 Použité chemikálie	21
	4.2 Použité přístroje a pomůcky	21
	4.3 Příprava vzorků aktivních látek	21
	4.3.1 Bisabolol	21
	4.3.2 Ektion	23
	4.3.3 Bisabolol s izoláty	23
	4.4 Příprava prasečí kůže	23
	4.5 Simulace penetrace aktivních látek	25
	4.6 Provedení tape-strippingu	26
	4.7 Metody měření	26
	4.7.1 Měření vzorků pomocí kapalinové chromatografie	26
5	DISKUZE A VÝSLEDKY	27
	5.1 Simulace penetrace bisabololu	27
	5.2 Simulace penetrace ektoinu	38
	5.3 Metoda tape-stripping	50
6	ZÁVĚR	52
7	SEZNAM LITERATURY	54
8	SEZNAM ZKRATEK	60
9	SEZNAM PŘÍLOH	61
10	PŘÍLOHY	62

1 ÚVOD

Tato diplomová práce je zaměřená na simulaci penetrace aktivních látek skrze kůži, které se využívají hlavně v kosmetickém průmyslu. Všeobecně lze ale říci, že v dnešní době roste poptávka po použití těchto aktivních látek nejen v kosmetickém, ale i ve farmaceutickém průmyslu. Tyto aktivní látky mohou být obsaženy ve výrobcích osobní péče, ve výrobcích určených pro ústní a intimní hygienu, v očních kapkách a dalších produktech. Další složkou kosmetických výrobků jsou esenciální oleje, které mohou působit jako přírodní konzervační látky, ale také ovlivňují prostupnost aktivních látek skrze kůži. Všechny tyto výrobky musí být před uvedením na trh vyhodnoceny z hlediska jejich bezpečnosti. Ke studiu dermálních přípravků a permeace aktivních látek kůží se používá Franzova difuzní cela. Prostřednictvím této metody lze stanovit, zda aktivní látka prochází, či neprochází skrze kůži. Pro hodnocení lokálně podávaných léčiv a přípravků slouží model zvířecí kůže, jako je například kůže ucha prasete. Jako náhrada vzorků zvířecí kůže se používá umělá membrána (např. Strat-M[®] membrána). Tyto modely kůže, ať už syntetická membrána, nebo membrána připravená z prasečího ucha nejvíce napodobují lidskou kůži, což z nich dělá nejvhodnější modely pro simulaci penetrace aktivních látek prostřednictvím Franzových difuzních cel.

V teoretické části této diplomové práce je popsáno, jaký typ aktivních látek se v kosmetickém průmyslu používá a také v jakých výrobcích mohou být tyto látky obsaženy. Dále jsou zde popsány dvě aktivní látky, bisabolol a ektoin, a to z důvodu toho, že jsou použity pro simulaci penetrace skrze umělou Strat-M[®] membránu a prasečí kůži. Je zde podrobně popsáno složení syntetické membrány a složení prasečí kůže. Následně jsou tyto modely porovnány s lidskou kůží z hlediska její struktury. Také je zde popsána funkce kůže a transport látek skrze kůži. Dále se tato část zabývá popisem Franzových difuzních cel a metodou tape-stripping, která slouží ke stanovení aktivních látek v hlubších vrstvách kůže.

Experimentální část je následně zaměřena na studiu penetrace bisabololu a ektoinu prostřednictvím Franzových difuzních cel, kdy byla použita jak syntetická Strat-M[®] membrána, tak membrána připravená z kůže prasečího ucha.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Aktivní látky používané v kosmetice

V současné době roste poptávka veřejnosti po kosmetických a farmaceutických přípravcích obsahujících přírodní složky namísto syntetických, což vede k nárůstu používání bioaktivních složek v lokálních přípravcích [1].

Je třeba rozlišovat mezi přírodními složkami, složkami přírodního původu a organickými složkami. Přírodní složky jsou chemické látky, které jsou nezpracované nebo zpracované. Tyto složky mohou být zpracované mechanicky, ručně, přírodním rozpouštědlem, gravitačně, rozpuštěním ve vodě, zahřátím za účelem odstranění vody a extrahované ze vzduchu jakýmkoli způsobem. Přírodně získané složky jsou látky z rostlinné, minerální nebo živočišné říše, chemicky zpracované nebo kombinované s jinými složkami, s výjimkou složek pocházejících z ropy a fosilních paliv. Přírodně získané složky jsou také ze složek získaných z rostlinné suroviny a biologicky vyrobených pomocí zmýdelnění, fermentace, kondenzace nebo esterifikace za účelem zvýšení účinnosti nebo udržitelnosti složky [2]. Rostlinné extrakty mohou působit například jako konzervační látky nebo jako látky proti stárnutí, pokud vykazují antimikrobiální, resp. antioxidační vlastnosti. Další oblastí kosmetiky, kde se přírodní výtažky zkoumají, je ústní a intimní hygiena [1].

Výtažky z aromatických, bylinných a léčivých rostlin jako účinných látek obsahují biologicky aktivní molekuly (např. fenolové kyseliny, polyfenoly, triterpeny, stilbeny, flavonoidy, steroidy, steroidní saponiny, karotenoidy, steroly, mastné kyseliny, cukry, polysacharidy, peptidy atd). Bioaktivní extrakty se získávají také z řas, hub, vedlejších produktů rostlinného původu a technologií rostlinných buněčných kultur [2]. Výrobky osobní péče (PCP–personal care products), které spotřebitelé denně používají, způsobují lokální (kožní, oční) expozici a používají se v ústní dutině, na obličeji, rtech, očích a sliznicích. Proto lze systémovou expozici člověka jejich složkám zřídka zcela vyloučit. Kromě toho mohou přírodní a syntetické látky vyvolat lokální účinky na lidskou kůži, jako je podráždění, senzibilizace nebo fotoreakce. Tyto výrobky musí být před uvedením na trh důkladně vyhodnoceny z hlediska jejich bezpečnosti [3].

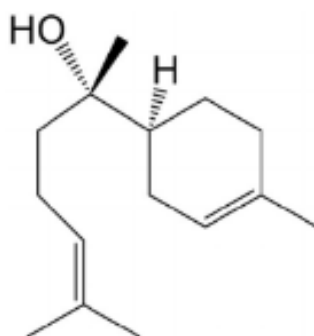
Účinnost výrobků pro péči o pleť závisí nejen na jednotlivých účinných látkách, ale také na použitém nosiči. Je známo, že správné složení kožních přípravků přizpůsobené stavu pokožky může představovat mnoho pozitivních účinků na hydrataci a stabilizaci epidermální bariéry pokožky. Obecné složení s interakcí mezi nosičem, účinnou látkou a pokožkou ovlivňuje přípravu a uvolňování účinné látky [4].

2.1.1 Bisabolol

Bisabolol, známý jako (-)- α -bisabolol, je nenasycený monocyklický seskviterpenový alkohol s vědeckým názvem alfa-4-dimethyl-alfa-(4-methyl-3-pentenyl)-3-cyklohexen-1-methanol a chemickým vzorcem $C_{15}H_{26}O$, který byl poprvé izolován z květů heřmánku (*M. chamomilla*). V přírodě se může vyskytovat ve čtyřech možných stereoizomerech: (-)- α -bisabolol (známý jako levomenol), (-)-epi- α -bisabolol, (+)- α -bisabolol a (+)-epi- α -bisabolol. (-)- α -bisabolol je vysoce lipofilní látka, která se snadno oxiduje za vzniku dvou oxidů bisabololu. Bisabolol je světle nažloutlá kapalina se sladkou květinovou vůní. Jedná se o nízkohustotní látku, která je rozpustná v methanolu a její bod varu je při 12 Torrech 153 °C [5]. (-)- α -Bisabolol se přirozeně vyskytuje v kandeii (*Eremanthus erythropappus*) a heřmánku pravém (*Matricaria recutita*) [6]. Dále se vyskytuje v šalvěji (*Salvia runcinata*), *Myoporum crassifolium* a negramině (*Siparuna guianensis*) [7]. Lze jej získat jejich extrakcí rozpouštědlem a destilací z esenciálního oleje. Tyto postupy však nepostačují k uspokojení průmyslové poptávky z důvodu ekologických problémů a nízké výtěžnosti extrakce [8]. (-)- α -bisabolol byl také připraven chemickou syntézou, která vyžadovala dodatečné čištění (-)- α -bisabololu od jeho diastereomerů, (+)- α -bisabololu a (\pm)-epi- α -bisabololu, které vznikly během syntetického procesu [6]. V poslední době je biologická výroba enantioselektivního (-)- α -bisabololu pomocí upravených mikrobů velmi perspektivní, protože umožňuje obejít omezení tradičních postupů [8].

Předchozí studie uváděly, že (-)- α -bisabolol má řadu účinků, například protiinfekční, protinádorové, protizánětlivé, gastroprotektivní, nefroprotektivní a antioxidační. Působí také proti vedení bolestivých podnětů [7,9]. Díky svým hydratačním a zklidňujícím vlastnostem se používá jako složka léčiv [6].

Tato sloučenina se používá v kosmetických přípravcích, jako jsou pleťové vody a krémy, protože jsou u ní prokazatelné hojivé účinky na pokožku [7,10]. Používá se také v jemných vůních [10]. V budoucnu by se (-)- α -bisabolol mohl uplatnit v klinické praxi díky své analgetické funkci. (-)- α -bisabolol má navíc nízkou fyziologickou toxicitu a má velký potenciál stát se široce používaným zdravotnickým prostředkem [6].



Obrázek 1 Strukturální vzorec (-)- α -bisabololu [11]

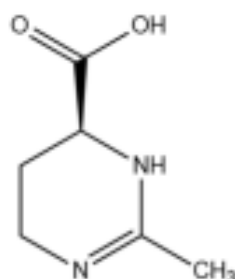
2.1.2 Ektoin

Ektoin, známý také jako 1,4,5,6-tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinkarboxylová kyselina, je derivát L-aspartátu [12,13]. Vyskytuje se u halofilních mikroorganismů [13]. Halofilní neboli vůči soli tolerantní mikroorganismy akumulují velké množství ektoinu, aby se přizpůsobily prostředí s vysokým obsahem soli a teplot [14]. Kromě toho je známo, že ektoin stabilizuje proteiny proti zahřívání a mrznutí a také proti snížené aktivitě vody [15].

Ektoin má tu vlastnost, že se váže na vodu, čímž může dobře vyrovnávat osmotický tlak uvnitř a vně buněk, a vytváří komplex s ochranným účinkem na proteiny a buněčné membrány proti náročným podmínkám prostředí [12,16]. Díky svým protitlakovým vlastnostem je ektoin široce využíván pro celkovou ochranu buněk, včetně osmotické ochrany, radiační ochrany a hydratačních účinků. Kromě toho je ektoin multifunkční účinnou látkou, která zlepšuje imunitní ochrannou schopnost kožních buněk a zvyšuje jejich schopnost obnovy [14].

Výroba ektoinu závisí především na mikrobiální fermentaci za použití mikroorganismů izolovaných z přírodního prostředí [14]. Průmyslovou výrobu ektoinu by bylo možné zajistit fermentací halofilních bakterií. Problémem je, že podmínky kultivace s extrémně vysokou salinitou by mohly vést k silné korozi fermentačního zařízení a potížím při následném čištění. Proto by mohla být praktičtější výroba ektoinu pomocí běžných mikroorganismů [13]. V přírodě byly úspěšně izolovány a použity k produkci některé kmeny produkující ektoin, například *Halomonas* sp., nicméně účinnost produkce byla stále nízká. S rychlým rozvojem syntetické biologie a fermentačního inženýrství bylo vyvinuto mnoho strategií pro zlepšení produkce ektoinu a zjednodušení výrobního procesu. Například některé modelové mikroorganismy, jako jsou *Escherichia coli* a *Corynebacterium glutamicum*, byly geneticky modifikovány tak, aby dosáhly vysoké produkce ektoinu [12].

Ektoin se hojně využívá v kosmetickém průmyslu, především jako složka pleťových krémů a pleťových vod. Dále se využívá ve farmaceutickém průmyslu jako součást nosních sprejů, očních kapek a plicních inhalačních tekutin [16]. Jako přísada do pleťových vod a sprejů vykazuje například hydratační, protistárnoucí a mírně protizánětlivé účinky na pokožku a sliznice. Dále bylo prokázáno, že ektoin zasahuje do prozánětlivé signální dráhy keratinocytů, bronchiálních epiteliálních buněk, buněk hladkého svalstva střeva a makrofágů [15]. Kromě jeho hlavní funkce v buněčné osmotické homeostáze a odolnosti vůči šokům s vysokou osmolaritou je také široce využíván v různých aplikacích, včetně inhibice neurodegenerativních onemocnění a ochrany kůže před buněčným poškozením [13].



Obrázek 2 Strukturní vzorec ektoinu [12]

2.1.3 Esenciální oleje používané v kosmetice

Esenciální oleje (EO) představují komplexní směsi těkavých až polotěkavých sloučenin s různou chemickou a izomerní strukturou [17]. Jedná se o sekundární metabolity, které se obvykle destilují/extrahují z rostlin [18].

Terpeny jsou největší skupinou přírodních vonných látek. Na molekulární úrovni se jedná o uhlovodíky složené z isoprenových podjednotek. Pro klasifikaci terpenů se používá počet isoprenových jednotek. Monoterpeny (např. geraniol, citronellol a citral) se skládají ze dvou izoprenových jednotek a představují nejpočetnější skupinu v EO. Mezi terpenové sloučeniny obsažené v EO patří uhlovodíky (např. limonen nebo β -karyofylen), alkoholy (např. geraniol, citronellol a linalool), fenoly, estery, oxidy, ketony (např. karvon a kafr), aldehydy (např. neral a citral) a fenylypropanoidy (např. eugenol a myristicin) [19].

EO jsou celosvětově velmi žádané, protože tyto fytochemikálie hrají hlavní roli v kosmetice, potravinářském průmyslu a farmaceutických přípravcích [17]. Esenciální oleje se běžně používají v kosmetických přípravcích, zejména v parfémeh a masážních olejích. V kosmetice mohou EO působit jako přírodní konzervační látky díky antimikrobiálním vlastnostem [19]. Je známo, že pronikají do lidské kůže, většinou pasivní difuzí, a ovlivňují propustnost kůže pro další biologicky aktivní složky dodávané z lokálních přípravků [20]. Ačkoli jsou přírodní sloučeniny obecně považovány za bezpečné, některé vonné látky mohou způsobovat podráždění kůže a alergické reakce. V přírodě se EO podílejí na obraně rostlin proti hmyzu, býložravcům a mikroorganismům. Dále vyvolávají signální procesy, které lákají opylovače [19].

2.2 Struktura a funkce kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla a u zdravého dospělého člověka má plochu asi 2 m². Lidská kůže je složitý orgán, který funguje jako první ochranná bariéra těla [21]. Zdravá kůže také udržuje optimální hladinu vody a pomáhá regulovat tělesnou teplotu. Kůže je měnící se, dynamický orgán, který se skládá ze tří hlavních funkčních vrstev – epidermis, dermis a subcutis, z nichž každá se skládá z několika dílčích vrstev. Vrchní vrstva epidermis, stratum corneum (SC), zajišťuje chemickou bariéru tím, že selektivně propouští molekuly se specifickými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Dermis poskytuje mechanickou oporu kůži a hypodermis reguluje teplotu kůže [22]. Kožní přívesky, jako jsou folikuly a mazové a potní žlázy, také hrají v její celkové funkci svou roli, jako je například změkčování pokožky v případě mazových žláz. Potní žlázy vylučují pot, který je zapotřebí zejména k regulaci tělesné teploty a mimo jiné také brání pronikání choroboplodných zárodků [23].

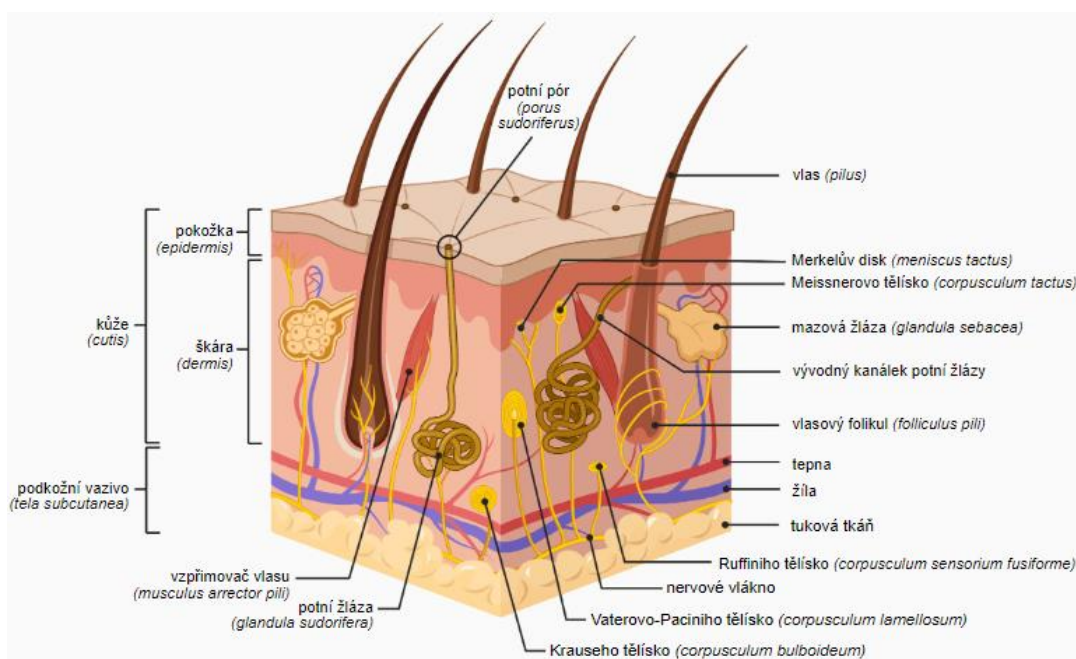
Pokožka (epidermis) tvoří nejsvrchnější ochrannou vrstvu kůže, tedy skutečnou hranici mezi tělem a vnějším prostředím. Je poměrně tenká, na některých místech velmi tenká (pouhých 30 mikrometrů), zatímco na jiných místech je naopak silnější, například na chodidlech nebo na dlaních. Tato nejsvrchnější vrstva kůže se neustále obnovuje, odumřelé buňky na vnější straně pokožky se průběžně odlupují, zatímco zespoda dorůstají nové [24]. Keratinocyty tvoří základní stavební kameny kůže. Jejich specifické spojení jim jednak umožňuje posun do vyšších vrstev, jednak ochranu před zevními faktory. Melanocyty pocházejí z neurální lišty a jsou uloženy ve stratum basale, nalezneme je však v horním

epitelu vlasového folikulu. Mají dendritické výběžky, které vysílají mezibuněčnými prostory až do stratum spinosum. Vznikají z nich melanosomy, které hromadí hnědý pigment melanin. Dalšími buňkami kůže jsou Langerhansovy buňky, které zprostředkovávají přihojení transplantátů a způsobují alergické reakce a Markelovy buňky (řídce rozmístěné smyslové buňky). Nedílnou součástí kůže jsou i žlázy mazové a potní [25].

Škára (dermis) je vazivovou částí kůže. Skládá se z vazivových buněk a elastických vláken, které se v podkoží kříží. Mezi proplétajícími se vlákny je také množství tukových buněk. Elastická vlákna škáry jsou orientována do určitých směrů, odpovídajících převládajícímu směru mechanického zatížení kůže v dané krajině. Elastická vlákna zajišťují pružnost, roztažitelnost, pevnost a štěpitelnost kůže [26].

Podkožní vazivo (subcutis) je tvořeno sítí kolagenních a elastických vláken, mezi kterými jsou roztroušeny vazivové buňky. Poměrně řídké podkožní vazivo umožňuje posun kůže. Podkožní vazivo je potenciální tukovou tkání schopnou ukládat v buňkách velké množství tukových kapének [26].

Mezi významné funkce kůže patří ochranná funkce (brání průniku cizorodých látek do organismu), dále smyslová (je sídlem smyslových receptorů reagujících na podněty z vnějšku), exkreční (vylučuje pomocí potních a mazových žláz pot a maz), resorpční funkce (podílí se na termoregulaci) a vlivem UV záření zde dochází k tvorbě vitamínu D [27]. Pronikání kůží má zásadní význam pro řadu současných problémů, například pro kontaminaci mikroorganismy a chemickými látkami, podávání léčiv do kůže (dermatologická léčba) a přes kůži (transdermální náplasti) a pro péči o kůži a její ochranu (kosmetika). Zejména kůže představuje alternativní cestu pro podávání léků, která umožňuje trvalé podávání léků do krevního oběhu a poskytuje pacientovi větší pohodlí, přičemž se vyhýbá některým vedlejším účinkům perorálního podávání, tedy podávání ústy a parenterálního podávání, které spočívá v podávání léčivého přípravku jinou cestou než skrze trávicí trakt, obvykle injekčně nebo prostřednictvím infuze [28].



Obrázek 3 Struktura kůže [24].

2.3 Transport látek přes kůži

Jedním ze způsobů, jak dosáhnout řízeného uvolňování, je molekulární transport přes kůži, běžně označovaný jako transdermální uvolňování léčiv (TDD) [29]. TDD podání zajišťuje, že nehrozí náhlé výkyvy nebo vrcholy koncentrace léčiva v plazmě, což se projevuje trvalými hladinami a snížením vedlejších účinků [30]. Jen málo léků je schopno proniknout kůží v terapeutické míře, a to díky pozoruhodným bariérovým vlastnostem nejsvrchnější, odumřelé vrstvy kůže, stratum corneum SC. Rohová vrstva se skládá z karneocytů, které jsou obvykle považovány za nepropustné, což nutí léčiva proniknout přes SC skrze mezibuněčné lipidy [31]. Rozlišujeme celkem pět různých způsobů transportu látek přes biologickou membránu, a to prostup iontovými kanály, sprážený transport, aktivní transport, endocytóza a exocytóza a prostá difuze [32].

Předpokládá se, že difuze se řídí podle Fickova zákona: Tok látky membránou, která je limitujícím faktorem pro rychlost přestupu, je přímo úměrný rozdílu koncentrací látky na různých stranách membrány [33]. Transport léčiv kůží lze popsat Fickovou difuzní rovnicí, kde klíčovým parametrem je difuzní koeficient, který udává počet molů dané složky, která projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém spádu koncentrace složky. Dalšími klíčovými parametry, které určují propustnost kůže, jsou rozdělovací koeficient P_i , který je způsoben rozdílem rozpustnosti mezi vrstvami, a koeficient přenosu hmoty K_i , který je způsoben povrchovými bariérami mezi vrstvami. Hodnota P_i udává poměr mezi koncentracemi na obou stranách hranice v rovnovážném stavu a K_i je koeficient rychlosti, který udává, jak rychle je dosaženo rovnováhy. Vysoká hodnota K_i znamená, že na hranici není žádná bariéra, zatímco malá hodnota naznačuje přítomnost bariéry [34].

Jonsdottir a kol. navrhli matematický model, který simuluje systém Franzových difuzních cel. Vytvořili jednorozměrný třívrstvý model, který se skládá z donorové komory (DC), kůže a receptorové komory (RC). Léčivo vložili do DC, jako je například náplast, poté prochází kůží a vstupuje do RC. V každé vrstvě i , kde $i = (1,2,3)$ pro třívrstvý model, se difuze ve směru x řídí Fickovou rovnicí [34]:

$$\frac{\partial C_i(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_i \frac{\partial C_i(x,t)}{\partial x} \right) \quad (1)$$

kde $C_i(x,t)$ je koncentrace rozpuštěného léčiva v i -té vrstvě (mg/cm^3) a D_i je difuzní koeficient rozpuštěného léčiva v i -té vrstvě (cm^2/h) [34].

V rámci každé vrstvy je počáteční podmínka následující [34]:

$$C_i(x,0) = C_{i,0} \quad (2)$$

Mezi vrstvami jsou definovány mezní podmínky, které popisují kombinované mechanismy rozdělení a rychlosti přenosu hmoty. Mezivrstevní podmínky pro $i = [1,2]$ jsou [34]:

$$J_i = -D_i \frac{\partial C_i(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=x_i-} = -D_{i+1} \frac{\partial C_{i+1}(x,t)}{\partial x} \Big|_{x=x_i+} = K_i(C_i(x_i,t) - P_i C_{i+1}(x_i,t)) \quad (3)$$

kde K_i je koeficient přenosu hmotnosti rozpuštěného léčiva mezi vrstvami i a $i+1$ (cm/h), P_i je rozdělovací koeficient rozpuštěného léčiva mezi vrstvami i a $i+1$ (-) a J_i je tok mezi vrstvami i a $i+1$ (mg/h.cm²) [34].

