



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

HUMINOVÉ LÁTKY JAKO AKTIVNÍ NEBO POMOCNÉ FARMACEUTICKÉ INGREDIENCE

HUMIC SUBSTANCES AS ACTIVE OR AUXILIARY PHARMACEUTICAL COMPONENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Blahuš

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1624/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Petr Blahuš**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Huminové látky jako aktivní nebo pomocné farmaceutické ingredience

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracovat aktuální literární rešerši na téma využití huminových látek jako aktivní nebo pomocné ingredience ve farmaceutických případně kosmetických kompozicích.
- 2) Na základě literární rešerše navrhnout modelovou farmaceutickou/kosmetickou kompozici s obsahem huminových látek a metodiku její charakterizace.
- 3) Realizovat sérii experimentů za účelem ověření vlivu obsahu huminových látek v kompozici na vybrané aplikačně relevantní materiálové charakteristiky (mechanické vlastnosti, stabilita, kinetika uvolňování aktivních složek).

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Petr Blahuš
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT:

Tato bakalářská práce se zabývá zkoumáním vlivu lignohumátu draselného na rychlost transportu analgetických léčiv přes syntetickou Strat-M® membránu. Pro zkoumání přestupu těchto látek byla použita vertikální difuzní cela, výsledné vzorky byly analyzovány pomocí UV-VIS spektrometru a HPLC. Cílem celé práce bylo optimalizovat proces přípravy difuzních cel, porovnat rychlosti transportu čistých aktivních látek a aktivních látek s přídavkem lignohumátu draselného a porovnat propustnost Strat-M® membrány s modelem prasečí kožní membrány, která byla použita v diplomové práci, na kterou tato studie navazuje. Hlavním zjištěním bylo, že lignohumát výrazně zpomalil transport aktivních látek přes membránu.

ABSTRACT:

This thesis examines the effect of the potassium lignohumate on the transfer speeds of analgesic drugs through the synthetic Strat-M® membrane. In order to examine the transfer of these substances, vertical diffusion cells were used and the final samples were analysed using UV-VIS spectrometer and HPLC. The intention of this thesis was to optimise the process of preparing diffusion cells, to compare the transfer speeds of pure active substances and active substances with the potassium lignohumate, and to compare the permeability of Strat-M® membranes, by using pig skin membranes which were used in the previous study that this thesis continues from. The primary discovery was that the lignohumate slowed down the transfer of active substances through the membrane.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Huminové látky, uvolňování aktivních látek, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, Franzova difuzní cela, Strat-M® membrána

KEYWORDS:

Humic substances, active agent release, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, Franz diffusion cell, Strat-M® membrane

BLAHUŠ, Petr. Huminové látky jako aktivní nebo pomocné farmaceutické ingredience. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131148>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Petr Blahuš

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, PhD. za jeho čas a odborné vedení. Velké díky patří mým rodičům a prarodičům, kteří mě plně podporují ve všech mých zájmech. A v neposlední řadě chci také poděkovat mé přítelkyni, přátelům a všem spolužákům, kteří mi pomáhali při mém studiu.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Huminové látky	9
3.1.1. Charakterizace huminových látek	9
3.1.2. Struktura huminových látek	9
3.1.3. Původ huminových látek	10
3.1.4. Využití huminových látek	10
3.2. Kůže jako klíčový bariérový orgán lidského těla	11
3.2.1. Struktura lidské kůže	11
3.2.2. Kožní transport	12
4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	14
4.1. Využití difúzních cel pro laboratorní testování kožního transportu	14
4.1.1. Franzova difúzní cela	14
4.2. Membrány využívané při testování kožního transportu	15
4.2.1. Lidská kůže	15
4.2.2. Zvířecí kůže	15
4.2.3. Umělá kůže	15
4.2.4. Syntetické membrány	15
4.3. Analgetika jako modelové farmaceuticky aktivní látky absorbované kůží	17
4.3.1. Diklofenak	17
4.3.2. Ketoprofen	18
4.3.3. Ibuprofen	19
4.4. Huminové látky jako aktivní a pomocné farmaceutické ingredience	20
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
5.1. Použité chemikálie	26
5.2. Použité přístroje	26
5.3. Další pomůcky a příslušenství	26
5.4. Příprava roztoků a disperzí použitých v experimentální části práce	27
5.4.1. Příprava zásobního roztoku chloridu sodného	27
5.4.2. Příprava kalibračních roztoků aktivních látek	27
5.4.3. Příprava různých zdrojových lékových forem s obsahem aktivní látky	27

5.5. Postup difúzních experimentů ve Franzových celách	30
5.5.1. Sestavení difúzní aparatury	30
5.5.2. Stanovení obsahu komponent ve vzorcích odebíraných v rámci difúzních experimentů....	32
5.5.3. Měření pomocí HPLC	33
6. VÝSLEDKY A DISKUSE	34
6.1. Difúzní experimenty.....	34
6.1.1. Optimalizace metody.....	34
6.2. Kalibrace metod kvantitativní analýzy	35
6.2.1. UV-VIS spektrometrie	35
6.2.2. HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	37
6.3. Difuze aktivních látek	37
6.3.1. Transport ibuprofenu sodného.....	38
6.3.2. Transport diklofenaku sodného	39
6.3.3. Transport kyselého ibuprofenu.....	39
6.4. Difuze lignohumátu	40
6.4.1. Roztoky lignohumátu draselného	40
6.5. Difuze aktivních látek ze směsi s lignohumátem	41
6.5.1. Transport diklofenaku sodného s lignohumátem.....	42
6.5.2. Transport ibuprofenu sodného s lignohumátem.....	42
6.5.3. Transport kyselého ibuprofenu s lignohumátem	43
7. ZÁVĚR.....	44
8. ZDROJE	45
9. SEZNAM OBRÁZKŮ	51
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
11. SEZNAM PŘÍLOH	53
12. PŘÍLOHY	54

1. ÚVOD

Důležitým odvětvím medicíny je již od nepaměti léčba a utlumení bolestí jakékoliv intenzity a ve všech typech tkáních. Moderní medicína nabízí v tomto směru nespočetné množství jak silných léčiv, používaných při léčbě chronických bolestí, tak komerčních léčiv volně prodejných i bez lékařského předpisu. Právě mezi komerčně dostupná léčiva se řadí látky vybrané pro experimentální studium prezentované v této práci, a to ibuprofen v kyselé i zásadité formě, diklofenak sodný a ketoprofen. Neopioidní analgetika, mezi které se tyto látky řadí, mají velkou účinnost