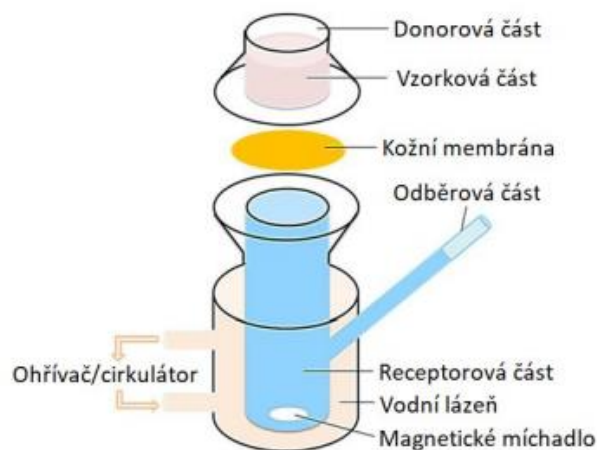
2.4 Metody stanovení aktivních látek

2.4.1 Franzova difuzní cela

Testy kožní absorpce se běžně používají k předvídání rizik spojených s expozicí kůže chemickým látkám, ale také k prokázání přínosů pro lokální aplikaci kosmetických přípravků, zdravotnických prostředků nebo léčebných účinných látek [35]. Zavedení Franzových cel pro vývoj transdermálního a lokálního podávání léčiv způsobilo v této oblasti výzkumu revoluci [36]. Používá se především ke studiu dermálních, transdermálních systémů, oftalmologických přípravků, přípravků pro péči o pokožku a permeace kůže [37]. Navzdory svému úctyhodnému stáří je Franzova difuzní cela (FDC) stále nejrozšířenějším pracovním postupem v procesu vývoje lokálních léčiv a prokázal svou užitečnost pro optimalizaci pasivní difúze léčiv (zejména v kombinaci s doplňkovými technikami, např. strippingem pásky, vibrační spektroskopii a zobrazováním nebo konfokálním Ramanovým měřením in vitro a in vivo) a pro výběr klinických kandidátů [38].

Franzova cela obsahuje donorový prostor, do kterého se aplikuje přípravek, a receptorový prostor, který obsahuje příslušné receptorové médium. Při použití FDC je důležité, aby v receptorové části cely nebyly obsaženy bublinky, které by ovlivnily daný cyklus měření, čímž se zhorší reprodukovatelnost a reprezentativnost testu [37]. Vzorek kůže je upevněn mezi oběma prostory, v přímém kontaktu s přípravkem a receptorovým médiem [39]. Skutečné biologické membrány, např. kůže, lze získat ze zvířat poražených pro potravu nebo z lidských chirurgických odpadů [36]. V předem stanovených intervalech se odebírají extrakty z receptorového média, analyzuje se obsah léčiva a vykresluje se graf kumulativního množství rozpuštěné látky $Q(t)$ v závislosti na časovém profilu [33,39]. Koncentrace lékové formy se následně nejčastěji stanovuje chromatografickou analýzou [36].

Vzhledem k technické složitosti, nákladům a časové a zdrojové náročnosti FDC není jejich použitelnost zřejmá pro široké spektrum aktivních látek API a typů přípravků, zejména v raných fázích vývoje produktu. FDC bohužel není vhodná metoda pro měření biodistribuce API do hlubších vrstev kůže (v dermis nebo pod ní), ale může spolehlivě informovat o pasivní difúzi API přes kožní bariéru SC [38]. Další výhodou FDC je, že ji lze použít jako samostatné zařízení, ale také ji lze částečně automatizovat a provozovat i 6 cel paralelně [37].



Obrázek 4 Franzova difuzní cela [40]

2.4.2 Strat-M[®] membrána

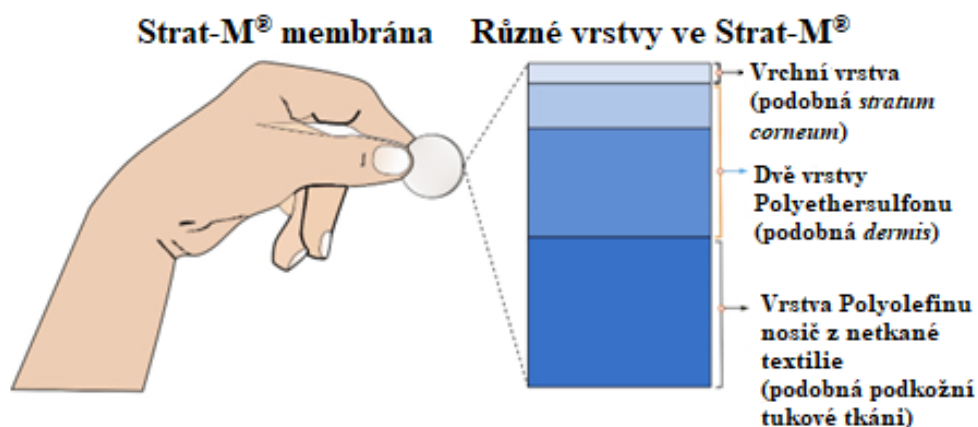
Od roku 2004 platí zákazy používání zvířat při testování hotových kosmetických přípravků. S novelou regulační politiky získaly významnou pozornost aplikace metod in vitro bez použití zvířecích tkání jako nástrojů pro hodnocení prostupu kosmetických složek kůží. Náhrady kožních membrán zahrnující použití umělých membrán (např. Strat-M[®], silikonová membrána) navržených tak, aby napodobovaly lidskou a zvířecí kůži, nabízejí kompetentní alternativu pro odhad pronikání léčiv skrz kůži nebo do kůže [41].

Stanovení prostupu léčiva formulacemi pomocí ex vivo metod lidské kůže má několik nedostatků, které brání reprodukovatelnosti dat screeningu kandidátů léčiva, včetně variací tloušťky kůže od dárců kůže, chorobných stavů kůže, podmínek skladování kůže, hustoty vlasových folikulů, věk dárce a vysoké laboratorní náklady. Lidské stratum corneum (SC) omezuje rychlost pro úspěšné dodávání API. Skládá se z 10–15 paralelních vrstev korneocytů uložených v mezibuněčné lipidové matici převážně z ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin v cihlovém a maltovém uspořádání (bricks and mortar). Tyto lipidy dodávají kůži hydrofobní charakter [42].

Umělé membrány se vyrábějí jako náhrada vzorků lidské nebo zvířecí kůže a lze je snadno zakoupit a skladovat před experimenty. Tyto membrány mají následující standardní vlastnosti—obsahují póry; jsou chemicky inertní; mají vysokou snášenlivost s rozpouštědly a jsou komerčně dostupné [43]. Dalšími výhodami spojenými s membránou Strat-M[®] jsou její jednoduchost manipulace, nízká cena a malá variabilita kvality mezi jednotlivými šaržemi na rozdíl od zvířecích modelů. Kosmetické formulace obvykle postrádají přísady (např. chemické látky zvyšující penetraci), které mění funkci kožní bariéry a podporují percutánní absorpci nízkomolekulárních složek. To řadí Strat-M[®] jako vhodnou náhradu za membrány biologického původu při hodnocení „jednoduchých“ topických přípravků, jako je kosmetika [41]. Strat-M[®] membrána je novinkou v oblasti syntetických membrán a skládá se z několika vrstev polyethersulfonu. Horní vrstva se skládá ze dvou podvrstev polyethersulfonu (PES, odolnější vůči difuzi), zatímco spodní vrstva obsahuje polyolefin, který je propustnější vrstvou [43].

Tloušťka každé membrány Strat-M® je přibližně 300 μm [42]. Napodobuje vícevrstvou strukturu a chemii lipidů přirozené kůže a vyhýbá se etickým problémům, které vznikají při provádění testů na zvířatech v předklinické fázi výzkumu [42,44]. Membránové vrstvy jsou stále více porézní a otevřené a také stále větší tloušťky, aby napodobovaly různé vrstvy lidské kůže (epidermis, dermis a podkožní tkáň). Tato syntetická membrána obsahuje kombinaci lipidů (ceramidy, cholesterol, volné mastné kyseliny a další složky) ve specifickém poměru podobném tomu, který se nachází v lidské SC [42]. Membránu Strat-M® lze použít k prostupu hydrofilních i lipofilních sloučenin. Membrána Strat-M® se doporučuje pro hodnocení průniku API kůží v předklinické fázi výzkumu [44]. Bioekvivalenční studie se typicky provádějí za použití kůže lidských mrtvých těl nebo zvířecích modelů. Bohužel tyto modely mají řadu nevýhod, kvůli kterým nejsou příliš vhodné pro vývoj, včetně: složité přípravy vzorků, přísných požadavků na skladování vzorků, problémů s biologickým nebezpečím a drahých nákladů na studie [42].

I když použití syntetických membrán není dostatečné pro odhad biofarmaceutických vlastností topické formulace, lze je s výhodou použít pro účely kvality, a to k hodnocení uvolňování léčiva, jak bylo nedávno stanoveno ve Směrnici EU o kvalitě polotuhých přípravků a vydáno v USP. V posledních 6 letech rostoucí počet studií doporučuje tuto umělou membránu při hodnocení topických nanoformulí [45].



Obrázek 5 Membrána Strat-M® a znázornění jednotlivých vrstev [43]

2.4.3 Prasečí kůže

Lidská kůže je jednoznačně nejvhodnějším membránovým modelem. Za zlatý standard pro hodnocení systému pro lokální podávání léčiv se považují *in vitro* studie permeace přes lidskou epidermis nebo dermatomed lidskou kůži, a to buď vyříznutou z chirurgické redukce, nebo z mrtvol [45]. Přestože je excize lidské kůže považována za nejvhodnější model pro experimenty s permeací a penetrací *in vitro*, některé nevýhody vedou k použití jiných modelů. Mezi hlavní nevýhody patří špatná pohodlnost, obtížné získávání a nízká úroveň standardizace v důsledku variability související s pohlavím, rasou, věkem a anatomickým místem dárce [46]. Z těchto důvodů výzkumníci zkoumali použití kůže ze zvířat a ve snaze předpovědět percutánní absorpci u člověka bylo vytvořeno velké množství experimentálních údajů [45]. Kůže prasete domácího je považována za nejvhodnější

zvířecí model vzhledem k četným anatomickým, histologickým a fyziologickým podobnostem s lidskou kůží [47].

Kůže prasečího ucha má podobné histologické vlastnosti jako lidská kůže. Vykazuje podobnou tloušťku SC a hustotu vlasových folikulů. Složení SC obou druhů se však liší, protože prasečí SC obsahuje lipidy uspořádané v hexagonální mřížce, zatímco lidská SC má mřížku orthorombickou [46]. Je známo, že lipidy SC jsou důležitými regulátory kožní permeability. V lidském i prasečím SC jsou hlavními třídami lipidů ceramidy, cholesterol a volné mastné kyseliny a tyto třídy lipidů jsou přítomny v přibližně stejném poměru. Složení volné mastné kyseliny a ceramidu se však u obou druhů liší. V řadě studií s použitím lipofilních i hydrofilních permeantů bylo zjištěno, že propustnost prasečí kůže je podobná propustnosti lidské kůže, ale ve větší míře se liší od kůže psů nebo hlodavců [48]. Prasečí rohová vrstva se výrazně liší z hlediska tloušťky. Vzhledem k tomu, že rohová vrstva kůže je u mladších prasat podstatně tenčí než u dospělých prasat, kůže novorozených prasat je považována jako alternativa, která více odpovídá lidským potřebám než kůže dospělých prasat [45].

Nejčastěji používanou metodou pro zkoumání penetrace a permeace kůží je lidská nebo prasečí kůže umístěná ve Franzových celách. Pro tato měření se často používá zmrazená kůže [49]. V případě použití zmrazené kůže je třeba stanovit přijatelnou dobu skladování pomocí vhodných metod, které umožňují zachování integrity a bariérových vlastností membrány. Podmínky skladování a způsob přípravy kůže mohou mít vliv na propustnost léčiva. Kůže prasat se obvykle používá po zmrazení (při -20 až -30 °C po dobu až 6 měsíců v těsně uzavřeném obalu), podobně jako lidská kůže. Obecně se uznává, že mezi zmrazenou/rozmrazenou a čerstvou prasečí kůží nejsou rozdíly, pokud jde o propustnost ve vodě rozpustných látek. Mezi nejběžnější metody přípravy kůže používané při studiích propustnosti léčiv patří kůže v plné tloušťce (FT), kůže v dělené tloušťce (D), tepelně oddělená epidermis (HSE) a trypsinem izolovaná SC [47]. Kontrola je obvykle založena na měření fyzikálních vlastností, jako je elektrický odpor nebo trans-epidermální ztráta vody (TEWL) [45].

2.4.4 Metoda tape stripping

Páskování je často používaná metoda při výzkumu penetrace kůže, při které se postupně odstraňuje rohová vrstva tím, že se povrch kůže oblepí lepicí fólií bez nutnosti řezů [50,51]. Tato neinvazivní technika odběru vzorků kůže umožnila provádět různé typy analýz kůže (tj. transkriptomické, proteomické a podobně), které poskytují informace o procesech v hlubších vrstvách [51].

Studie v minulosti využívaly odstraňování pásky ke stanovení množství a odpovídajících koncentračních profilů dermálně aplikovaných látek v SC nebo ke zkoumání, jak se snižuje bariérová funkce SC s menším počtem buněčných vrstev. Ve srovnání s kožními biopsiemi představuje metoda méně invazivní, ale přesto použitelnou v rámci studií in vivo. Koncentrační profily látek v SC závisí v rozhodující míře na rychlosti odstraňování vrstev SC, tj. na tom, jak velká část SC je odebrána každým stržením pásky [50].

K určení míry odstranění byly dříve použity různé metody, včetně mikroskopie, měření transepidermální ztráty vody (TEWL), vážení, UV–VIS spektrometrické charakterizace odstraněného páskového proužku, infračervené denzitometrie a měření obsahu bílkovin na odstraněném páskovém proužku [50].

Neinvazivní stripping se používá k odběru kožních buněk z rohové vrstvy pro různé experimentální účely, např. pro detekci zánětlivých cytokinů. Novější výzkum se zaměřil na purifikaci RNA pro detekci specifických biomarkerů zánětlivých kožních onemocnění ze vzorků stripů [52]. Jedná se také o metodu, která zvyšuje tok aktivních látek narušením kožní bariéry [53].

3 SOUČASNÝ STAV

Nolde a kol. [54] se snažili nastavit komplexní experimentální design pro zkoumání různých typů SAS a za použití různých analytických technik a postupů zpracování vzorků k detekci syntetického amorfního oxidu křemičitého (SAS) v receptorových tekutinách z testování penetrace kůží. Všechny typy SAS, tj. pyrogenní, srážený a silikagel, stejně jako povrchově modifikované SAS se používají v různých kosmetických aplikacích včetně péče o ústa a péče o pokožku. Autoři prováděli dva nezávislé testy penetrace kůží s použitím stejných čtyř testovaných materiálů, ale v různých koncentracích, složeních a kožních systémech (prasečí kůže vs. lidská kůže). V prvním testovacím systému Dermal Technology Laboratory Ltd (Keele, Spojené království) provedla test penetrace kůží, kdy použili membrány z kůže hřbetu/boku prasat. Tyto membrány umístili na statickou skleněnou difuzní Franzovu celu. Jako receptorovou tekutinu použili roztok fosfátového pufru (PBS). Perkutánní penetrace SAS testovali pomocí membrán s 2 mg/cm^2 SAS obsahujících emulze oleje ve vodě aplikovaných na vrchní stranu kůže. Jako referenční vzorky použili cely se vzorky kůže s aplikovanými emulgemi oleje ve vodě bez SAS a vzorky kůže zcela bez emulzí oleje ve vodě. Všechny cely umístili do vodní lázně udržované při teplotě $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 h. SAS detekovali pomocí asymetrické průtokové frakcionace (AF4), víceúhlové laserové spektrometrie rozptylu světla (MALLS), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a transmisní elektronové mikroskopie s energeticky disperzní rentgenovou mikroanalýzou (TEM/EDX). V druhém testovacím systému provedli zkoušku penetrace kůží opět v externí laboratoři. Použili 4 typy SAS v kosmetickém přípravku a tyto přípravky testovali na lidské kůži, která přišla do kontaktu s receptorovou tekutinou opět na bázi PBS. Vzorky lidské kůže získali z tkáňové banky. Testování penetrace kůží provedli v kinetickém uspořádání s dobou kontaktu s kůží 0 (počáteční stav), 1, 2, 4, 8, 12 a 24 h. SAS následně detekovali opět metodami AF4 s detekcí MALLS a ICP-MS [54].

Goh a kol. [55] zkoumali možnosti použití polymerní směsi sestávající z hydrofobického materiálu polyvinylpyrolidonu K-90 (PVP K-90) a acetátu celulózy (CA) pro výrobu elektrospunových vláken, která by dodávala kofein na pokožku jako masku pod očima. Kofein (1,3,7-trimethylxantin) je xantinový alkaloid, který působí proti celulitidě, proti stárnutí a antioxidantně a stimuluje růst vlasů. Kofein však nemusí být vnímán jako ideální kandidát pro permeaci kůží kvůli svým hydrofilním vlastnostem, neobvyklému chování při rozpouštění v nevodných rozpouštědlech a potenciálu tvořit agregáty ve vodných roztocích. Byly proto vyvinuty různé strategie ke zlepšení permeace kofeinu kůží. V současné době se technologie elektrospinningu stala klíčovou technikou v biomedicinském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu pro různé aplikace včetně hojení ran, genové terapie, imunoterapie, kosmetických nebo zkrášlujících pleťových masek a regenerace tkání. Vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti elektrospunových vláken, jako je malý průměr (mikronová až nano velikost), velký povrch a vysoký poměr stran, patří k velkým výhodám využití této technologie pro kosmetické doručovací systémy. Studie uvolňování léčiva prováděli ve třech opakování pomocí Franzových difuzních cel při teplotě $32 \text{ }^\circ\text{C}$. Mezi donorovou a receptorovou komoru Francovy difuzní cely umístili celulóзовou acetátovou membránu a poté naplnili receptorovou komoru PBS puforem [55].

Před zahájením experimentu nastříhali elektrospunové vláknové rohože a umístili je do donorové komory. V předem stanoveném čase (5, 10, 20, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 h) odebírali vzorky z receptorové komory. Odebraný vzorek pro stanovení kofeinu následně analyzovali pomocí HPLC analýzy. Studovali také kožní permeaci in vitro opět pomocí Franzových difuzních cel. Místo syntetické membrány použili prasečí ušní kůži v plné tloušťce, kterou umístili mezi donorovou a receptorovou komoru. Do donorové komory přidali 3–4 mg každého vzorku a PBS. Následně donorovou komoru zakryly fólií Parafilm®, aby zabránili odpařování vody. Odběr vzorků provedli ve stejných časových intervalech, jak je popsáno výše a vzorky analyzovali také pomocí HPLC [55].

Salas a kol. [56] studovali vliv podmínek masáže (typ a délka trvání) na penetraci retinolu do pokožky. Retinol je zpevňující účinná látka proti stárnutí, která je vysoce lipofilní. Retinol indukuje proliferaci keratinocytů tím, že interaguje s receptory přítomnými v těchto buňkách, čímž zvyšuje bariérovou funkci kůže a omezuje transepidermální ztráty vody. Kromě toho retinol inhibuje produkci metaloproteinázy, která je zodpovědná za degradaci extracelulární matrix, a stimuluje produkci kolagenu I, který zajišťuje udržování pokožky v dermis. Tato molekula je také velmi účinná proti fotostárnutí, protože reguluje transkripci genů zodpovědných za diferenciaci buněk a reakce na stres, zejména ten vyvolaný fototerapií. Absorpce retinolu kůží pasivní difuzí byla podrobně studována. Tato účinná látka vykazuje velkou afinitu ke stratum corneum. V závislosti na složení vehikula může být jeho transdermální permeace zvýšena a může proniknout do dermis, svého cílového místa. Jako vehikulum retinolu použili emulzi oleje ve vodě. Stanovení penetrace retinolu do jednotlivých vrstev kůže provedli prostřednictvím Franzovy difuzní cely, kdy receptorovou komoru naplnili PBS (obsahujícího 2 % hmot. polysorbátu 20, aby zajistili dosažení podmínek propadu). Přípravky nanášeli na povrch vzorku prasečí kůže. Na konci studie rozdělili vzorky kůže na stratum corneum (SC), životaschopnou epidermis (E) a dermis (D). SC poté odstraňovali metodou tape-stripping. Retinol extrahovali ponořením proužků na 1 hodinu za míchání do směsi rozpouštědel z methanolu a ethylacetátu (50/50 hm. %) s tokoferolem a butylhydroxytoluenem (BHT). Retinol následně detekovali metodou UHPLC (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie) [56].

Camacho a kol. [57] ve své práci představovali přístup k hodnocení alternativních modelů kožní bariéry pro studie dermální absorpce. Optimalizovali parametry in vitro permeačního testu IVPT, aby byla zajištěna široká přizpůsobivost stávajících a budoucích alternativních modelů kožní bariéry. Poté tyto metody implementovali k posouzení potenciálu reprezentativních alternativních modelů kožní bariéry rozlišit výsledky dermální absorpce v závislosti na použité chemické látce a vehikulu. Na testování průniku in vitro použili Franzovu difuzní celu, jako membránu pro testování zvolili jak vyříznutou zmrazenou zvířecí kůži, tak syntetickou Strat-M membránu [57].

Bayoumi a kol. [58] měli za cíl vytvořit lokální gel Ektoinu s použitím hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC K15M), který by měl zlepšit průnik Ektoinu do kůže a byl by vhodný pro použití při mnoha kožních onemocněních. HPMC K15M vybrali díky svým dobrým bobtnacím vlastnostem, schopnosti pojmout vysoké množství léčiva a netoxické povaze. Uvolňování ektoinového gelu studovali pomocí Franzovy difuzní cely. Ke studii použili kůži samců potkanů, a to konkrétně z břicha potkanů [58].

Jako receptorové médium použili PBS a receptorový prostor udržovali při teplotě $37 \pm 0,5$ °C. 1 g gelového přípravku nanášeli na vzorek kůže upevněného v donorovém prostoru. Studie uvolňování prováděli po dobu 24 hodin a vzorky odebírali v pravidelných intervalech z receptorové komory. Vzorky následně analyzovali vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází (RP-HPLC) [58].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část je zaměřena na simulaci penetrace aktivních látek prostřednictvím Franzových difuzních cel. V této části je popsána příprava vzorků bisabololu a ektoinu, které byly poskytnuty kosmetickou firmou Nobilis Tilia. Také je zde popsána příprava membrán z kůže prasečího ucha a sestavení Franzových difuzních cel. Poslední kapitolou této části jsou metody měření aktivních látek, které byly použity pro stanovení koncentrace aktivních látek ve vzorcích. Pro stanovení koncentrace aktivních látek byla použita UV-VIS spektrometrie a část vzorků byla měřena pomocí kapalinové chromatografie. Z důvodu nefunkčnosti přístroje nebyly měřeny všechny vzorky.

4.1 Použité chemikálie

- Methylalkohol pro UV, p.a. (Penta, CAS: 67-56-1)
- Monopropylenglykol F (Fichema s.r.o., CAS: 57-55-6)
- Vegelight silk (Biosynthis, č. šarže: AA22040025)
- Dimethylsulfoxid, čistý (Penta, CAS: 67-68-5)
- n-Hexan, pro spektroskopii (Uvasol[®], CAS: 110-54-3)
- Chlorid sodný P.A. (Lach-Ner, CAS: 7647-14-5)
- Bisabolol (Nobilis Tilia, č. šarže: 22B1001)
- Ektoin (Nobilis Tilia, č. šarže: 72902203)
- Deionizovaná voda

4.2 Použité přístroje a pomůcky

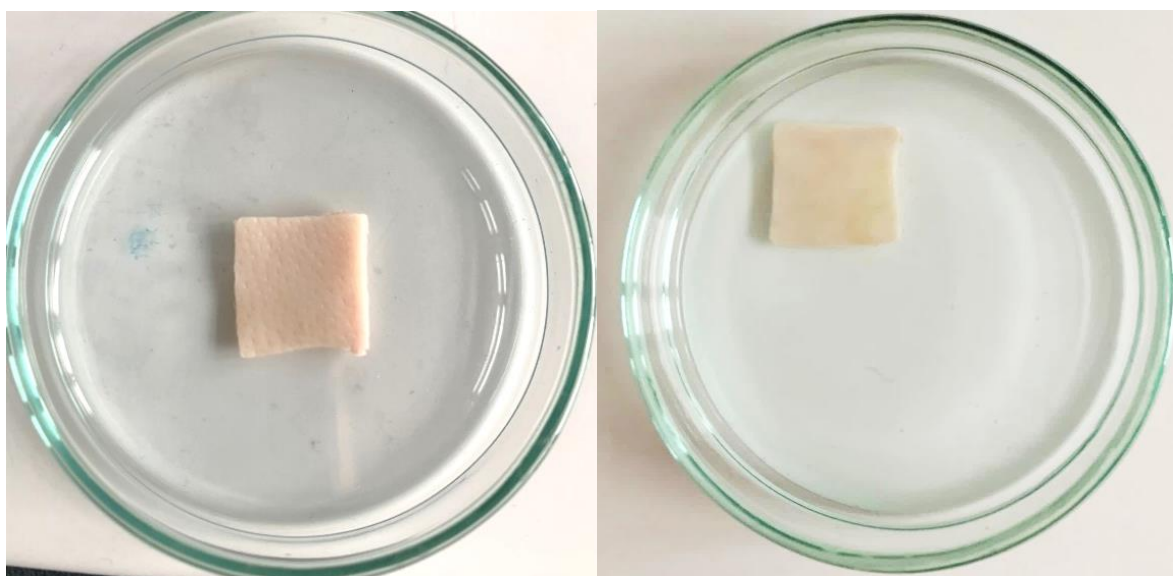
- Franzova difuzní cela, SES GmbH-Analysesysteme
- Analytické váhy, DENVER 224A
- UV-VIS spektrometr, HITACHI U-3900H
- Kapalinový chromatograf, Agilent 1290 Infinity
- Hmotnostní spektrometr, BRUKER EVOQ LC-TQ
- Magnetické míchadlo, Thermo-Scientific
- Adhezní pásy, Corneofix[®] CF 20
- Strat-M[®] membrány, Sigma Aldrich
- Parafilm
- Kovové svorky
- Injekční stříkačky
- Jehly

4.3 Příprava vzorků aktivních látek

4.3.1 Bisabolol

Bisabolol je olejovitá látka a je rozpustná například v ethanolu, jak je popsáno v teoretické části. Alkoholy, jako ethanol a methanol, nejsou příliš vhodné pro simulaci penetrace aktivních látek, a to z důvodu toho, že vysušují vzorek prasečí kůže, která je v této práci použita jako membrána ve Franzových difuzních celách.

Značně se tímto změní struktura kůže, kdy je kůže po chvíli tvrdá a změní se také barva kůže, jak je znázorněno na následujícím obrázku. Kousek vyříznuté kůže byl ponořen do methanolu a po hodině byla pozorována změna struktury a barvy kůže.



Obrázek 6 Znázornění změny struktury a barvy kůže na začátku ponoření (vlevo) a po hodině ponoření (vpravo) prasečí kůže do methanolu

Z tohoto důvodu bylo zkoumáno rozpouštění bisabololu v jiných rozpouštědlech pro následnou simulaci penetrace aktivní látky. Rozpustnost bisabololu byla zkoumána v následujících rozpouštědlech: 20% methanol, 0,5 % a 1 % dimethylsulfoxid (DMSO), hexan, vegelight a monopropylenglykol. Vegelight je čiré, bezbarvé změkčovadlo s těkavými vlastnostmi podobnými isododekanu odvozenému z ropy a cyklomethiconu, což je syntetická těkavá kapalina patřící mezi silikony. Vegelight se používá v kosmetických přípravcích pro péči o pleť, vlasové péče a jiných přípravcích.

Všechna rozpouštědla byla měřena pomocí UV-VIS spektrofotometrie proti vodě, následně byl připraven zásobní roztok 100 mg/l bisabololu v těchto rozpouštědlech a poté byla připravena koncentrační řada 1; 5; 10 a 15 mg/l bisabololu v těchto rozpouštědlech.

Následující tabulka znázorňuje přehled všech použitých rozpouštědel. V tabulce je popsáno, zda se bisabolol v těchto rozpouštědlech rozpouštěl a jestli tato rozpouštědla byla měřitelná pro následnou analýzu pomocí UV-VIS spektrometru.

Tabulka 1 Přehled všech použitých rozpouštědel pro přípravu vzorku bisabololu

Rozpouštědla	Rozpouštění Bisabololu	UV-VIS Spektrometrie
20 % Methanol	-	+
0,5 % DMSO	+	-
1 % DMSO	+	-
Hexan	+	-
Vegelight	+	+
Monopropylenglykol	+	+

Z tabulky je patrné, že vegelight a propylenglykol jsou nejvhodnějšími zvolenými rozpouštědly pro bisabolol. Tato rozpouštědla byla následně použita pro analýzu bisabololu. Analýza probíhala pomocí Franzových difuzních cel, kdy receptorová část byla naplněna zvoleným rozpouštědlem pro bisabolol.

Jako membrána byla zvolena syntetická Strat-M[®] membrána a do donorní části cely byl dávkován vzorek 15 mg/l bisabololu jak ve vegelightu, tak v monopropylenglykolu. Po sestavení cel bylo v obou případech patrné protékání vzorku, v případě vegelightu bylo pozorováno také rozpouštění parafilmu, který byl použit pro utěsnění donorní a receptorové části cely. Pro utěsnění byly zvoleny svorky, ale k protékání vzorku i tak docházelo v obou případech. Z těchto důvodů byla obě rozpouštědla vyhodnocena jako nevhodná pro simulaci penetrace bisabololu prostřednictvím Franzových difuzních cel.

Pro rozpouštění bisabololu byl nakonec zvolen methanol, ale jen pro měření přes Strat-M[®] membrány. Byl připraven zásobní roztok 100 mg/l bisabololu v methanolu. Následně byla připravena koncentrační řada 1; 5; 10 a 15 mg/l bisabololu v methanolu. Koncentrační řada byla měřena na UV-VIS spektrometru a byla sestavena kalibrační křivka pro stanovení množství bisabololu ve vzorcích.

4.3.2 Ektion

Pro přípravu vzorků bylo jako rozpouštědlo zvolena deionizovaná voda. Byl připraven zásobní roztok 100 mg/l ektoinu v deionizované vodě a následně byla připravena stejná koncentrační řada, jako v případě bisabololu. Tato koncentrační řada byla měřena opět na UV-VIS spektrofotometru a byla sestavena kalibrační křivka ektoinu.

4.3.3 Bisabolol s izoláty

Pro stanovení ovlivnění penetrace aktivní látky bisabololu byly zvoleny dva izoláty, a to linalool a geraniol. Izoláty byly poskytnuty kosmetickou firmou, stejně jako aktivní látky. Byl připraven zásobní roztok bisabololu 10 mg/l s přídavkem jednoho z izolátů v 0,5 % obj. Následně byly sestaveny Franzovy difuzní cely s příslušným vzorkem izolátu s bisabololem, jak je popsáno níže.

4.4 Příprava prasečí kůže

Membrány z prasečí kůže byly připraveny z prasečího ucha dospělého prasete. Prasečí ucho bylo pořízeno z řeznictví. Byla použita kůže jak z vnější strany ucha, tak z vnitřní strany ucha. Před separováním kůže bylo ucho umyto, následně vysušeno a zbaveno chloupků. Separace probíhala pomocí skalpele, kdy kůže byla z ucha vyříznuta postupně v co nejmenší tloušťce. Na následujícím obrázku je znázorněna odseparovaná kůže z ucha prasete.



Obrázek 7 Znárodnění separace kůže z prasečího ucha

Stejným postupem byla odseparována kůže z druhé strany ucha. Membrány pro následné měření aktivních látek prostřednictvím Franzových difuzních cel byly vystříhány dle velikosti a tvaru Strat-M® membrány. Při přípravě prasečích membrán je důležité, aby neobsahovala defekty či žíly, které by ovlivňovaly prostup aktivních látek. Následující obrázek znázorňuje připravené membrány pro analýzu.



Obrázek 8 Prasečí membrány pro simulaci penetrace aktivních látek

Připravené membrány z prasečích uší byly skladovány v mrazáku. Doba skladování nepřesáhla 14 dní. Před samotnou analýzou byly membrány rozmrazeny a ponořeny do příslušného receptorového média.

4.5 Simulace penetrace aktivních látek

Pro simulaci penetrace aktivních látek byla použita Franzova difuzní cela. Receptorová část cely byla naplněna příslušným receptorovým médiem. V případě stanovení bisabololu byla receptorová část naplněna methanolem a pro stanovení ektoinu pak deionizovanou vodou nebo fyziologickým roztokem, díky kterému se stanovení přizpůsobí fyziologickým podmínkám lidského těla.

Fyziologický roztok nebylo možné použít pro stanovení bisabololu, a to z důvodu jeho nerozpustnosti v tomto receptorovém médiu. Po naplnění receptorovým médiem bylo do receptorové části umístěno míchadlo, aby se zajistilo rovnoměrné míchání pro stanovení aktivních látek. Zábrusy donorní a receptorové části byly namazány lukosanem. Následně byla na receptorovu část umístěna membrána, a to buď syntetická Strat-M[®] membrána, nebo membrána připravená z prasečí kůže. Bylo důležité, aby se lukosan nedostal na membránu, kvůli ovlivnění propouštění aktivních látek během simulace. Donorní část byla poté umístěna na receptorovou část, tyto části cely byly utěsněny parafilmem a také svorkami. Po upevnění částí byla receptorová část doplněna příslušným receptorovým médiem pomocí stříkačky s jehlou tak, aby v receptorové části nebyly vzduchové bubliny. Receptorovým médiem byla cela doplněna až po okraj vzorkovací části cely, aby se zajistil co největší tlak na membránu. Vzorkovací část byla následně zakryta parafilmem. Donorní část byla naplněna vzorkem bisabololu nebo ektoinu o příslušné koncentraci. Poté byla donorní část opět zakryta parafilmem, aby nedocházelo k odpařování rozpouštědla při měření. Franzova difuzní cela byla umístěna na míchačku.

Následující obrázek znázorňuje sestavenou Franzovu difuzní celu pro simulaci penetrace aktivních látek.



Obrázek 9 Znárodnění Franzovy difuzní cely

Vzorky byly odebírány ze vzorkovací části pomocí stříkačky s jehlou ze spodní části cely, kde je umístěno míchadlo, a to ve stanovených časových intervalech. Intervaly byly zvoleny po 2; 4; 6 a 24 hodinách. Pro každý zvolený interval byly sestaveny Franzovy cely zvlášť, aby nedocházelo k postupnému ředění vzorku v receptorové části. Vzorky byly následně analyzovány pomocí UV-VIS spektrometrie a kapalinové chromatografie.

4.6 Provedení tape-strippingu

Metoda tape-stripping byla provedena pomocí adhezní pásky Corneofix[®] CF 20. Jedná se o speciální lepicí pásku, která zachytává korneocyty (šupinky odumřelých buněk). Po provedení experimentu na Franzových celách byla membrána z prasečí kůže vyjmuta a následně položena na dřevěnou desku a vysušena za laboratorní teploty.

Bylo provedeno 13 stripů z kůže, která byla použita na analýzu ektoinu o koncentraci 10 mg/l. Páska byla přiložena na část membrány a poté extrahovaná v deionizované vodě po dobu 2 hodin. Další páska byla přiložena na stejné místo membrány, jako předchozí páska a byl na ní vyvíjen stejný tlak, jako na předchozí pásku. Tímto postupem byly provedeny všechny stripy a následně extrahovány v deionizované vodě. Následně byly extrakty z pásky analyzovány pomocí UV-VIS spektrometru.

4.7 Metody měření

4.7.1 Měření vzorků pomocí kapalinové chromatografie

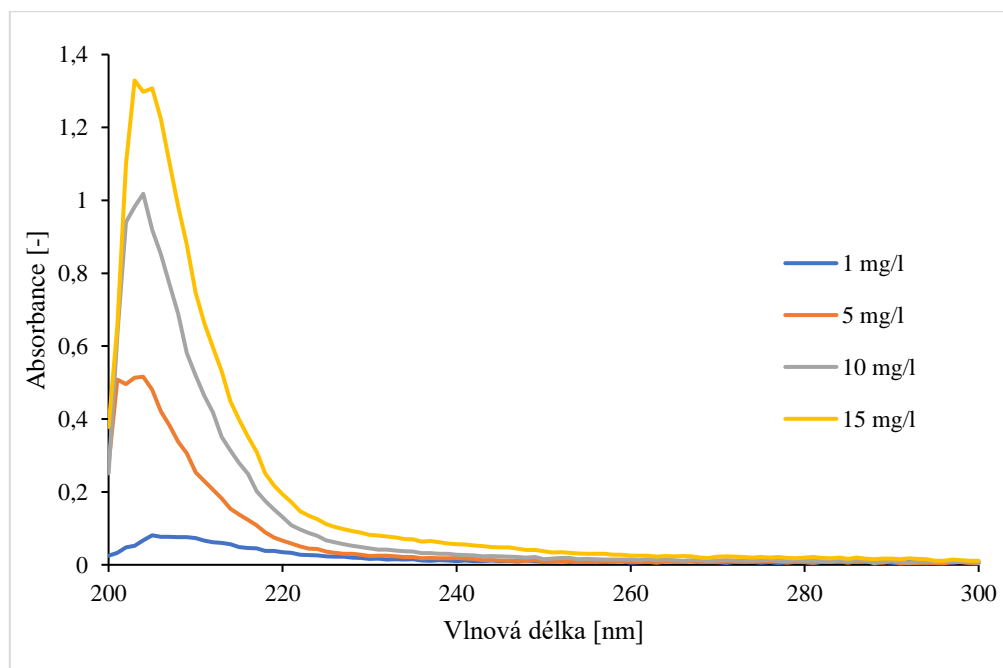
Část vzorků odebraných ve zmiňovaných časových intervalech byla analyzována pomocí kapalinové chromatografie. Množství aktivních látek bylo měřeno pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie v tandemu s elektrosprejovou ionizací (ESI) a hmotnostní spektrometrií (MS). Separace byla provedena na koloně Luna Omega 1,6 μ m Polar C18 100x2,1 mm, kdy teplota kolony byla optimalizována na 40 °C a průtok mobilní fáze byl optimalizován na 0,5 ml/min. Jako mobilní fáze byla zvolena 0,1 % kyselina mravenčí v deionizované vodě a acetonitril. Nástřik vzorku byl nastaven na 2 μ l.

5 DISKUZE A VÝSLEDKY

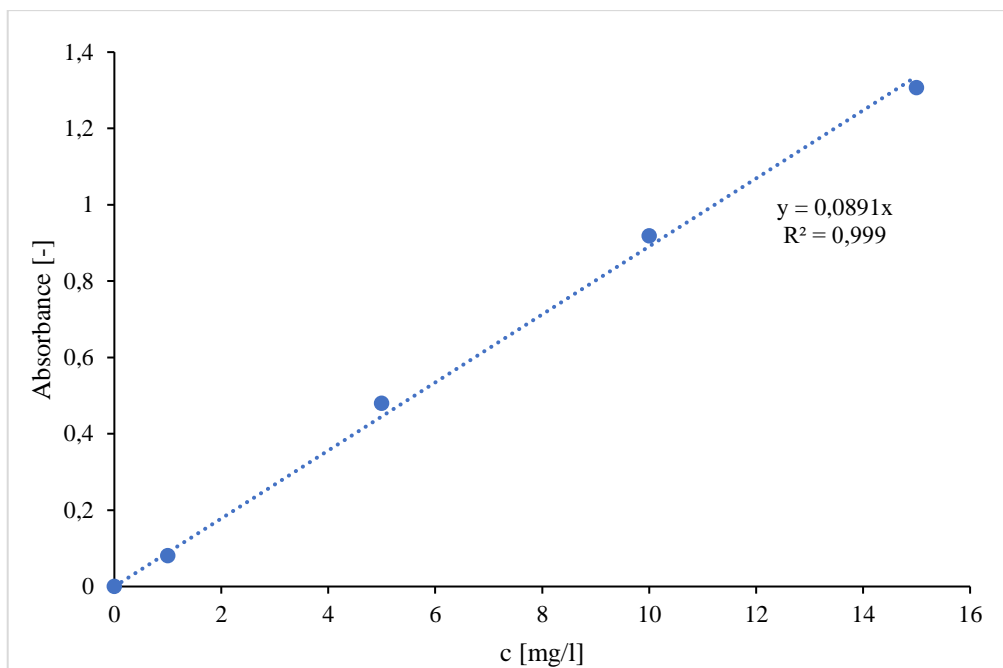
5.1 Simulace penetrace bisabololu

Byly provedeny celkem 4 experimenty simulace penetrace bisabololu prostřednictvím Franzových difuzních cel. Postup sestavení cel je popsán v experimentální části. Jako receptorové médium bylo ve všech experimentech zvolen methanol, a to kvůli rozpustnosti bisabololu v tomto rozpouštědle. Jako membrána byla zvolena pouze syntetická Strat-M[®] membrána, a to z důvodu toho, že methanol není vhodný pro simulaci penetrace bisabololu přes prasečí kůži, kterou vysušuje a tím mění její strukturu.

Pro stanovení koncentrace bisabololu ve vzorku byla nejprve měřena koncentrační řada bisabololu rozpuštěného v methanolu o koncentracích 1; 5; 10 a 15 mg/l. Následně byla sestrojena kalibrační křivka závislosti koncentrace bisabololu v methanolu v mg/l na absorbanci naměřené pro zmiňované koncentrace při stejné vlnové délce (204 nm). Následující grafy znázorňují naměřenou kalibrační řadu bisabololu v methanolu (Obrázek 10) a z ní sestrojenou kalibrační křivku (Obrázek 11).



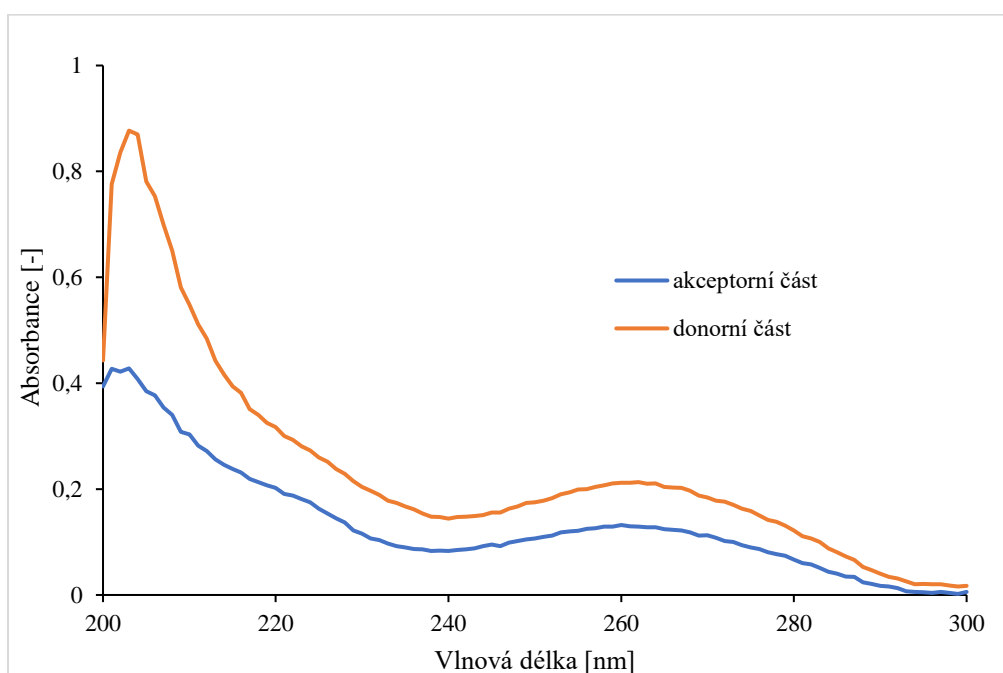
Obrázek 10 UV-VIS spektrum kalibrační řady bisabololu



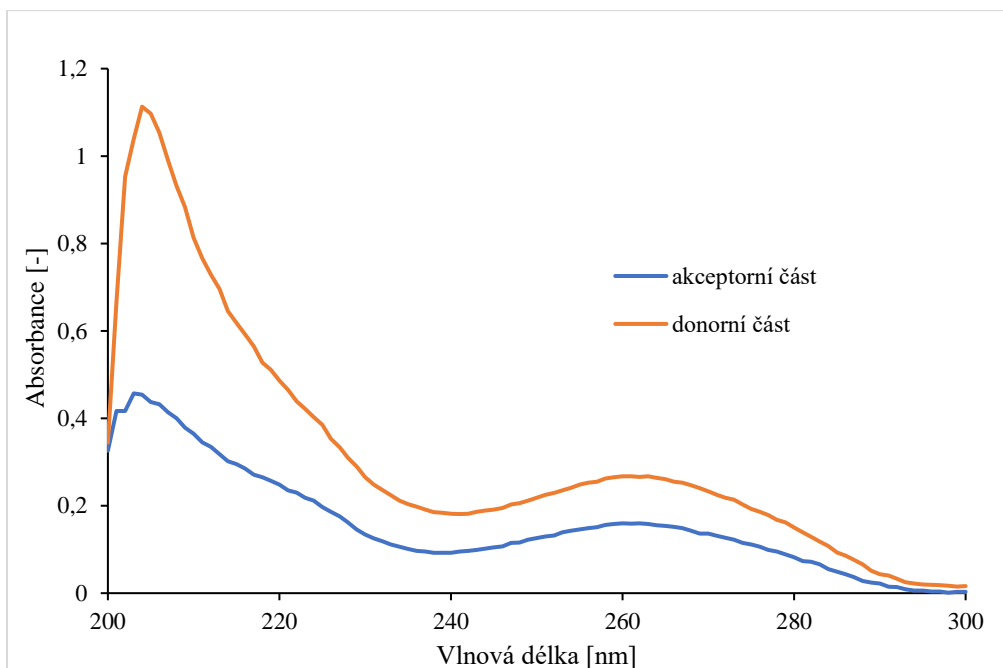
Obrázek 11 Kalibrační křivka bisabololu

Z rovnice je následně vypočítáno množství bisabololu obsaženého ve vzorcích odebraných z receptorové i donorní části cely.

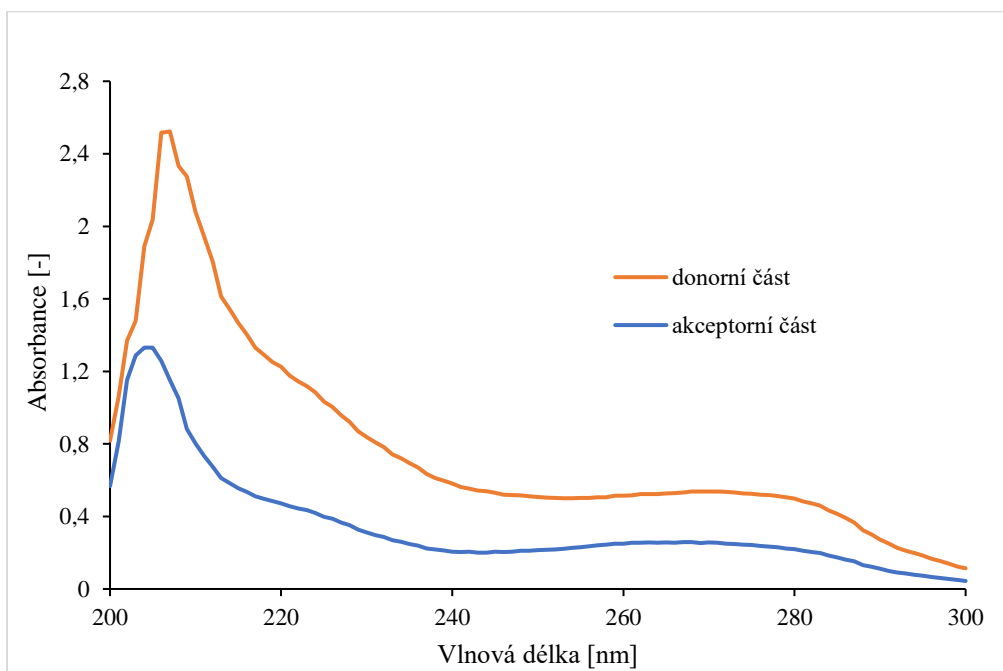
Pro experiment č. 1 byl použit vzorek bisabololu v methanolu o koncentraci 15 mg/l. Po stanovených časových intervalech byly odebírány vzorky z akceptorní a donorní části cely a následně měřeny na UV-VIS spektrometru a také pomocí kapalinové chromatografie. Následující grafy znázorňují naměřená UV-VIS spektra všech odebraných vzorků (Obrázek 12–15).



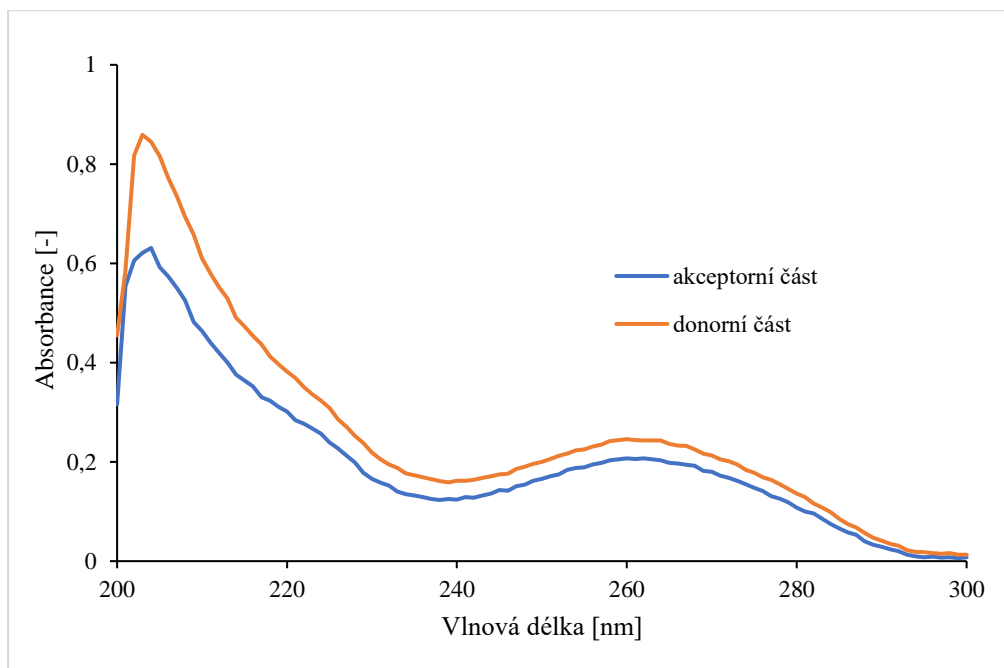
Obrázek 12 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 13 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 14 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 15 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely

Bisabolol vykazoval maximum při cca 204 nm, kde se viditelný pík také nacházel v naměřené koncentrační řadě bisabololu. Z následujících grafů je patrné, že bisabolol prochází přes syntetickou Strat-M[®] membránu. Ve spektrech se nachází také viditelný pík při cca 260 nm, který se nepodařilo charakterizovat a ovlivňuje tak naměřená spektra vzorků. Při sestavení cely pro časový interval 6 hodin docházelo k protékání malého množství vzorku z donorní části cely, což může ovlivnit naměřené množství bisabololu ve vzorku. Protékání vzorku bylo způsobeno nedostatečným utěsněním donorní a receptorové části cely, kdy byly použity jak svorky, tak i parafilm. Vzorky odebrané z akceptorní a donorní části cely po 2; 4 a 24 hodinách byly měřeny také pomocí kapalinové chromatografie, což znázorňuje následující tabulka (Tabulka 2), která udává naměřené množství ve vzorcích pomocí kapalinové chromatografie.

Tabulka 2 Naměřené množství bisabololu přes syntetickou Strat-M[®] membránu metodou HPLC

	mn_{akc} [mg/l]	mn_{don} [mg/l]
po 2 h	4,8036	6,2872
po 4 h	1,6002	8,3901
po 24 h	2,5211	3,0687

Nejmenší množství bisabololu bylo naměřeno ve vzorku odebraném z akceptorní části cely po 2 hodinách a největší množství pak ve vzorku odebraném z akceptorní části cely po 24 hodinách. Se vzrůstajícím časovým intervalem simulace penetrace bisabololu roste množství prošlé aktivní látky přes syntetickou Strat-M[®] membránu.

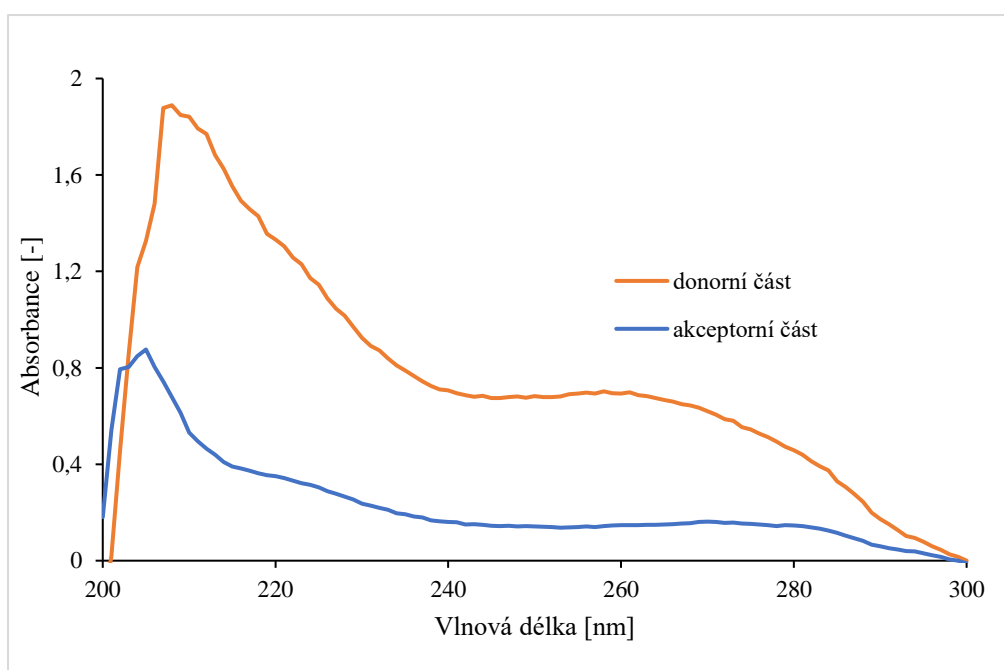
Jak již bylo zmíněno, ve spektrech se nachází pík při cca 260 nm. Maximum absorbance tohoto píku byl odečten ze spekter naměřených vzorků a následně bylo vypočteno množství bisabololu v těchto vzorcích pomocí rovnice kalibrační křivky. Následující tabulka (Tabulka 3) uvádí množství bisabololu obsaženém ve vzorcích odebraných z akceptorní a donorní části cely metodou UV-VIS spektrofotometrie.

Tabulka 3 Vypočítané množství bisabololu přes syntetickou Strat-M® membránu metodou UV-VIS spektrometrie

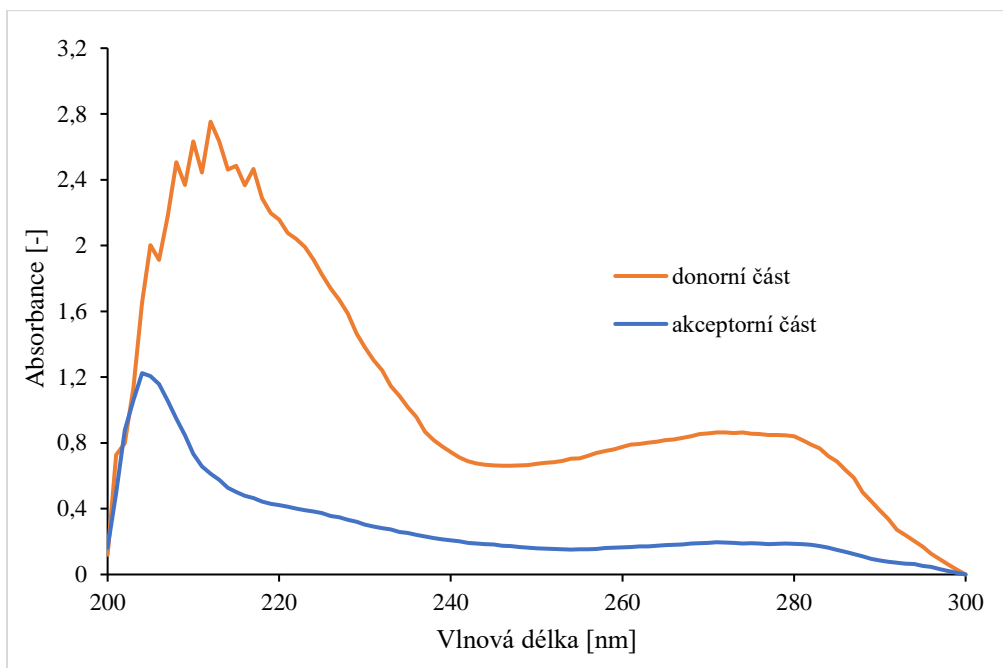
	$m_{n_{akc}}$ [mg/l]	$m_{n_{don}}$ [mg/l]
po 2 h	3,3221	7,4523
po 4 h	3,3333	9,4949
po 24 h	4,7587	6,8799

I v tomto případě bylo prokázáno, že nejmenší množství bisabololu bylo naměřeno ve vzorku odebraném z akceptorní části cely po 2 hodinách a největší množství pak ve vzorku odebraném z akceptorní části cely po 24 hodinách. Srovnáním těchto dvou měření je tedy patrné, že určité množství bisabololu prochází přes syntetickou Strat-M® membránu.

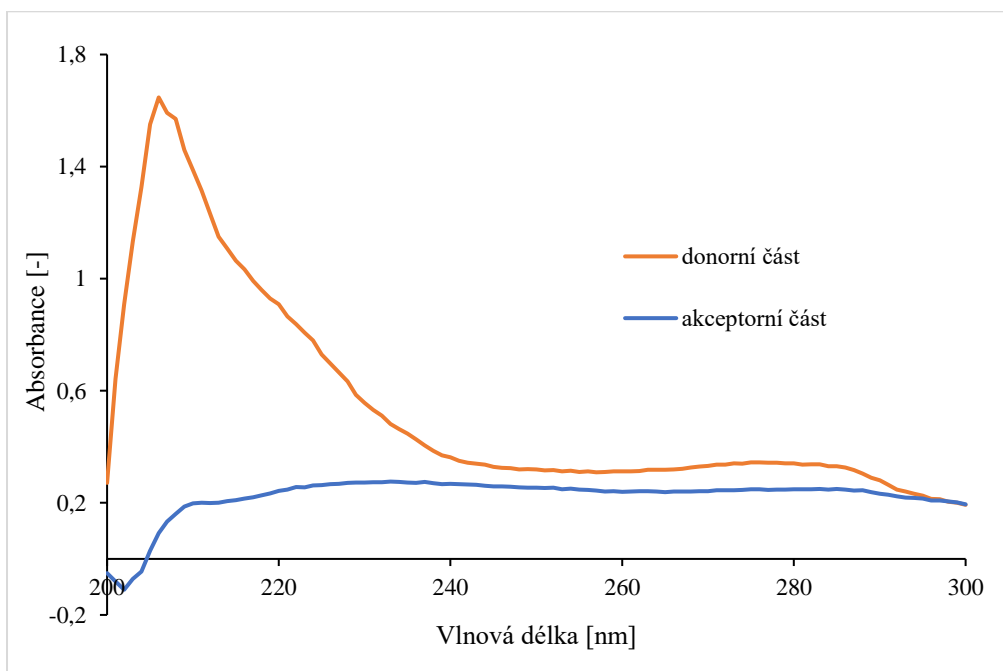
Pro experiment č. 2 byl jako vzorek použit bisabolol v methanolu o koncentraci 10 mg/l. Následující grafy znázorňují naměřená spektra vzorků odebraných z akceptorní a donorní části cely v již zmiňovaných časových intervalech (Obrázek 16–19).



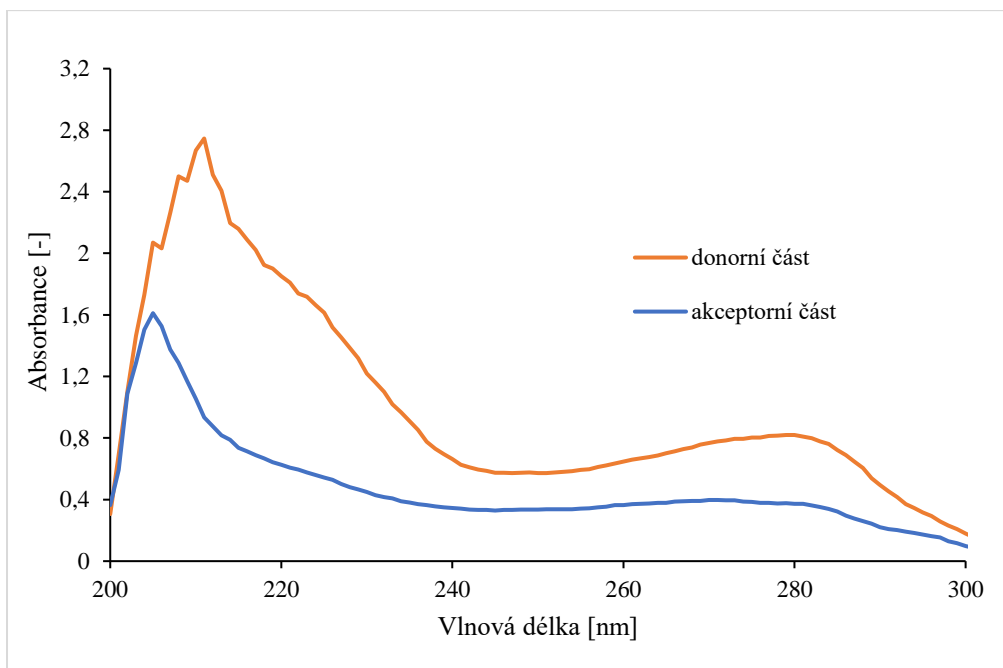
Obrázek 16 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 17 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely



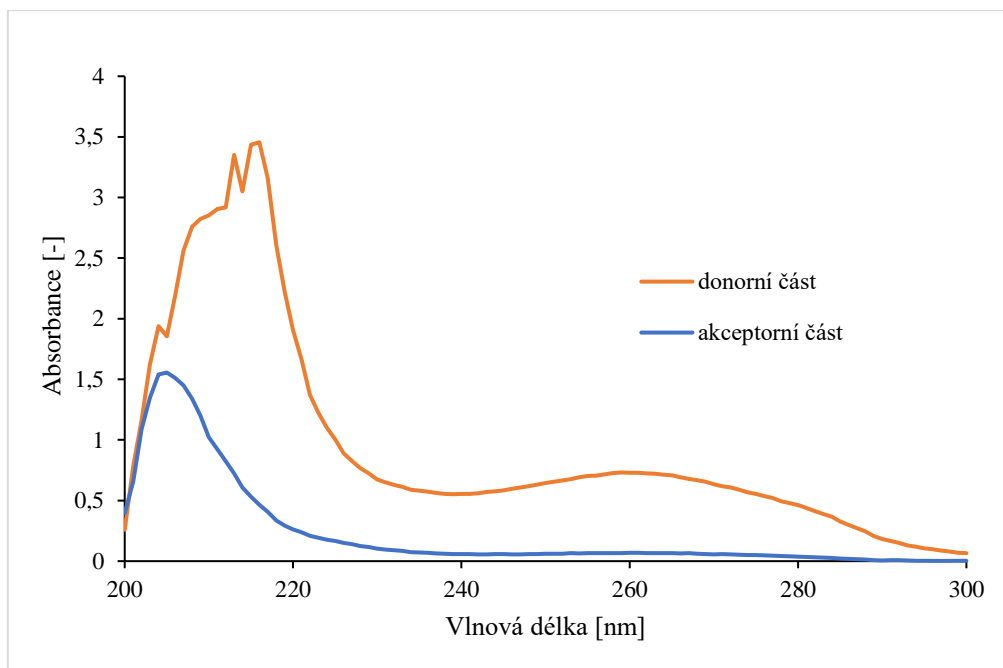
Obrázek 18 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely



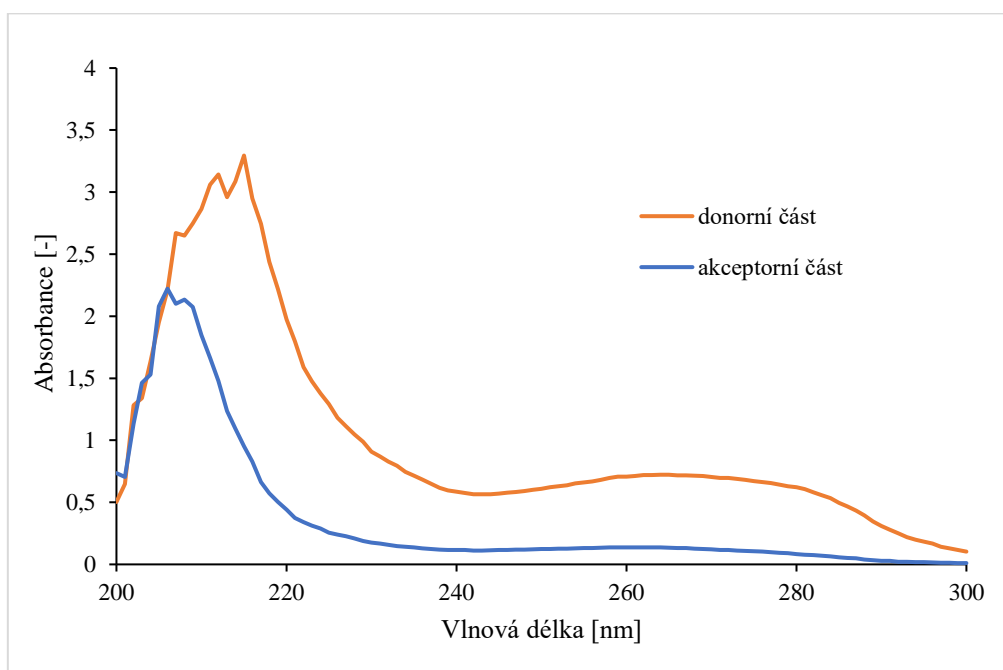
Obrázek 19 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely

Z grafů je patrné, že Bisabolol opět prochází přes syntetickou Strat-M[®] membránu. Při tomto experimentu nedocházelo k protékání vzorku z donorní části cely. Také se v naměřených spektrech všech vzorků nachází pík při cca 280 nm, který se nepodařilo charakterizovat a opět ovlivňuje spektra naměřených vzorků. Po odečtení maxima absorbance píku při vlnové délce cca 280 nm z naměřených spekter vzorků bylo vypočítáno množství bisabololu z rovnice kalibrační křivky. I přes tuto korekci se nepodařilo vypočítat množství této aktivní látky ve vzorcích. Ve srovnání s použitým vzorkem bisabololu o výchozí koncentraci 10 mg/l, bylo vypočteno o dost vyšší množství.

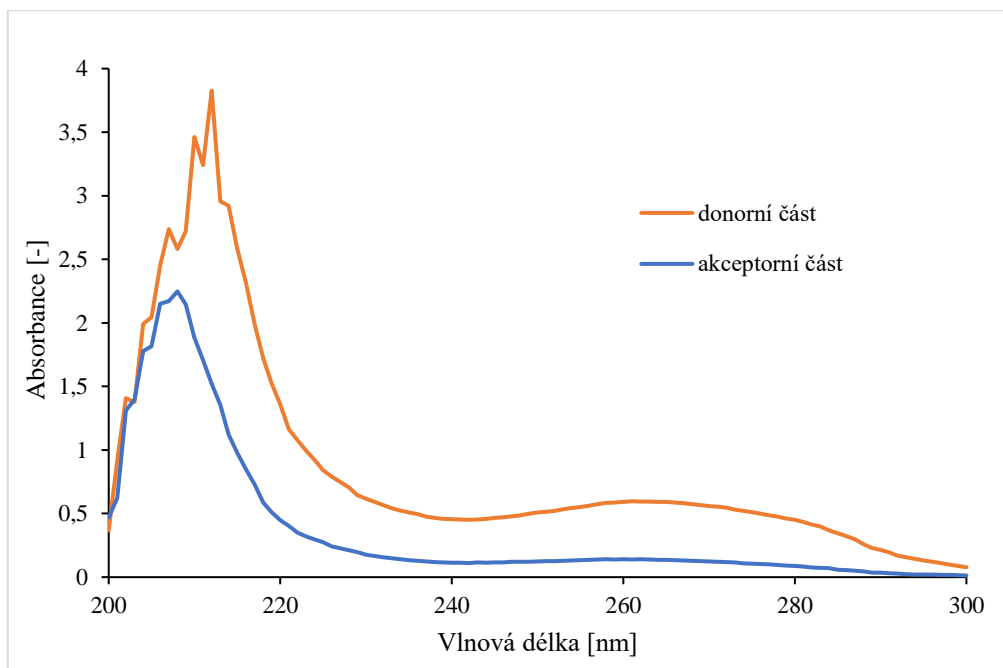
V experimentu č. 3 a 4 byl použit jako vzorek bisabolol v methanolu o koncentraci 10 mg/l s přidavkem izolátů, geraniolu a linaloolu (0,5 % obj.). Bylo sledováno ovlivnění těchto izolátů na penetraci bisabololu. V experimentu č. 3 byl použit jako izolát geraniol. Vzorky byly odebrány stejným způsobem a ve stejných časových intervalech, jako v případě simulace penetrace bisabololu bez izolátů. Následující grafy znázorňují naměřená UV-VIS spektra všech odebraných vzorků (Obrázek 20–23).



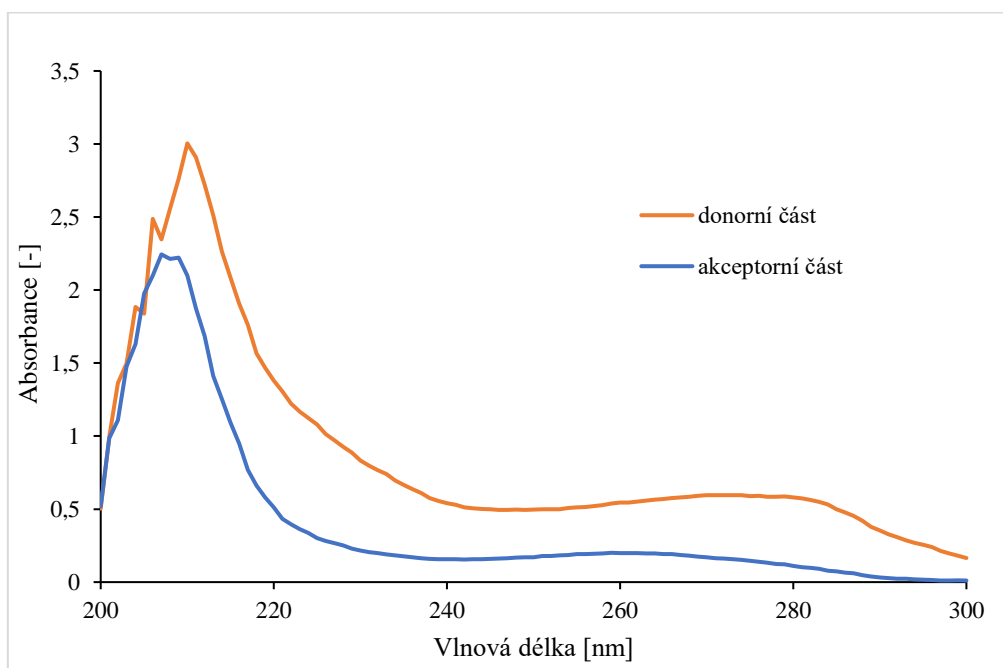
Obrázek 20 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přidavkem izolátu geraniolu (0,5 % obj.)



Obrázek 21 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přidavkem izolátu geraniolu (0,5 % obj.)

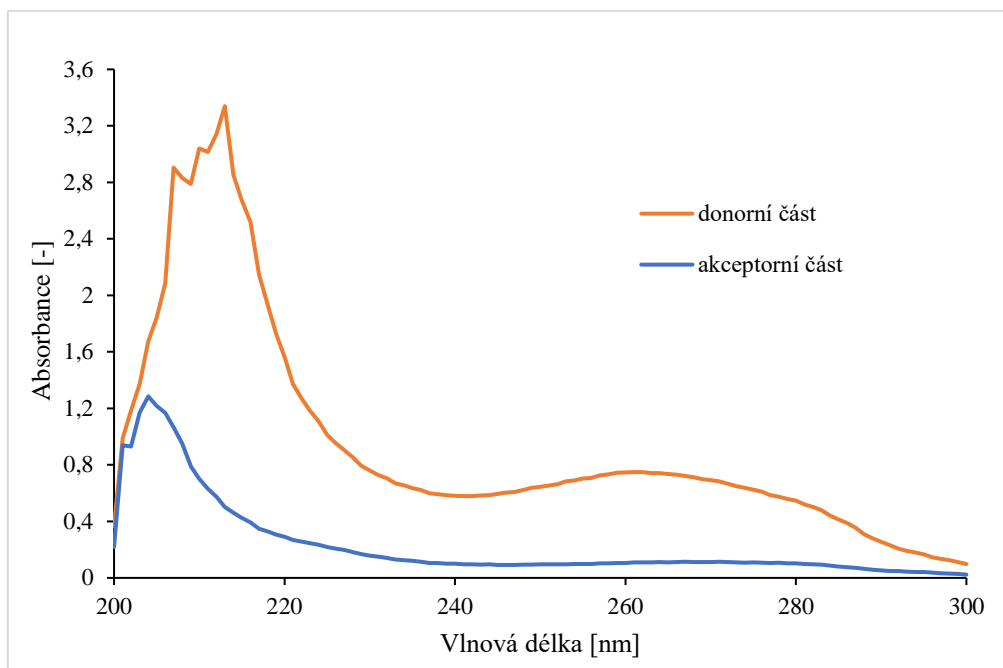


Obrázek 22 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přidavkem izolátu geraniolu (0,5 % obj.)

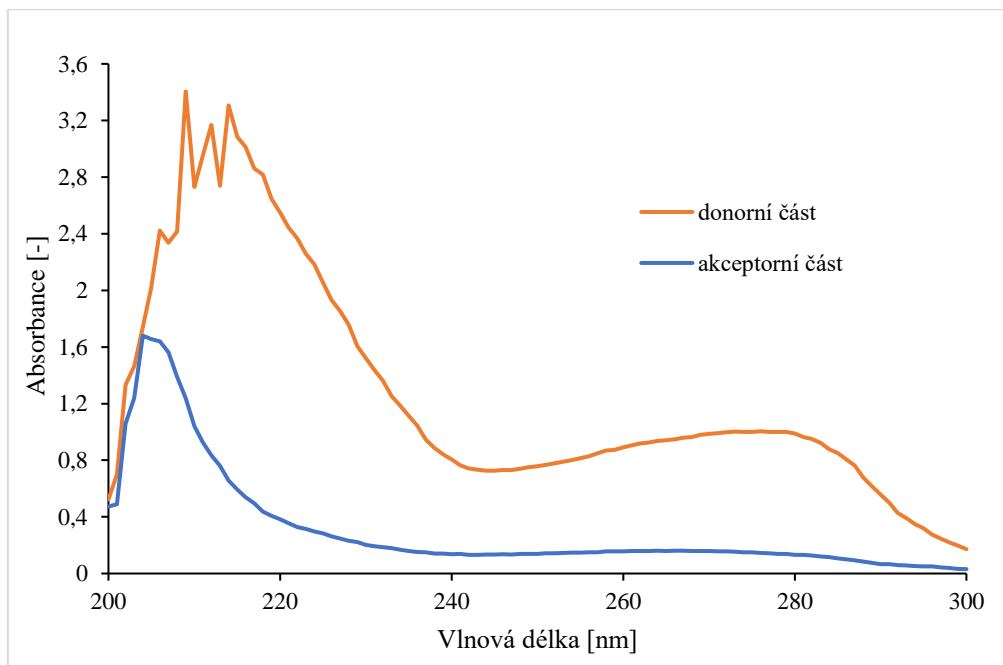


Obrázek 23 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přidavkem izolátu geraniolu (0,5 % obj.)

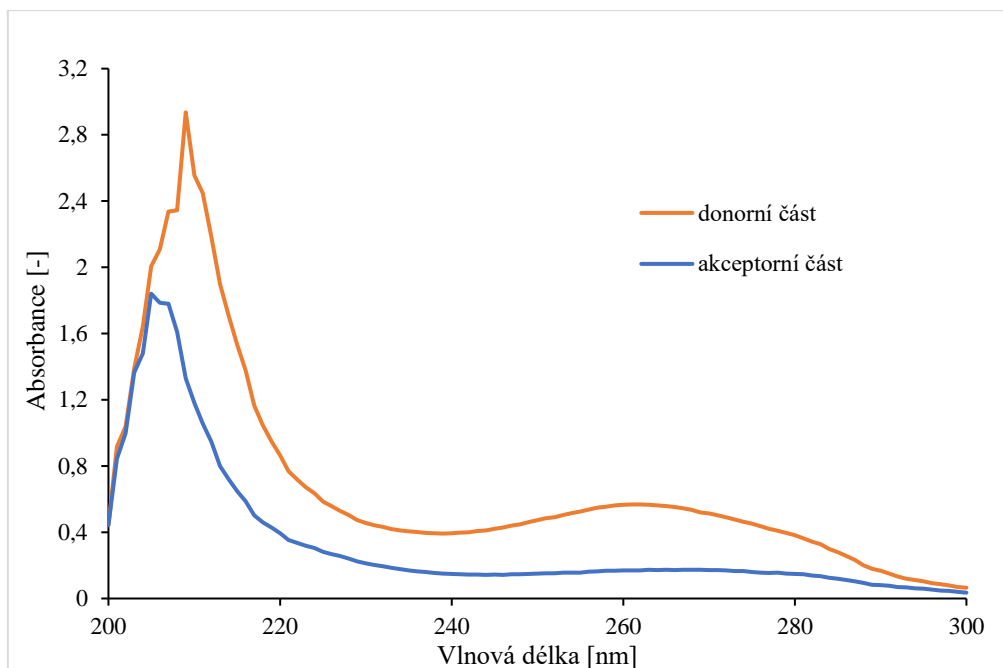
V experimentu č. 4 byl použit jako izolát linalool, vzorky byly opět odebrány stejným způsobem, jako v předchozích experimentech. Následující grafy znázorňují UV-VIS spektra naměřených vzorků pro použitý izolát linalool (Obrázek 24–27).



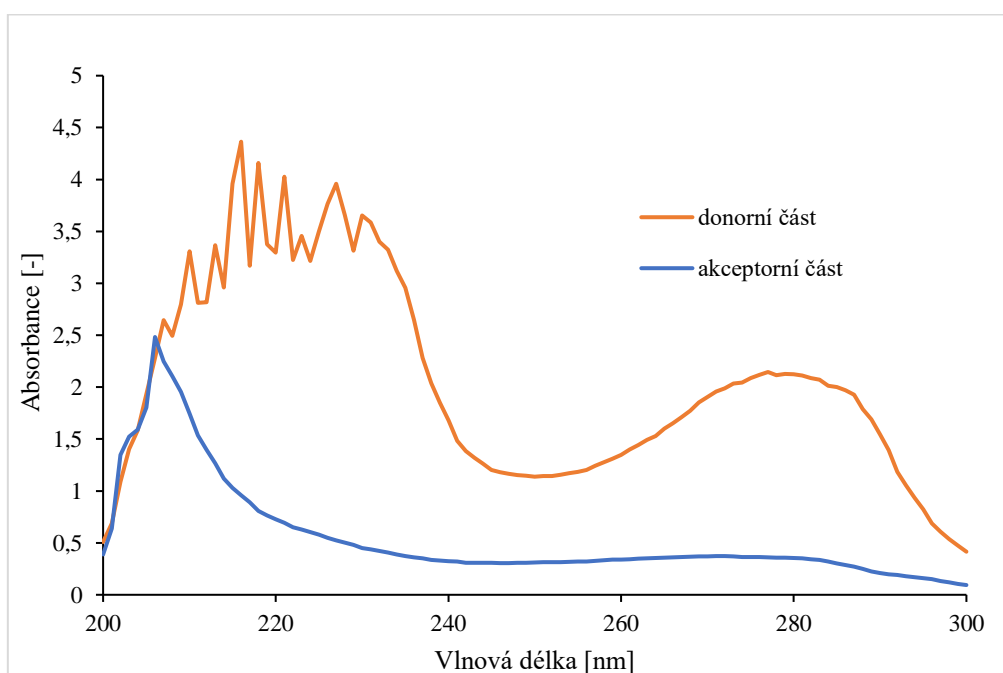
Obrázek 24 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přídavkem izolátu linaloolu (0,5 % obj.)



Obrázek 25 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přídavkem izolátu linaloolu (0,5 % obj.)



Obrázek 26 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přidavkem izolátu linaloolu (0,5 % obj.)



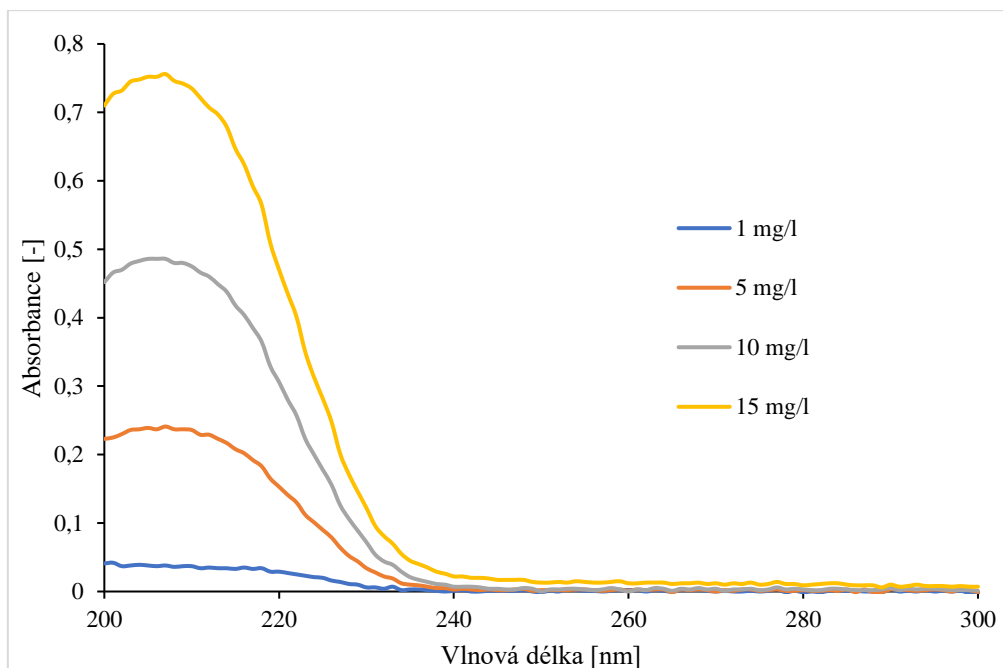
Obrázek 27 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely s přidavkem izolátu linaloolu (0,5 % obj.)

Z následujících grafů pro experimenty č. 3 a 4 je patrné, že bisabolol prochází přes syntetickou Strat-M[®] membránu. Ve srovnání s naměřenými spektry pro experiment č. 1 lze říct, že izoláty ovlivňují penetraci bisabololu přes membránu. V naměřeném spektru experimentu č. 2 po 2 hodinách se nachází pík při cca 205 nm o absorbanci 0,876 naměřené ve vzorku z akceptorní části cely a ve spektru experimentu č. 3 s použitím izolátu geraniolu po 2 hodinách se nachází pík při cca 204 nm o absorbanci 1,539, což odpovídá většímu množství bisabololu, který prochází přes syntetickou membránu. Srovnáním všech spekter naměřených v experimentu č. 1 ve všech časových intervalech s neměřenými spektry v experimentu č. 3 a 4 ve všech časových intervalech s použitými izoláty je patrné, že prochází větší množství bisabololu přes syntetickou membránu. Zároveň ale mohou izoláty ovlivnit naměřená UV-VIS spektra, což je viditelné v grafech, kde se nachází píky, které nejsou charakteristické pro bisabolol. Opět se ve spektrech nachází pík od 260 do 280 nm, který se nepodařilo charakterizovat a může ovlivňovat naměřená UV-VIS spektra.

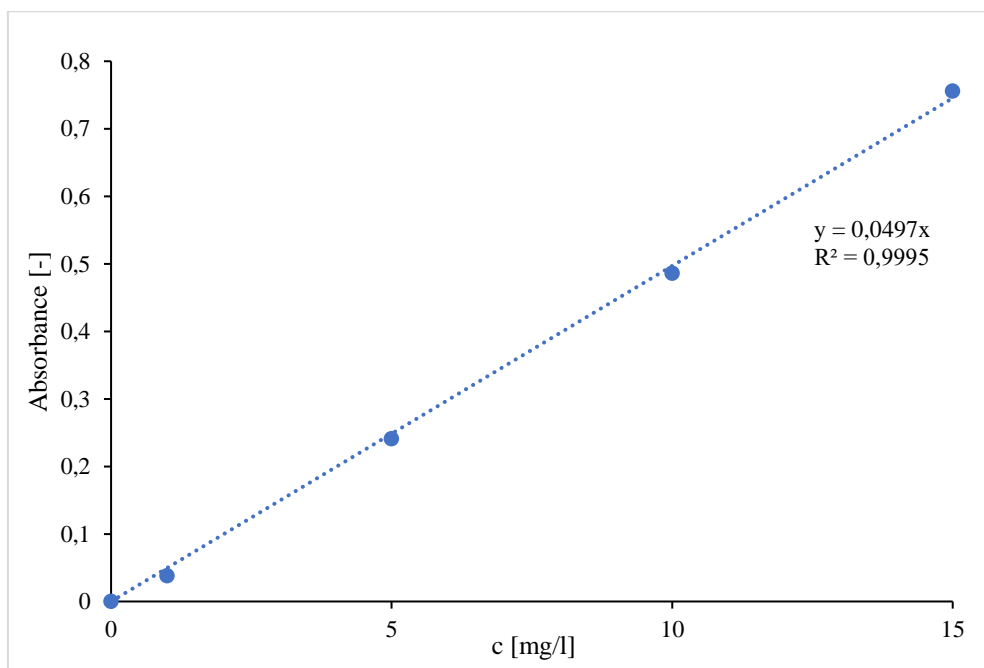
5.2 Simulace penetrace ektoinu

Byly provedeny celkem 4 experimenty simulace penetrace ektoinu prostřednictvím Franzových difuzních cel. Postup sestavení cel je opět popsán v experimentální části. Jako receptorové médium byla použita jak deionizovaná voda, tak fyziologický roztok. Pro měření byla zvolena jak syntetická Strat-M[®] membrána, tak membrána připravená z prasečí kůže. Postup přípravy prasečích membrán je popsán v experimentální části. Po simulaci penetrace ektoinu přes prasečí membrány byla provedena metoda tape-stripping, kdy bylo sledováno množství ektoinu ve vrstvách kůže. Postup provedení této metody je také popsán v experimentální části.

Pro stanovení koncentrace ektoinu ve vzorku byla nejprve měřena koncentrační řada ektoinu rozpuštěného v deionizované vodě o koncentracích 1; 5; 10 a 15 mg/l. Následně byla sestrojena kalibrační křivka závislosti koncentrace ektoinu v mg/l na absorbanci naměřené pro zmiňované koncentrace při stejné vlnové délce (207 nm). Následující grafy znázorňují naměřenou kalibrační řadu ektoinu v deionizované vodě (Obrázek 28) a z ní sestrojenou kalibrační křivku (Obrázek 29).



Obrázek 28 UV-VIS spektrum kalibrační řady ektoinu



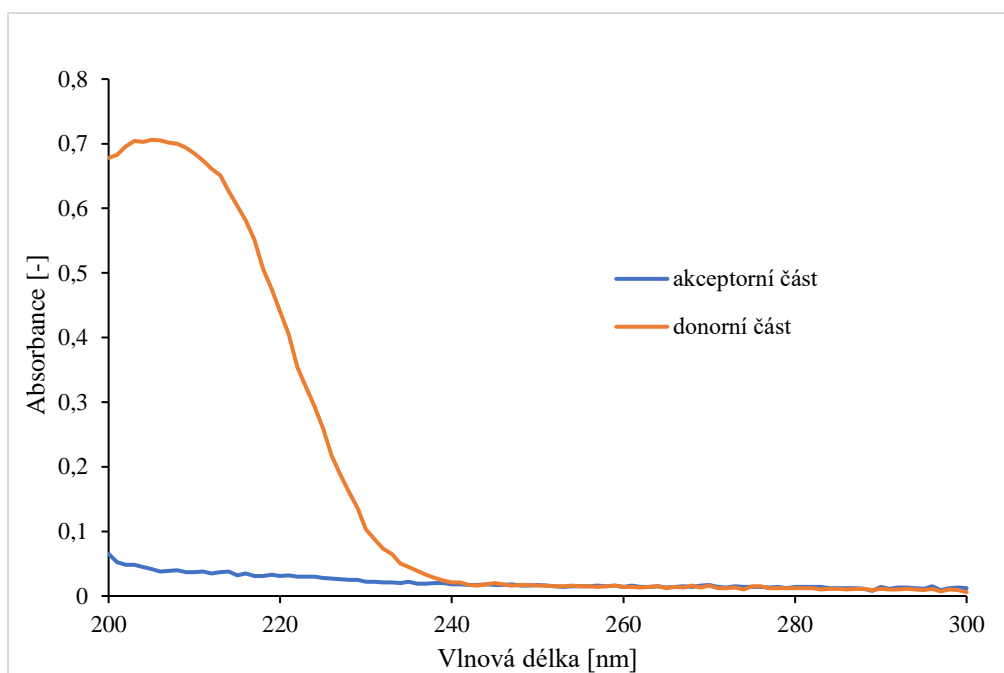
Obrázek 29 Kalibrační křivka ektoinu

Z rovnice je následně vypočítáno množství ektoinu obsaženého ve vzorcích odebraných z receptorové i donorní části cely.

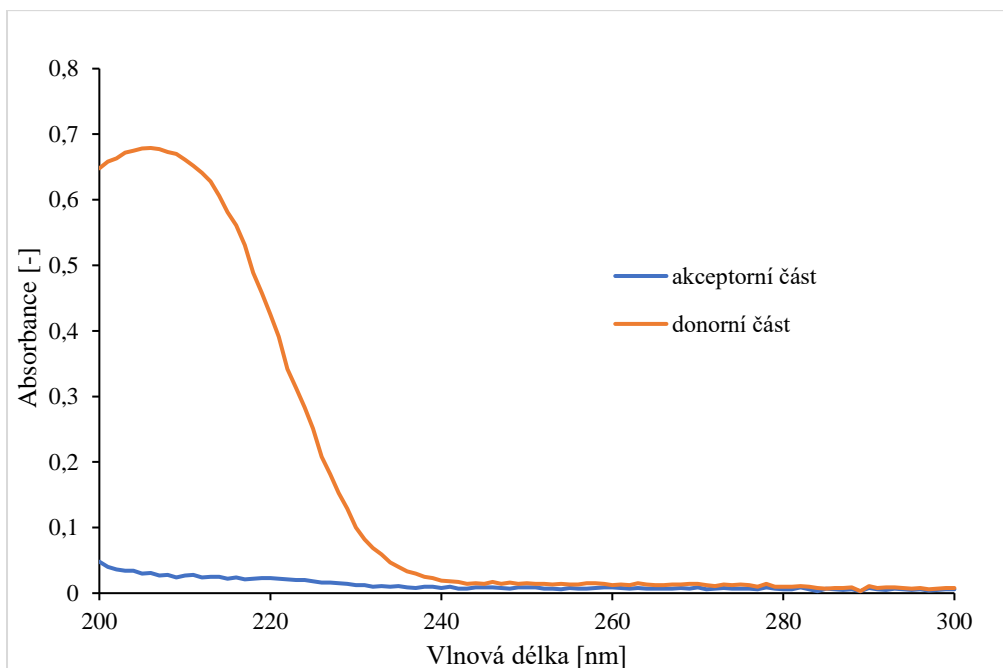
V experimentu č. 1 byly sestaveny 3 cely, do každé cely byly dávkovány jiné vzorky. Do první cely byl dávkován vzorek o koncentraci 5 mg/l ektoinu v deionizované vodě, další cely byla předložena vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l a do třetí cely byl dávkován vzorek ektoinu o koncentraci 15 mg/l. V tomto experimentu byla použita syntetická Strat-M[®] membrána a receptorová část cely byla naplněna deionizovanou vodou.

Vzorky byly odebírány ve stejných časových intervalech, jak je popsáno v experimentální části. Po odebrání vzorků z akceptorní a donorní části cely byly následně vzorky měřeny pomocí UV-VIS spektrofotometrie a po každém měření byly zpět vráceny do příslušné části cely, aby nedocházelo k ředění receptorové části a tím snižování koncentrace aktivní látky.

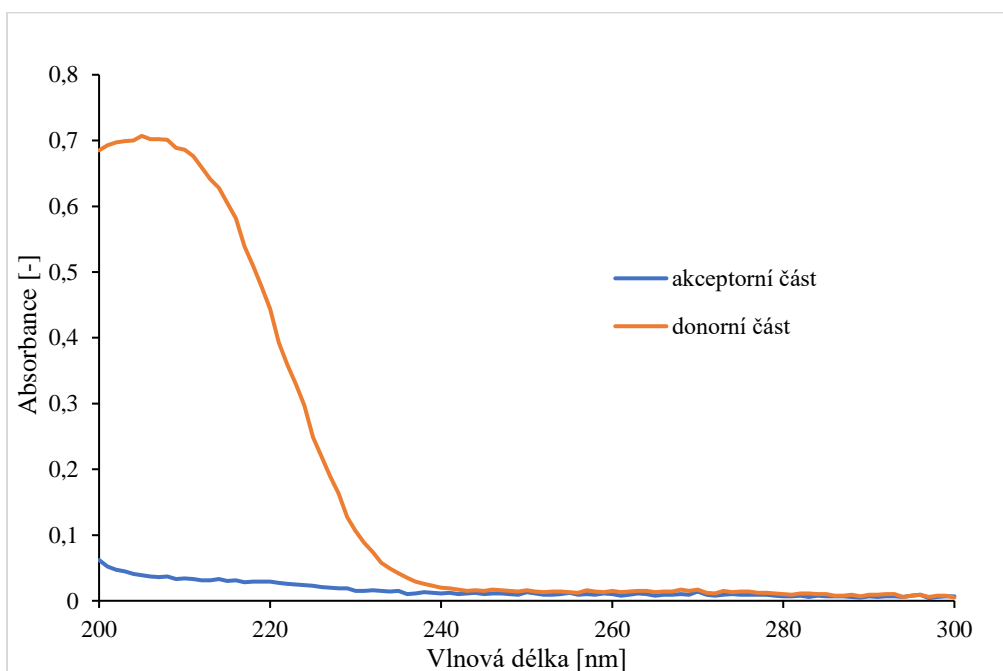
Následující grafy znázorňují naměřená UV-VIS spektra pro vzorky odebrané po 2; 4; 6 a 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 15 mg/l (Obrázek 30–34). Zbylé grafy znázorňující naměřená UV-VIS spektra vzorků odebraných v již zmiňovaných časových intervalech z příslušných částí cely pro zbylé výchozí koncentrace vzorku ektoinu jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1–8).



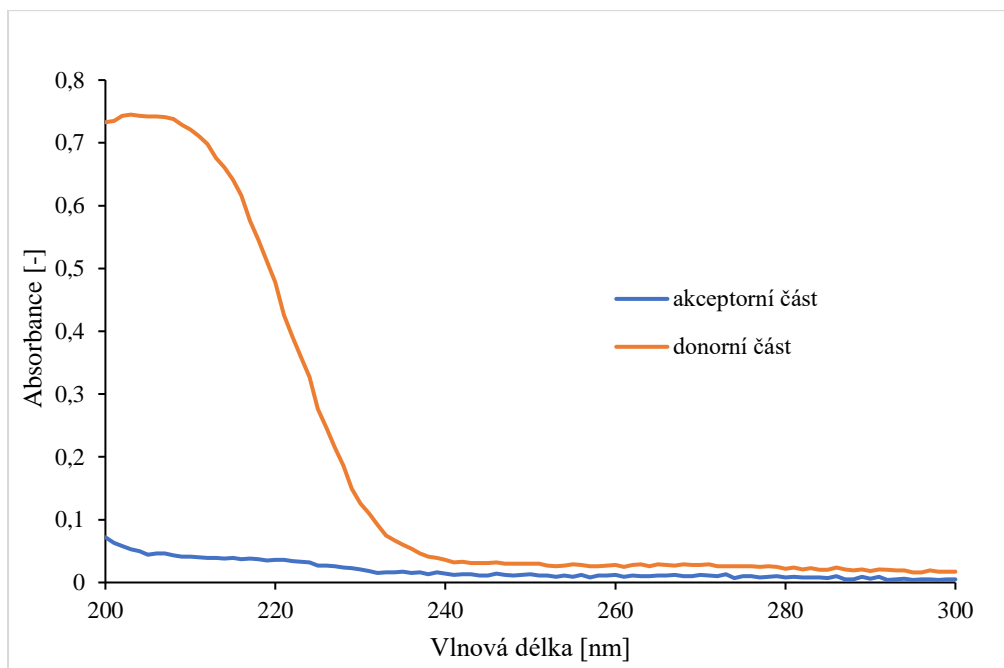
Obrázek 30 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 15 mg/l



Obrázek 31 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 15 mg/l



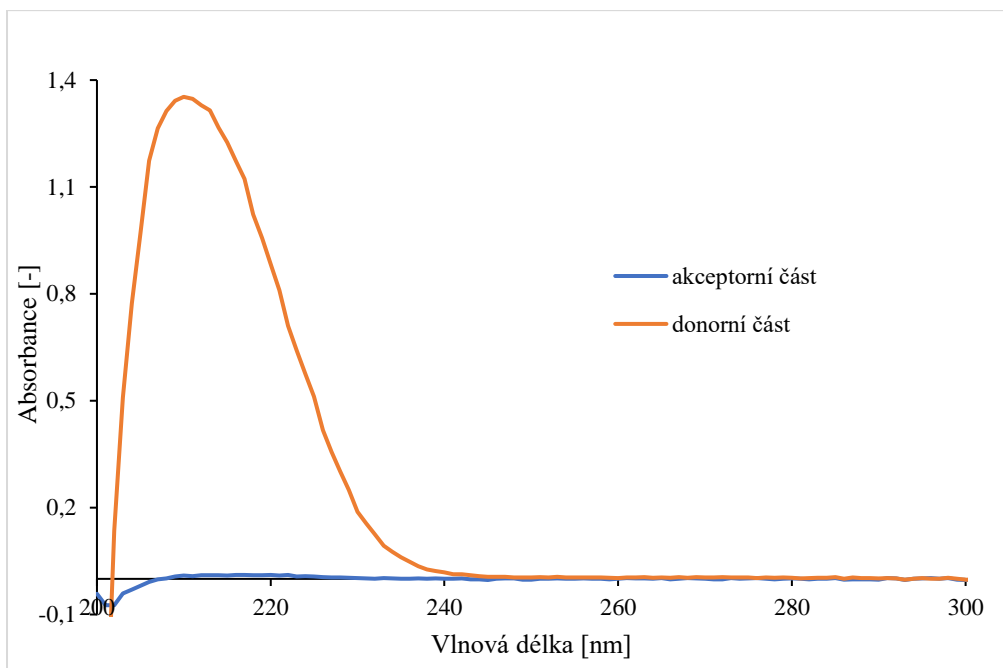
Obrázek 32 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 15 mg/l



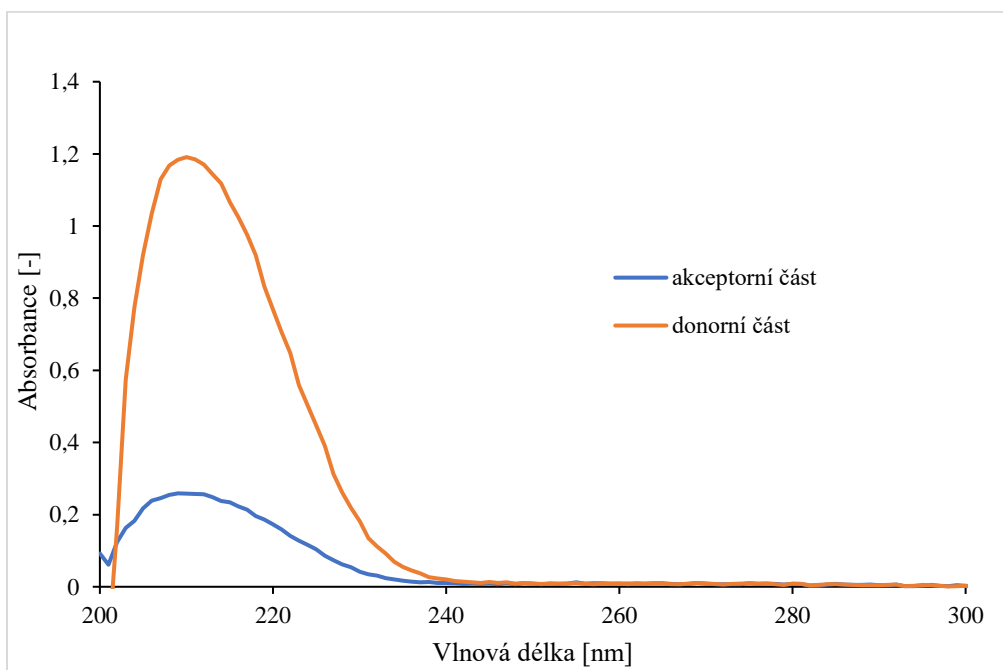
Obrázek 34 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 15 mg/l

Ze všech grafů je patrné, že ektoin neprochází přes syntetickou Strat-M[®] membránu, kdy ve vzorcích odebraných z akceptorní části cely nebylo naměřeno žádné množství ektoinu. Ve spektrech vzorků odebraných z akceptorní části cely se nenachází charakteristický pík při cca 207 nm pro tuto aktivní látku.

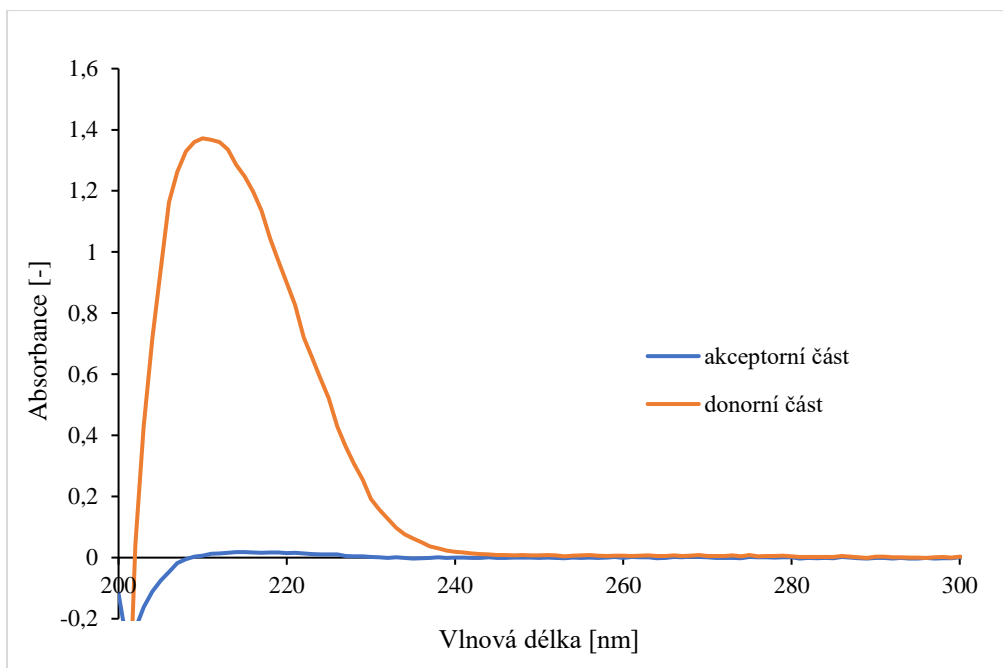
V experimentu č. 2 byly sestaveny 4 cely, každá cela byla předložena vzorkem ektoinu o koncentraci 15 mg/l a byla použita syntetická Strat-M[®] membrána. Receptorová část cely byla naplněna fyziologickým roztokem. Vzorky byly odebírány ve stejných časových intervalech, jako v předchozím experimentu. Následující grafy znázorňují naměřená UV-VIS spektra všech odebraných vzorků (Obrázek 35–38).



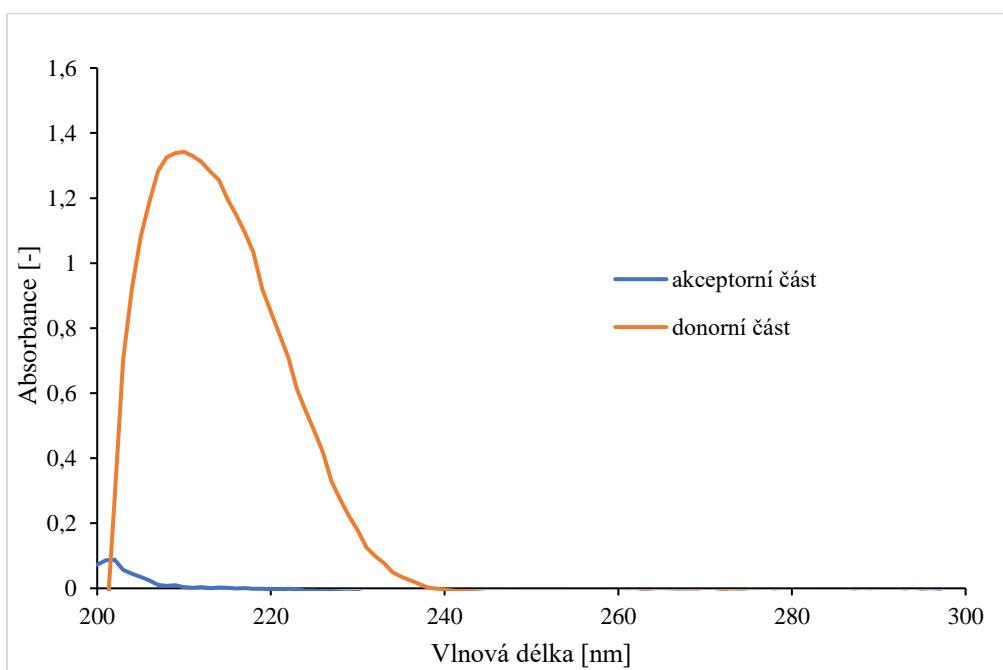
Obrázek 35 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 36 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 37 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 38 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely

Ve spektru naměřeném pro vzorky odebrané z akceptorní části cely není charakteristický pík pro ektoin, tudíž i v tomto experimentu bylo prokázáno, že ektoin neprochází přes syntetickou Strat-M[®] membránu. Ve vzorku odebraném po 4 hodinách se nachází charakteristický pík pro ektoin, což je způsobeno protékáním cely, kdy při sestavení této cely nebyla donorní a receptorová část dostatečně utěsněna a tím mohlo dojít k protékání malého množství vzorku do receptorové části cely.

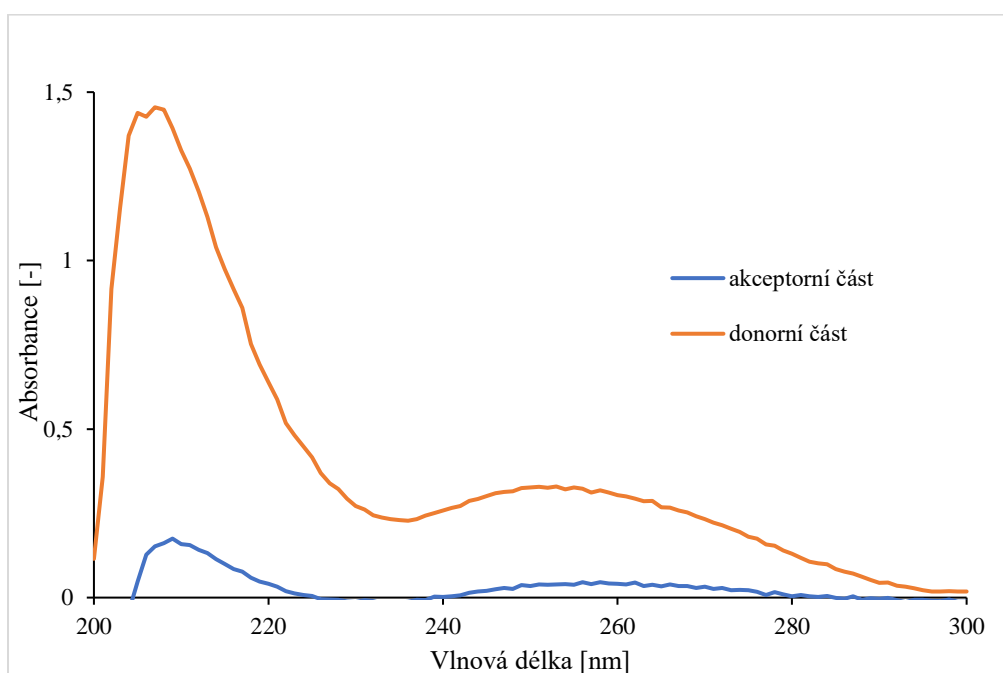
Srovnáním spekter naměřených z experimentu č. 1 jsou v tomto experimentu naměřené vyšší absorbance vzorků odebraných z donorní části cely. To může být způsobeno použitým receptorovým médiem, kdy v tomto experimentu byl použit fyziologický roztok, na rozdíl od experimentu č. 1, kde jako receptorové médium byla zvolena deionizovaná voda. Vzorky byly měřeny také pomocí kapalinové chromatografie. Následující tabulka (Tabulka 4) znázorňuje naměřené množství ektoinu ve vzorcích odebraných z akceptorní a donorní části cely pomocí kapalinové chromatografie.

Tabulka 4 Naměřené množství ektoinu přes syntetickou Strat-M® membránu metodou HPLC

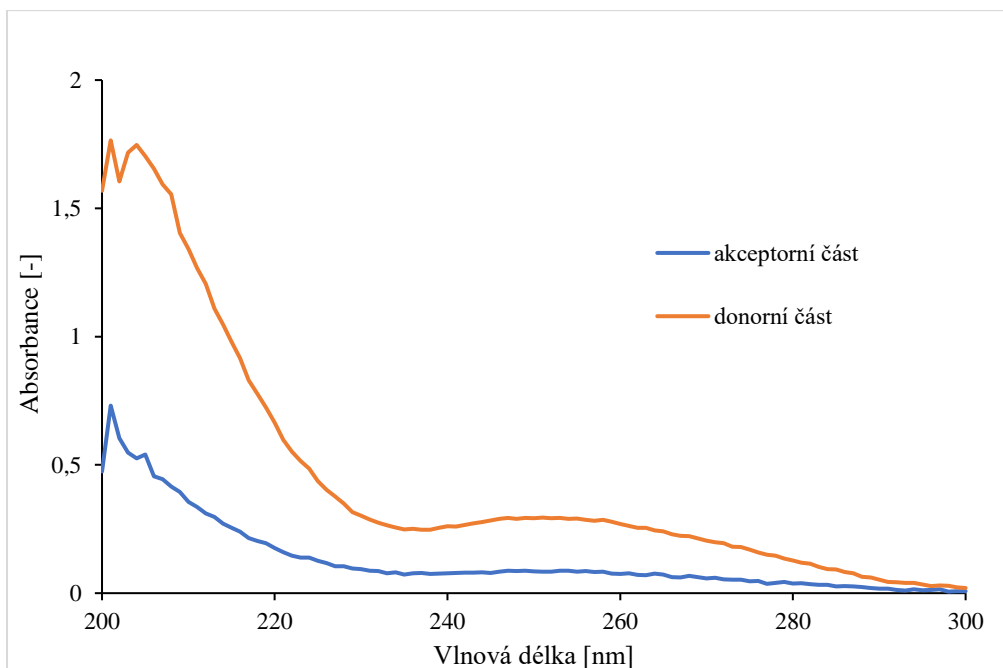
	mn_{akc} [mg/l]	mn_{don} [mg/l]
po 2 h	-	8,987
po 4 h	1,232	6,043
po 6 h	-	8,24
po 24 h	-	8,204

Z tabulky je patrné, že nebylo naměřeno žádné množství ektoinu ve vzorcích odebraných po 2; 6 a 24 hodinách z akceptorní části cely. Ve vzorku odebraném po 4 hodinách z akceptorní části cely bylo naměřeno množství 1,232 mg/l ektoinu, což je způsobeno protékáním vzorku z důvodu nedostatečného utěsnění donorní a receptorové části cely svorkami a parafilmem.

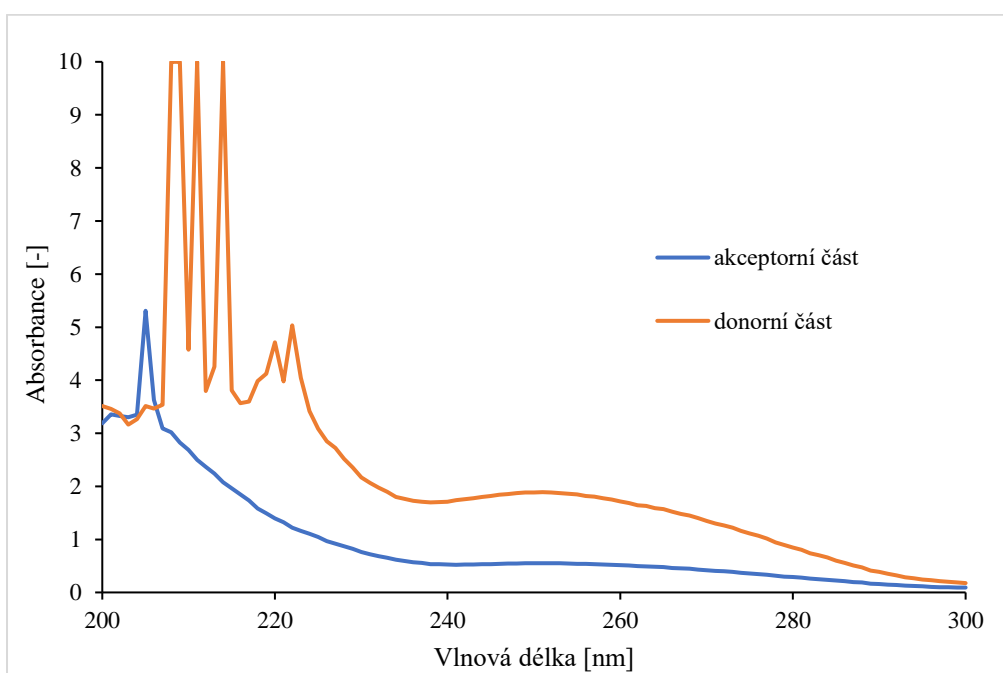
V experimentu č. 3 byl jako vzorek použit ektoin o koncentraci 15 mg/l v deionizované vodě. V tomto experimentu byla zvolena membrána připravená z prasečího ucha. Receptorová část cely byla naplněna fyziologickým roztokem a vzorky byly odebírány stejným způsobem a ve stejných časových intervalech, jak je popsáno v experimentální části. Následující grafy znázorňují naměřená UV-VIS spektra pro odebrané vzorky (Obrázek 39–42).



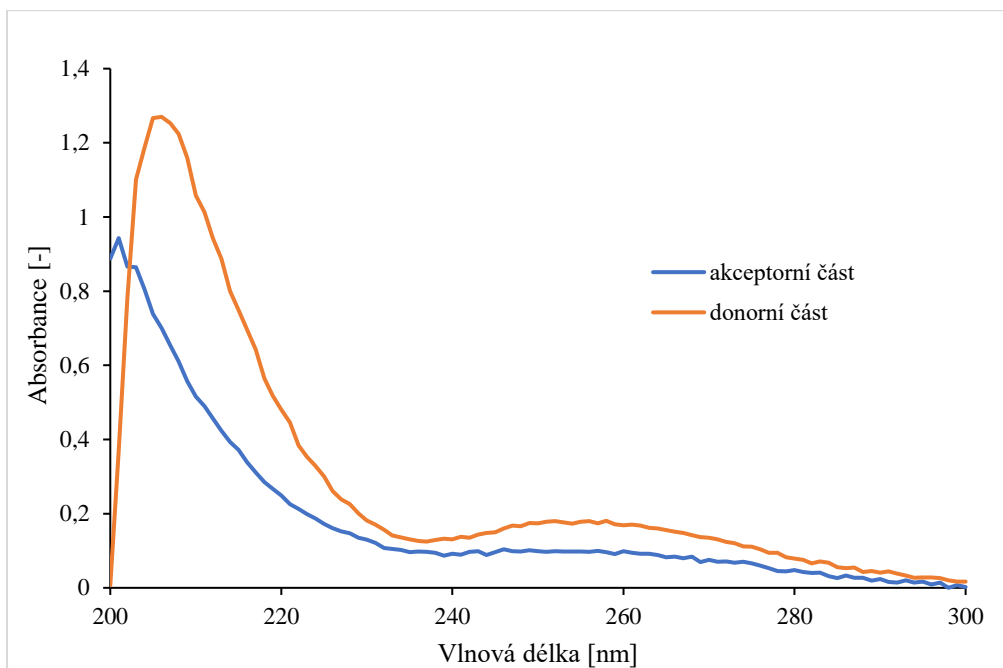
Obrázek 39 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 40 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely

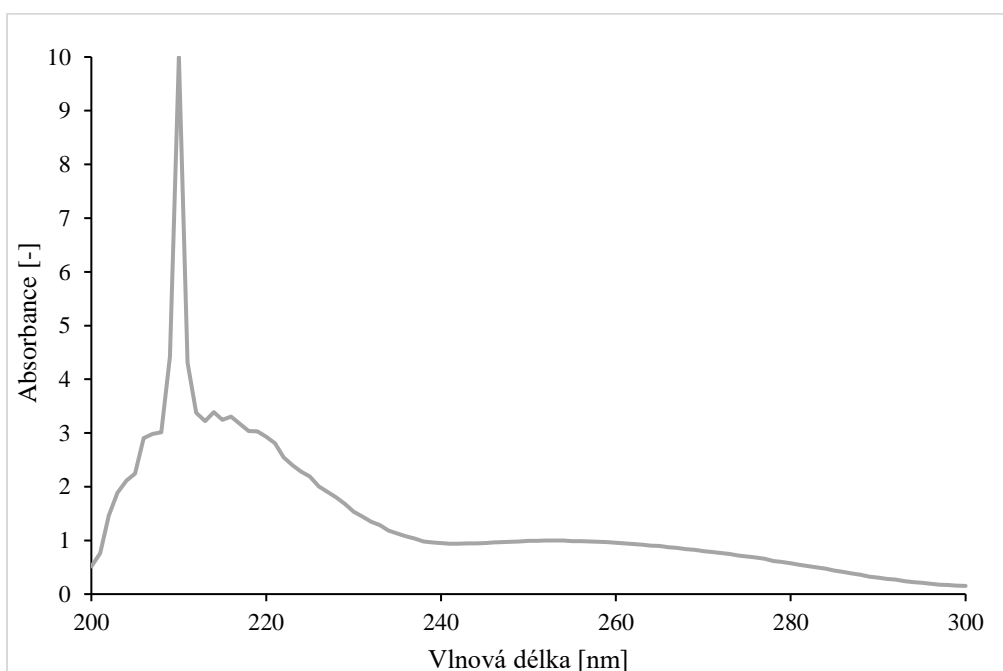


Obrázek 41 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely

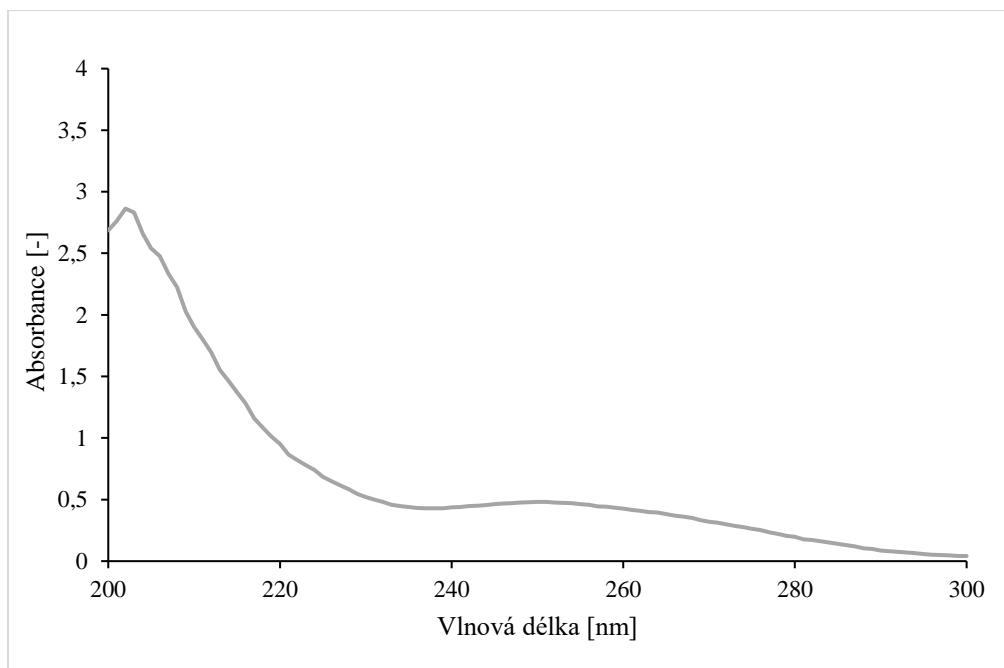


Obrázek 42 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely

Z grafů naměřených spekter je patrné, že ektoin prochází přes prasečí membrány. Ve spektrech se nachází pík při cca 260 nm, který ovlivňuje naměřená spektra vzorků. Ve spektru naměřených vzorků odebraných po 6 hodinách se nachází píky od cca 210 do 220 nm, které neodpovídají ektoinu. Z tohoto důvodu byl vzorek prasečí kůže louhován ve fyziologickém roztoku a také v deionizované vodě, aby se zjistilo, zda samotné ucho neovlivňuje naměřená spektra a vyšší absorbance naměřených spekter vzorků. Následující grafy znázorňují naměřená spektra vylouhované prasečí kůže (Obrázek 43–44).



Obrázek 43 Naměřené spektrum extraktu prasečí kůže ve fyziologickém roztoku



Obrázek 44 Naměřené spektrum extraktu prasečí kůže v deionizované vodě

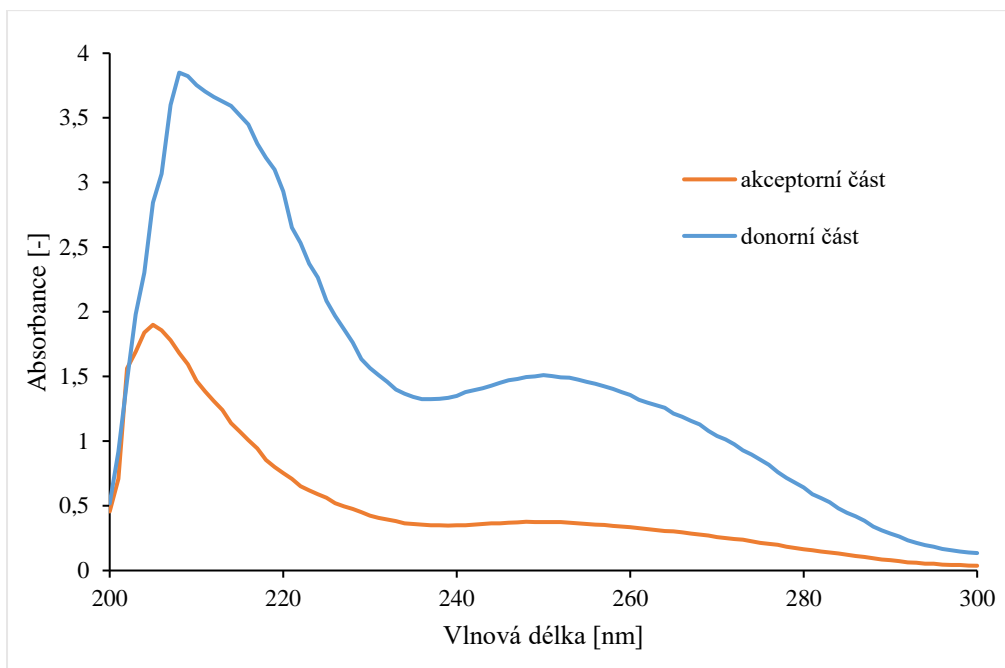
Ze spekter vyplývá, že výluh z prasečí kůže výrazně ovlivní naměřená spektra vzorků, a to tak, že zvýší jejich naměřenou absorbanci. Odebrané vzorky byly měřeny pomocí kapalinové chromatografie, kdy následující tabulka (Tabulka 5) znázorňuje naměřené množství ve vzorcích odebraných v již zmíněných časových intervalech z akceptorní i donorní části cely. Vzorky odebrané po 6 hodinách se nepodařilo naměřit.

Tabulka 5 Naměřené množství ektoinu přes prasečí kůži metodou HPLC

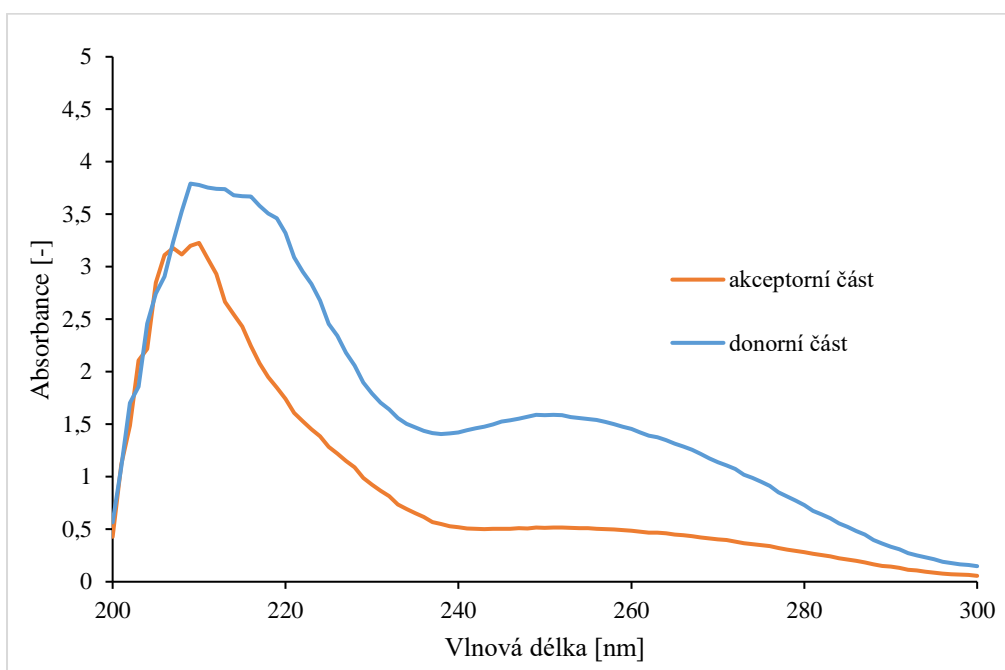
	mn_{akc} [mg/l]	mn_{don} [mg/l]
po 2 h	-	3,719
po 4 h	0,0296	3,545
po 6 h	-	-
po 24 h	0,269	2,051

Z tabulky vyplývá, že ve vzorku odebraném po 2 hodinách z akceptorní části cely nebylo naměřeno žádné množství ektoinu. Největší množství ektoinu bylo naměřeno ve vzorku odebraném po 24 hodinách z akceptorní části cely. Naměřená množství ve vzorcích odebraných z donorní části cely jsou nízká, v porovnání k použitému vzorku ektoinu o výchozí koncentraci 15 mg/l. To je způsobeno tím, že se při měření malé množství aktivní látky zadržuje ve vrstvách prasečí kůže.

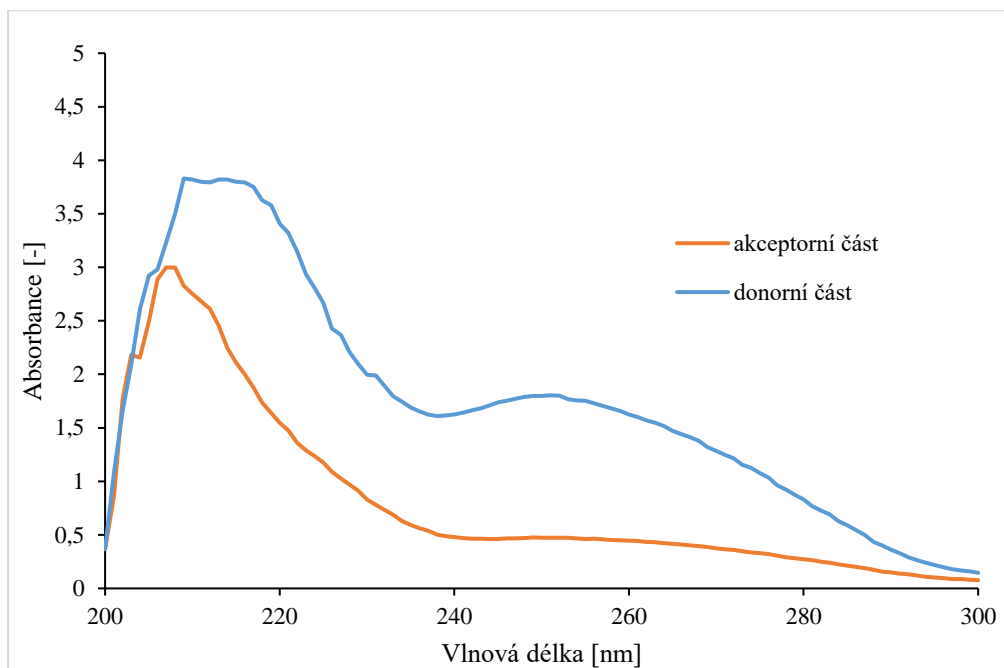
V experimentu č. 4 byla donorní část naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l. Mezi donorní a receptorovou část byla umístěna membrána připravená z prasečího ucha a receptorová část byla naplněna fyziologickým roztokem. Vzorky byly odebírány v časových intervalech po 2; 4 a 6 hodinách ze stejných částí cely, jako v předchozím experimentu. Vzorky byly následně měřeny pomocí UV-VIS spektrofotometru. Následující grafy znázorňují naměřená spektra všech odebraných vzorků (Obrázek 45–47).



Obrázek 45 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely



Obrázek 46 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely

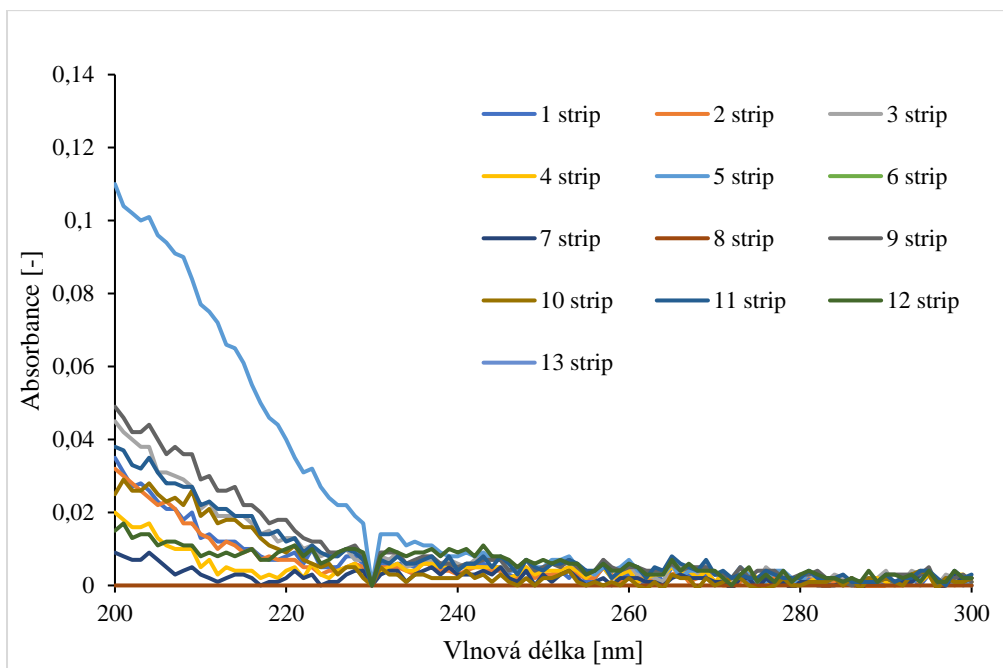


Obrázek 47 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely

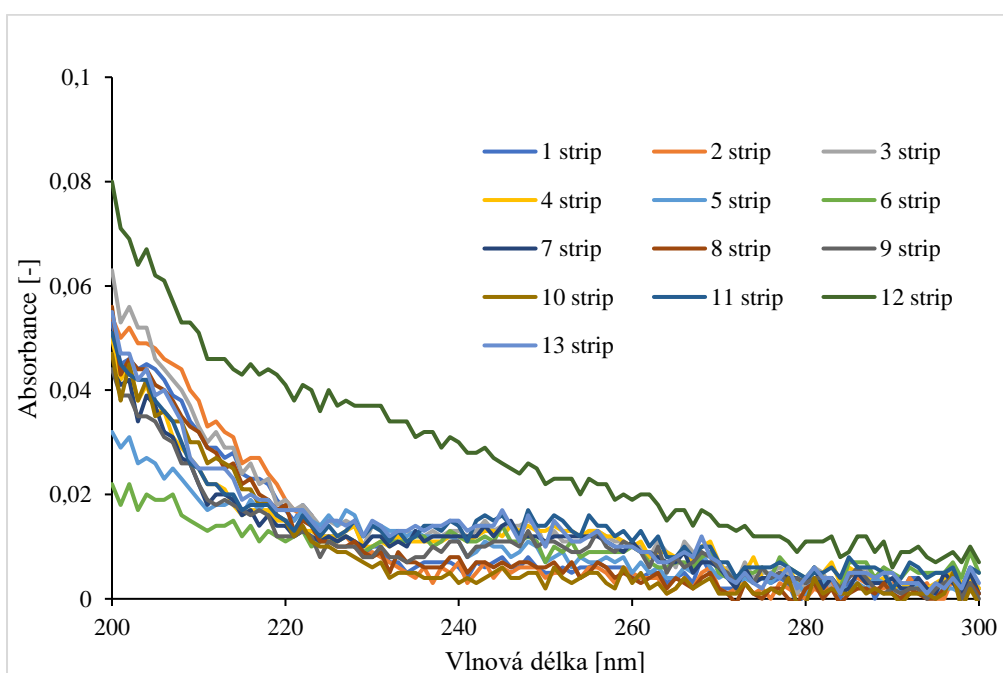
Ve spektrech naměřených vzorků odebraných z donorní části cely se opět nachází pík při cca 250 nm, který může odpovídat extraktům z prasečí membrány, a tím ovlivní měření odebraných vzorků. Z tohoto důvodu nebylo možné vypočítat množství této aktivní látky v odebraných vzorcích. Ve spektru naměřeném pro vzorky odebrané z akceptorní části jsou charakteristické píky při cca 206-207 nm, které odpovídají maximu absorbance ektoinu. Bylo tedy opět prokázáno, že ektoin prochází přes prasečí kůži. Vzhledem k tomu, že byly naměřeny vysoké absorbance vzorků, nebylo možné vypočítat množství ektoinu ve vzorcích. I v tomto případě se může malé množství ektoinu zadržovat ve vrstvách prasečí kůže, což je dokázáno metodou tape-stripping.

5.3 Metoda tape-stripping

Tato metoda slouží ke stanovení aktivních látek ve vrstvách použité kůže pro simulace penetrace těchto látek. Extrakcí adhezních pásek, které jsou postupně přikládány na stejné místo vzorku kůže a následně strhávány z kůže, lze stanovit udržování aktivní látky v konkrétních vrstvách kůže. Postup provedení tape-strippingu je popsán v experimentální části. Tape-stripping byl aplikován na prasečí kůži, která byla použita pro simulaci penetrace ektoinu o koncentraci 10 mg/l a v časových intervalech po 4 a 6 hodinách. Bylo provedeno celkem 13 stripů pomocí adhezních pásek a tyto pásy byly extrahovány v deionizované vodě. Extrakty byly následně analyzovány pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Následující grafy znázorňují naměřená UV-VIS spektra pro tyto extrakty (Obrázek 48–49).



Obrázek 48 Naměřená UV-VIS spektra 13 stripů odebraných z prasečí kůže, která byla použita pro simulaci penetrace ektoinu o koncentraci 10 mg/l po 4 hodinách



Obrázek 49 Naměřená UV-VIS spektra 13 stripů odebraných z prasečí kůže, která byla použita pro simulaci penetrace ektoinu o koncentraci 10 mg/l po 6 hodinách

Ve spektrech naměřených extraktů po 4 hodinách vykazuje největší nárůst absorbance 5. strip a ve spektru naměřených extraktů po 6 hodinách pak 12. strip. Se vzrůstajícím časovým intervalem simulace penetrace ektoinu se tato aktivní látka nejvíce zadržuje v nižší vrstvě kůže.

6 ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na simulaci penetrace aktivních látek prostřednictvím Franzových difuzních cel. Experimentální část byla zaměřena na simulaci penetrace dvou aktivních látek, bisabololu a ektoinu, které byly poskytnuty kosmetickou firmou Nobilis Tilia. Pro simulace byly použity dva typy membrán, syntetická Strat-M[®] membrána a membrána připravená z kůže prasečího ucha.

Byly provedeny celkem 4 experimenty pro simulaci penetrace bisabololu, kdy ve 2 experimentech byly použity izoláty geraniol a linalool jako esenciální oleje. Bylo sledováno, zda ovlivňují prostupnost látek skrze kůži. Pro simulaci penetrace bisabololu byla použita syntetická Strat-M[®] membrána ve všech experimentech. Prasečí membrána nebyla použita pro následnou simulaci, a to z toho důvodu, že pro rozpouštění a přípravu vzorků bisabololu se používal methanol, který by výrazně změnil strukturu kůže. Po sestavení FDC byly odebírány vzorky v časových intervalech 2; 4; 6 a 24 hodinách a tyto vzorky byly měřeny metodou UV-VIS spektrometrie. V případě experimentu č. 1 byly vzorky měřeny metodou kapalinové chromatografie. V tomto experimentu bylo prokázáno, že bisabolol prochází přes syntetickou Strat-M[®] membránu, kdy se v naměřených UV-VIS spektrech nacházel pík při cca 204 nm. Z maxima absorbance naměřené ve všech vzorcích bylo následně vypočítáno množství bisabololu prošlého skrze membránu. To bylo také prokázáno metodou HPLC. V experimentu č. 2; 3 a 4 se nepodařilo vypočítat množství bisabololu z UV-VIS spekter pomocí kalibrační křivky, a to z toho důvodu, že se ve spektrech nachází píky, které se nepodařilo charakterizovat a ovlivňují tak naměřená spektra vzorků. Použitím izolátů bylo zjištěno, že naměřená absorbance odebraných vzorků z akceptorní části cely je vyšší než naměřené absorbance vzorků v experimentu č. 1, což může odpovídat většímu množství bisabololu prošlého přes syntetickou membránu. Zároveň ale izoláty mohou ovlivnit naměřená spektra vzorků, kdy se ve spektrech opět nacházely píky, které se nepodařilo charakterizovat.

Byly provedeny celkem 4 experimenty pro simulaci penetrace ektoinu, kdy ve dvou experimentech byly použity syntetické Strat-M[®] membrány a ve zbylých dvou experimentech pak membrány připravené z prasečího ucha. V experimentu č. 1 a 2, kdy byly použity syntetické membrány, bylo prokázáno, že ektoin neprochází přes tuto membránu, kdy se v naměřených spektrech vzorků odebraných z akceptorní části cely nenacházel charakteristický pík při cca 207 nm, který odpovídá ektoinu. V experimentu č. 2 byl jako receptorové médium použit fyziologický roztok na rozdíl od experimentu č. 1, kdy byla použita deionizovaná voda. V naměřených spektrech vzorků odebraných z donorní části cely v experimentu č. 2 byly naměřeny vyšší absorbance v porovnání se spektry naměřenými v experimentu 1, což může být způsobeno právě volbou jiného receptorového média. V experimentu č. 3 a 4 byly použity membrány z prasečího ucha. V těchto experimentech bylo prokázáno, že ektoin prochází skrze tyto membrány, což dokazují naměřená UV-VIS spektra a také naměřené množství metodou HPLC v experimentu č. 3. Zároveň se v naměřených spektrech všech vzorků nachází píky, které mohou odpovídat extraktům z prasečího ucha, který výrazně ovlivní naměřená spektra. Kvůli tomuto nebylo možné vypočítat množství této aktivní látky pomocí kalibrační křivky, kdy maxima absorbancí naměřených při cca 207 nm byla o dost vyšší, v porovnání s naměřenou

koncentrační řadou. Zároveň se malé množství ektoinu může zadržovat ve vrstvách prasečí kůže, což bylo prokázáno metodou tape-stripping. Tato metoda slouží ke stanovení aktivní látky ve vrstvách kůže použitím adhezivní pásky, která je po postupném strhávání z kůže extrahovaná. Extrakty byly měřeny metodou UV-VIS spektrometrie. V naměřených spektrech bylo prokázáno, že se vzrůstajícím časovým intervalem simulace penetrace ektoinu se tato aktivní látka nejvíce zadržuje v nižší vrstvě kůže.

Tato diplomová práce měla za cíl stanovit koncentraci dvou aktivních látek, které prochází či neprochází skrze kůži prostřednictvím Franzových difuzních cel. Při sestavování těchto cel pro simulaci penetrace bisabololu docházelo často k protékání vzorku a tím bylo měření značně ztíženo. Tento problém by se dal řešit použitím různých těsnění, např. gumové těsnění, které by zároveň bylo možné aplikovat pro různá rozpouštědla. Jako slibným rozpouštědlem pro bisabolol, i v případě simulace penetrace přes prasečí kůži, se jevil vegelight, který ale rozpouštěl parafilm a z toho důvodu ho nebylo možné pro měření použít. Dále by bylo zapotřebí najít vhodnější rozpouštědlo pro bisabolol, které by bylo zároveň použitelné pro měření přes prasečí kůži. Další možností, jak tato měření vylepšit skrze stanovení bisabololu, je najít jinou vhodnou metodu detekce této aktivní látky, např. infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací.

Při stanovení ektoinu přes kůži prasečího ucha byl největším problémem to, že se ve spektrech nacházely píky, které odpovídaly extraktům z této kůže. Možným řešením tohoto problému by bylo kůži před měřením upravit, např. několik hodin louhovat v příslušném receptorovém médiu, který by ale neměnil strukturu a vlastnosti kůže. Také by bylo dobré zjistit, zda na použité membrány z prasečí kůže nemá vliv doba skladování.

Ze všech zmíněných poznatků vyplývá, že by bylo nejlepší se zaměřit výhradně na jednu aktivní látku a jeden typ membrány, buď syntetické, nebo zvířecí, a provést tak několik měření pro danou aktivní látku a měření srovnávat. Tímto by se daná propustnost či nepropustnost přes membránu lépe prokázala.

7 SEZNAM LITERATURY

- [1] PEREIRA, Paula, Elisabete Muchagato MAURICIO, Maria Paula DUARTE, Katelene LIMA, Ana S. FERNANDES, Gabriela BERNARDO-GIL a Maria-João CEBOLA. Potential of supercritical fluid myrtle extracts as an active ingredient and co-preservative for cosmetic and topical pharmaceutical applications. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* [online]. 2022, **28**. ISSN 23525541.
- [2] DINI, Irene a Sonia LANERI. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules* [online]. 2021, **26**(13). ISSN 1420-3049.
- [3] NOHYNEK, Gerhard J., Eric ANTIGNAC, Thomas RE a Herve TOUTAIN. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2010, **243**(2), 239-259. ISSN 0041008X.
- [4] KHEZRI, Khadijeh, Majid SAEEDI a Solmaz MALEKI DIZAJ. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2018, **106**, 1499-1505. ISSN 07533322.
- [5] RAMAZANI, Elham, Maryam AKABERI, Seyed Ahmad EMAMI a Zahra TAYARANI-NAJARAN. Pharmacological and biological effects of alpha-bisabolol: An updated review of the molecular mechanisms. *Life Sciences* [online]. 2022, **304**. ISSN 00243205.
- [6] JIANG, Yinkun, Lu XIA, Song GAO, Ning LI, Shiqin YU a Jingwen ZHOU. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced (-)- α -bisabolol production. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2023, **8**(2), 187-195. ISSN 2405805X.
- [7] FERNANDES, Mara Yone Dias, Marta Regina Santos do CARMO, Analu Aragão FONTELES, et al. (-)- α -bisabolol prevents neuronal damage and memory deficits through reduction of proinflammatory markers induced by permanent focal cerebral ischemia in mice. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2019, **842**, 270-280. ISSN 00142999.
- [8] KIM, Tae Yeob, Haeseong PARK, Sun-Ki KIM, Soo-Jung KIM a Yong-Cheol PARK. Production of (-)- α -bisabolol in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* [online]. 2021, **340**, 13-21. ISSN 01681656.
- [9] MAGALHÃES, Emanuel Paula, Brenna Pinheiro SILVA, Natália Luna AIRES, et al. (-)- α -Bisabolol as a protective agent against epithelial renal cytotoxicity induced by amphotericin B. *Life Sciences* [online]. 2022, **291**. ISSN 00243205.
- [10] MURUGAN, Ramar a Gopal Rao MALLAVARAPU. A-Bisabolol, the main constituent of the essential oil of *Pogostemon speciosus*. *Industrial Crops and Products* [online]. 2013, **49**, 237-239. ISSN 09266690.

- [11] ALVES GOMES ALBERTTI, Leticia, Thierry L. DELATTE, Katyuce SOUZA DE FARIAS, et al. Identification of the Bisabolol Synthase in the Endangered Candeia Tree (*Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch). *Frontiers in Plant Science* [online]. 2018, 2018-9-19, **9**. ISSN 1664-462X.
- [12] FENG, Yifan, Min QIU, Lei SHAO, Yujia JIANG, Wenming ZHANG, Wankui JIANG, Fengxue XIN a Min JIANG. Strategies for the biological production of ectoine by using different chassis strains. *Biotechnology Advances* [online]. 2024, **70**. ISSN 07349750.
- [13] LI, Lihong, Ning LI, Xinglong WANG, Song GAO, Juan ZHANG, Jingwen ZHOU, Zhimeng WU a Weizhu ZENG. Metabolic engineering combined with enzyme engineering for overproduction of ectoine in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* [online]. 2023, **390**. ISSN 09608524.
- [14] XU, Shunqing, Bin ZHANG, Wanhe CHEN, et al. Highly efficient production of ectoine via an optimized combination of precursor metabolic modules in *Escherichia coli* BL21. *Bioresource Technology* [online]. 2023, **390**. ISSN 09608524.
- [15] BRANDS, Stefanie, Peter SCHEIN, Karla F. CASTRO-OCHOA a Erwin A. GALINSKI. Hydroxyl radical scavenging of the compatible solute ectoine generates two N-acetimides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2019, **674**. ISSN 00039861.
- [16] RODERO, María del Rosario, Alessandro A. CARMONA-MARTÍNEZ, Cristina MARTÍNEZ-FRAILE, Raquel HERRERO-LOBO, Elisa RODRÍGUEZ, Pedro A. GARCÍA-ENCINA, Mar PEÑA a Raúl MUÑOZ. Ectoines production from biogas in pilot bubble column bioreactors and their subsequent extraction via bio-milking. *Water Research* [online]. 2023, **245**. ISSN 00431354.
- [17] RASHEED, Dalia M., Ahmed SERAG, Zeinab T. ABDEL SHAKOUR a Mohamed FARAG. Novel trends and applications of multidimensional chromatography in the analysis of food, cosmetics and medicine bearing essential oils. *Talanta* [online]. 2021, **223**. ISSN 00399140.
- [18] Çalışkan UK, Karakuş MM. Essential Oils as Skin Permeation Boosters and Their Predicted Effect Mechanisms. *J Dermatol & Skin Sci*. 2020, **2**(3), 24-30.
- [19] CAPITAIN, Charlotte C., Martin ZISCHKA, Cengiz SIRKECI a Philipp WELLER. Evaluation of IMS drift tube temperature on the peak shape of high boiling fragrance compounds towards allergen detection in complex cosmetic products and essential oils. *Talanta* [online]. 2023, **257**. ISSN 00399140.
- [20] GABBANINI, S., E. LUCCHI, M. CARLI, E. BERLINI, A. MINGHETTI a L. VALGIMIGLI. In vitro evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essentials oils from cosmetic formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2009, **50**(3), 370-376. ISSN 07317085.

- [21] ZSIKÓ, CSÁNYI, KOVÁCS, BUDAI-SZŰCS, GÁCSI a BERKÓ. Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro. *Scientia Pharmaceutica* [online]. 2019, **87**(3). ISSN 2218-0532.
- [22] VERMA, Nitu, Kishore GAJULA, Rakesh GUPTA a Beena RAI. Multiscale modeling of molecule transport through skin's deeper layers. *Computational Toxicology* [online]. 2023, **26**. ISSN 24681113.
- [23] EUCERIN. *Jak kůže funguje–struktura a funkce kůže* [online]. Dostupné z: <https://www.eucerin.cz/o-kuzi/zakladni-informace/struktura-a-funkce-kuze>
- [24] NÁRODNÍ ZDRAVOTNICKÝ INFORMAČNÍ PORTÁL. *Kůže: Struktura a funkce* [online]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/613-kuze-struktura-a-funkce>
- [25] BÍNOVÁ, Romana. *Informovanost veřejnosti o problematice melanomu kůže*. Pardubice, 2008. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [26] DYLEVSKÝ, Ivan a Petr JEŽEK. PALESTRA. *Základy funkční anatomie člověka* [online]. Dostupné z: <https://vos.palestra.cz/skripta/anatomie/12a1.htm>
- [27] ČESKÁ PRŮMYSLOVÁ ZDRAVOTNÍ POJIŠŤOVNA. *Kůže* [online]. Dostupné z: <https://www.cpzp.cz/clanek/5050-0-Kuze.html>
- [28] BOLZINGER, Marie-Alexandrine, Stéphanie BRIANÇON, Jocelyne PELLETIER a Yves CHEVALIER. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2012, **17**(3), 156-165. ISSN 13590294.
- [29] SCOTT, Erik R., J Bradley PHIPPS a Henry S. WHITE. Direct Imaging of Molecular Transport Through Skin. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 1995, **104**(1), 142-145. ISSN 0022202X.
- [30] SAVOCA, Adriana, Giovanni MISTRALETTI a Davide MANCA. A physiologically-based diffusion-compartment model for transdermal administration – The melatonin case study. *Computers & Chemical Engineering* [online]. 2018, **113**, 115-124. ISSN 00981354.
- [31] EDWARDS, David A., Mark R. PRAUSNITZ, Robert LANGER a James C. WEAVER. Analysis of enhanced transdermal transport by skin electroporation. *Journal of Controlled Release* [online]. 1995, **34**(3), 211-221. ISSN 01683659.
- [32] STORCHMANNOVÁ, Kateřina. *Chování léčiv pro dermatologické použití na modelových membránách*. Olomouc, 2019. Bakalářská práce. Univerzita Palackého.
- [33] BÁNYIOVÁ, Katarína. *Přestup chemických látek přes kůži*. Brno, 2012. Diplomová práce. Masarykova Univerzita.
- [34] JONSDOTTIR, Fjola, Bergthora S. SNORRADOTTIR, Skuli GUNNARSSON, Elina GEORGSDOTTIR a Sven SIGURDSSON. Transdermal Drug Delivery: Determining Permeation Parameters Using Tape Stripping and Numerical Modeling. *Pharmaceutics* [online]. 2022, **14**(9). ISSN 1999-4923.

- [35] PULSONI, Ilaria, Markus LUBDA, Maurizio AIELLO, Arianna FEDI, Monica MARZAGALLI, Joerg VON HAGEN a Silvia SCAGLIONE. Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. *SLAS Technology* [online]. 2022, **27**(3), 161-171. ISSN 24726303.
- [36] HOANG, Van Chinh, Atefeh SHAFAT, Skaidre JANKOVSKAJA, Vincent G. GOMES a Tautgirdas RUZGAS. Franz cells for facile biosensor evaluation: A case of HRP/SWCNT-based hydrogen peroxide detection via amperometric and wireless modes. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **191**. ISSN 09565663.
- [37] SEBE, István, László ZSIDAI a Romána ZELKÓ. Novel modified vertical diffusion cell for testing of in vitro drug release (IVRT) of topical patches. *HardwareX* [online]. 2022, **11**. ISSN 24680672.
- [38] HUMMER, Joanna, Thomas BIRNGRUBER, Frank SINNER, et al. Optimization of topical formulations using a combination of in vitro methods to quantify the transdermal passive diffusion of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, **620**. ISSN 03785173.
- [39] BIELFELDT, S., F. BONNIER, H.J. BYRNE, et al. Monitoring dermal penetration and permeation kinetics of topical products; the role of Raman microspectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2022, **156**. ISSN 01659936.
- [40] MOCHŤÁKOVÁ, Kateřina. *Transdermální absorpce z emulzí s enkapsulovanými složkami esenciálních olejů*. Zlín, 2022. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati.
- [41] ARCE, Florencio Jr, Narumi ASANO, Gerard Lee SEE, Shoko ITAKURA, Hiroaki TODO a Kenji SUGIBAYASHI. Usefulness of Artificial Membrane, Strat-M®, in the Assessment of Drug Permeation from Complex Vehicles in Finite Dose Conditions. *Pharmaceutics* [online]. 2020, **12**(2). ISSN 1999-4923.
- [42] HAQ, Anika, Benjamin GOODYEAR, Dina AMEEN, Vivek JOSHI a Bozena MICHNIAK-KOHN. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, **547**(1-2), 432-437. ISSN 03785173.
- [43] PONMOZHI, J., S. DHINAKARAN, Zsófia VARGA-MEDVECZKY, Katalin FÓNAGY, Luca Anna BORS, Kristóf IVÁN a Franciska ERDŐ. Development of Skin-On-A-Chip Platforms for Different Utilizations: Factors to Be Considered. *Micromachines* [online]. 2021, **12**(3). ISSN 2072-666X.
- [44] OSTRÓŽKA-CIEŚLIK, Aneta, Sławomir WILCZYŃSKI a Barbara DOLIŃSKA. Hydrogel Formulations for Topical Insulin Application: Preparation, Characterization and In Vitro Permeation across the Strat-M® Membrane. *Polymers* [online]. 2023, **15**(17), 1-16. ISSN 2073-4360.

- [45] SCHLICH, Michele, Umberto M. MUSAZZI, Virginia CAMPANI, et al. Design and development of topical liposomal formulations in a regulatory perspective. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. 2022, **12**(8), 1811-1828. ISSN 2190-393X.
- [46] PRAÇA, Fabíola Silva Garcia, Wanessa Silva Garcia MEDINA, Josimar O. ELOY, Raquel PETRILLI, Patrícia Mazureki CAMPOS, Andreia ASCENSO a Maria Vitória L.B. BENTLEY. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, **111**, 121-132. ISSN 09280987.
- [47] FLATEN, Gøril Eide, Zora PALAC, André ENGESLAND, Jelena FILIPOVIĆ-GRČIĆ, Željka VANIĆ a Nataša ŠKALKO-BASNET. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **75**, 10-24. ISSN 09280987.
- [48] ABD, Eman, Shereen YOUSUF, Michael PASTORE, Krishna TELAPROLU, Yousuf MOHAMMED, Sarika NAMJOSHI, Jeffrey GRICE a Michael ROBERTS. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* [online]. 2016, **8**, 163-176. ISSN 1179-1438.
- [49] HERBIG, Michael E., Pia HOUDEK, Sascha GORISSEN, et al. A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2015, **95**, 99-109. ISSN 09396411.
- [50] SIMON, Konstantin, Gila OBERENDER a Alexander ROLOFF. Continuous removal of single cell layers by tape stripping the stratum corneum – a histological study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2023, **188**, 48-53. ISSN 09396411.
- [51] SØLBERG, Julie B.K., Anna S. QUADE, Lylia DRICI, et al. The Proteome of Hand Eczema Assessed by Tape Stripping. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2023, **143**(8), 1559-1568.e5. ISSN 0022202X.
- [52] SØLBERG, Julie, Stine B. JACOBSEN, Jeppe D. ANDERSEN, et al. The stratum corneum transcriptome in atopic dermatitis can be assessed by tape stripping. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2021, **101**(1), 14-21. ISSN 09231811.
- [53] KAUSHIK, Vasudha a Cornelia M. KECK. Influence of mechanical skin treatment (massage, ultrasound, microdermabrasion, tape stripping and microneedling) on dermal penetration efficacy of chemical compounds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2021, **169**, 29-36. ISSN 09396411.
- [54] BOSCH, Axel, Johannes BOTT, Nils WARFVING a Juergen NOLDE. Investigation on the skin penetration of synthetic amorphous silica (SAS) used in cosmetic products. *Toxicology Letters* [online]. 2023. ISSN 03784274.

- [55] TIPDUANGTA, Pratchaya, Wutipan WATCHARATHIRAWONGS, Peelawas WARITDECHA, Busaban SIRITHUNYALUG, Pimporn LEELAPORNPIPID, Wantida CHAIYANA a Choon Fu GOH. Electrospun cellulose acetate/polyvinylpyrrolidone fiber mats as potential cosmetic under-eye masks for caffeine delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2023, **86**. ISSN 17732247.
- [56] SALAS, Tiffanie, Claire BORDES, Delphine ARQUIER, Laurent CAILLIER, Franck MANDICA a Marie-Alexandrine BOLZINGER. Effect of massage on retinol skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, **642**. ISSN 03785173.
- [57] SALMINEN, Alec T., Kelly J. DAVIS, Robert P. FELTON, et al. Parallel evaluation of alternative skin barrier models and excised human skin for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. 2023, **91**. ISSN 08872333.
- [58] BAYOUMI, Sammar, Aya DAWABA, Zeinab ZALAT a Amal AMMAR. Formulation and evaluation of HPMC topical gel of Ectoine. *Azhar International Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences* [online]. 2022, 2022-04-26, 0-0. ISSN 2735-4601.

8 SEZNAM ZKRATEK

API	aktivní farmaceutická látka
DMSO	dimethylsulfoxid
EO	esenciální oleje
ESI	elektrosprejová ionizace
FDC	Franzova difuzní cela
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
PBS	fosfátový pufr
SAS	amorfní oxid křemičitý
SC	stratum corneum
TDD	transdermální uvolňování léčiv
TEWL	transepidermální ztráta vody
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	ultra vysokouúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialová-viditelná oblast světla

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l

Příloha 2 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l

Příloha 3 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l

Příloha 4 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l

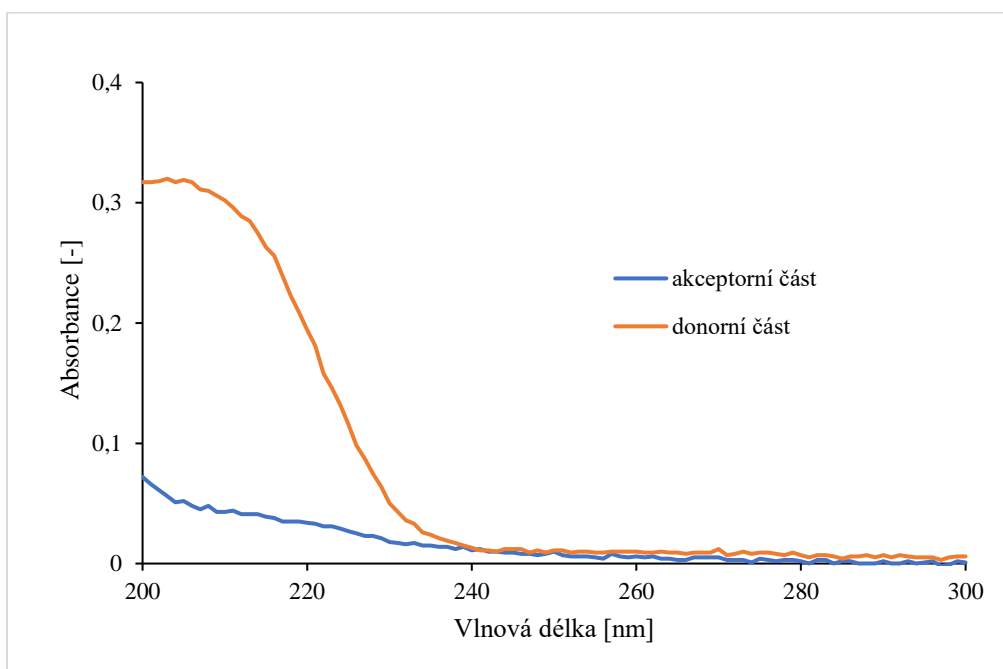
Příloha 5 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l

Příloha 6 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l

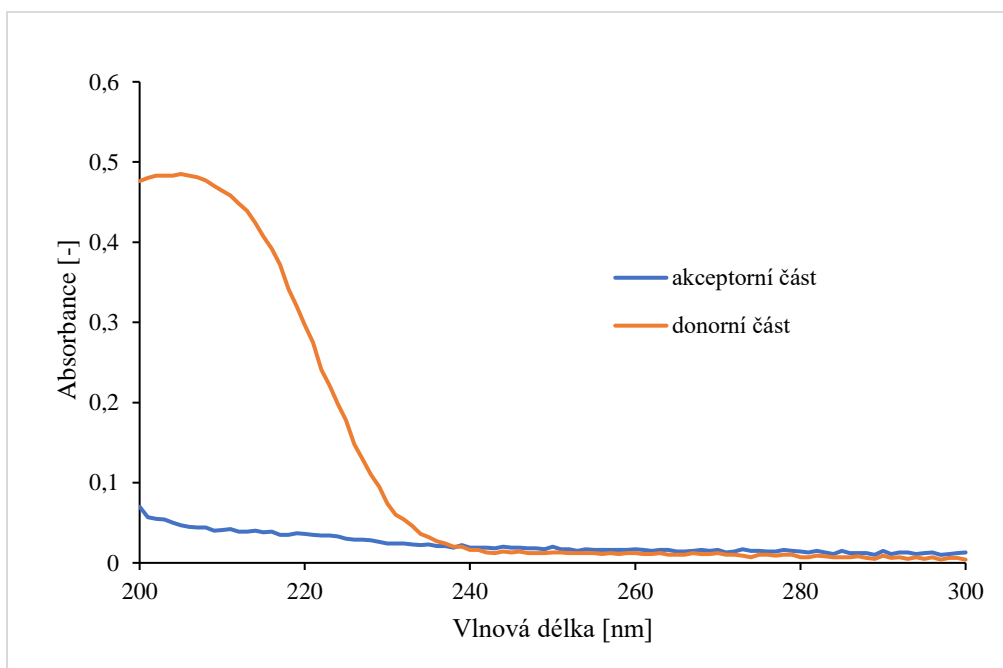
Příloha 7 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l

Příloha 8 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l

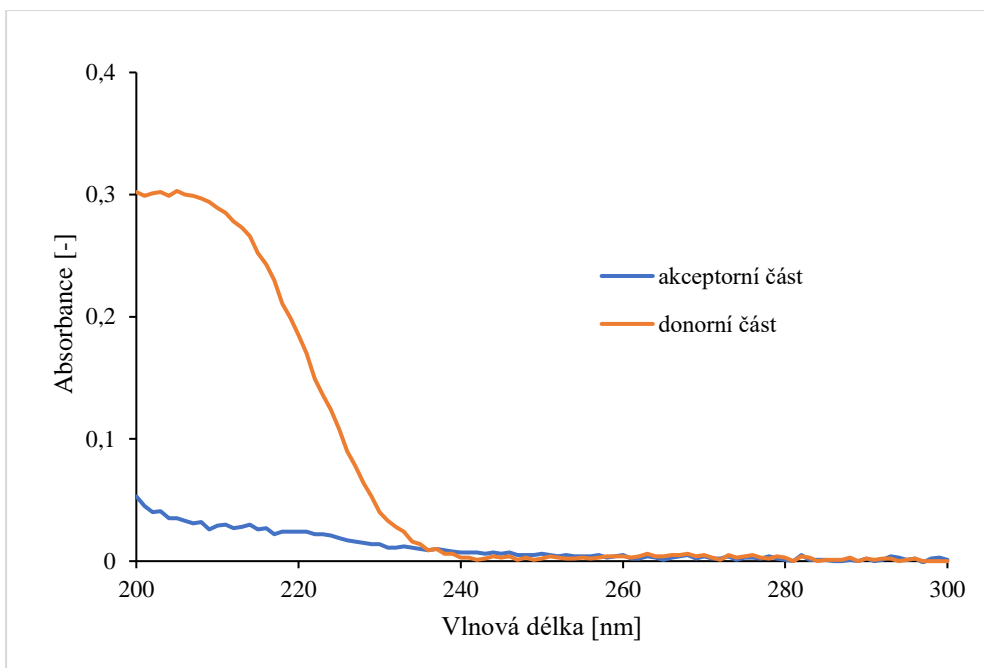
10 PŘÍLOHY



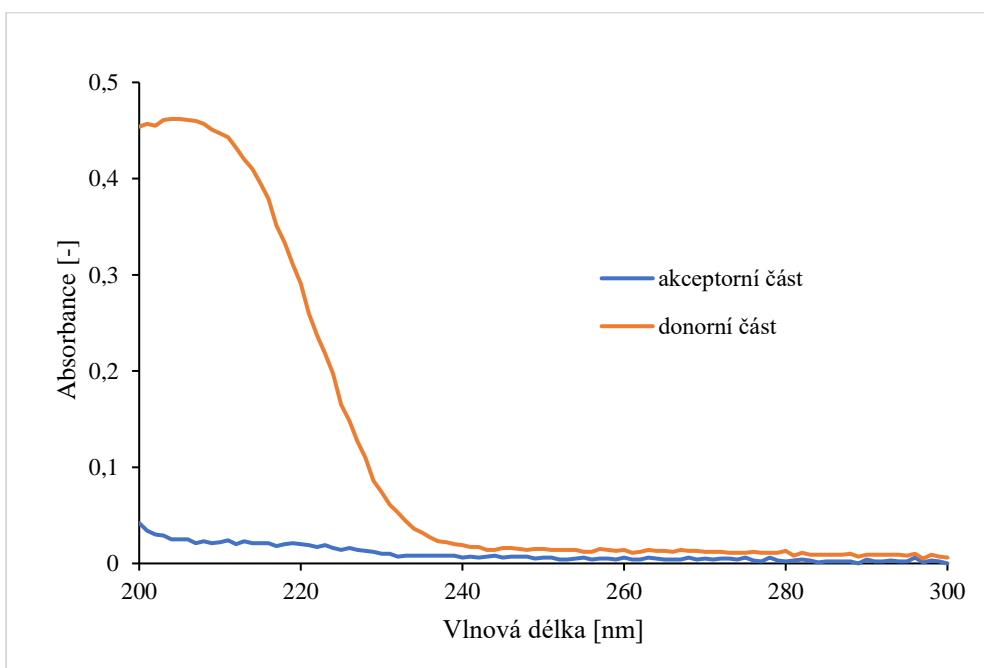
Příloha 1 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l



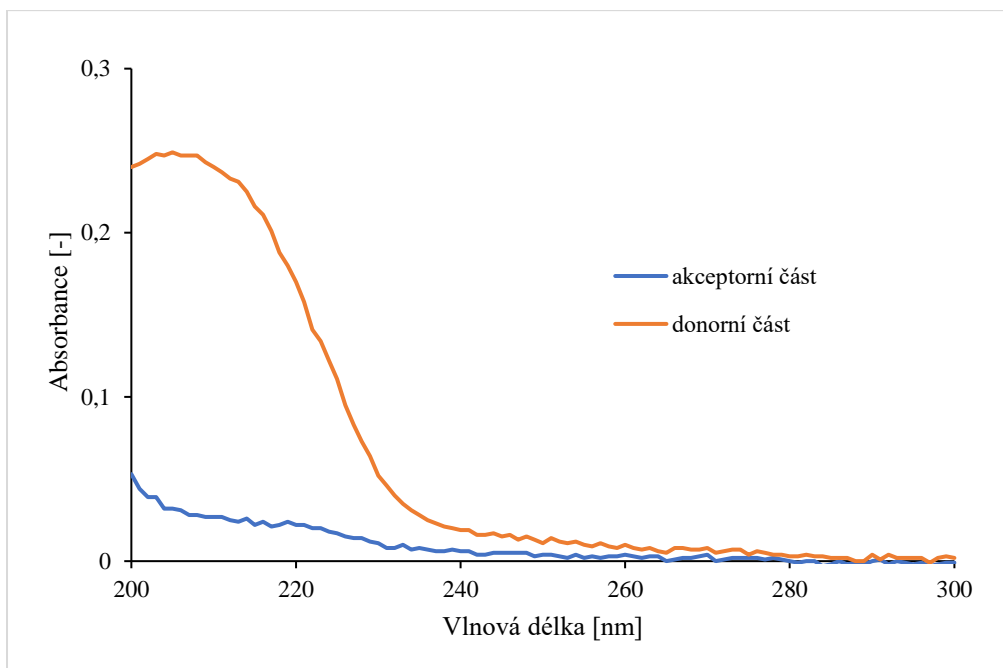
Příloha 2 Naměřená spektra vzorků odebraných po 2 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l



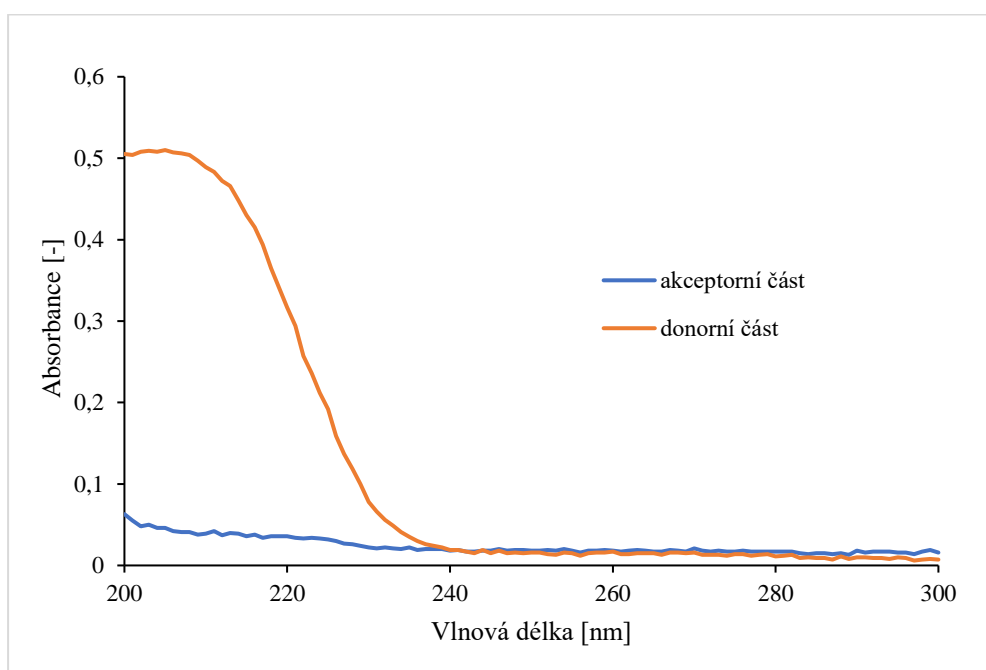
Příloha 3 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l



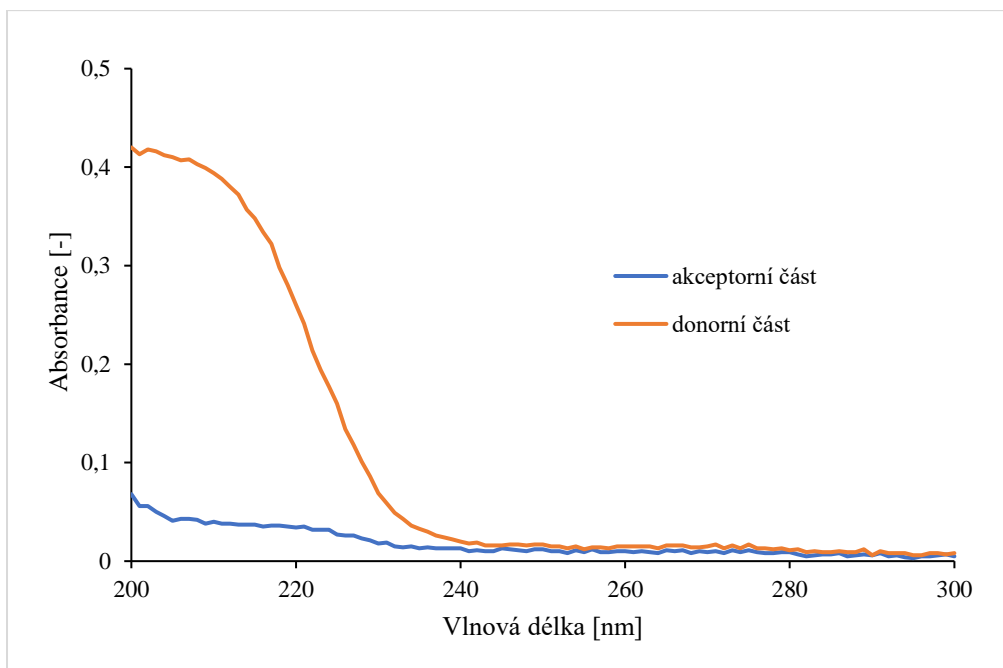
Příloha 4 Naměřená spektra vzorků odebraných po 4 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l



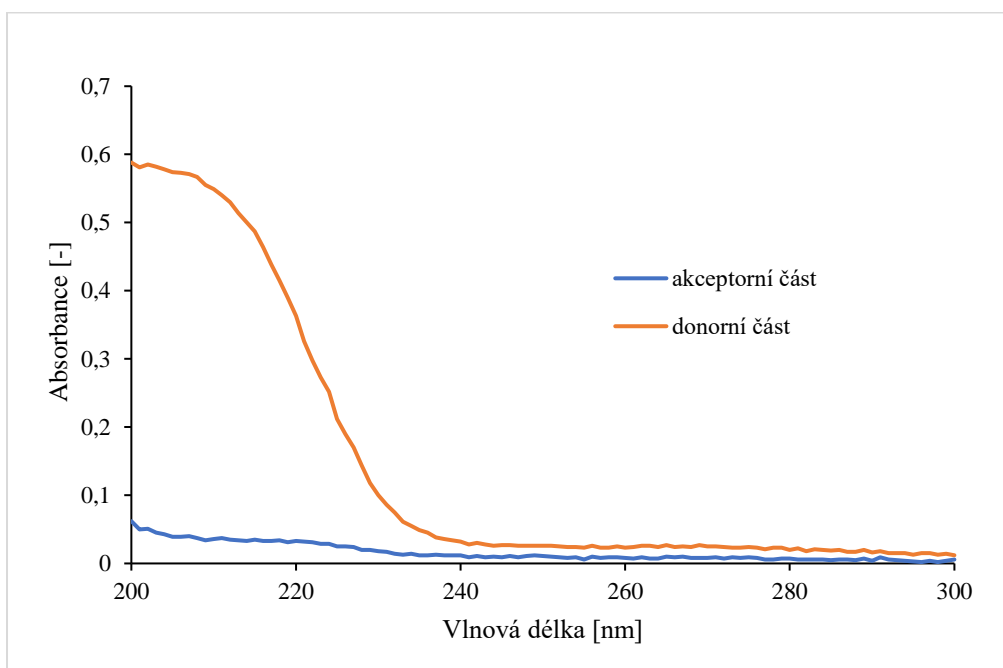
Příloha 5 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l



Příloha 6 Naměřená spektra vzorků odebraných po 6 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l



Příloha 7 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 5 mg/l



Příloha 8 Naměřená spektra vzorků odebraných po 24 hodinách z akceptorní a donorní části cely, která byla naplněna vzorkem ektoinu o koncentraci 10 mg/l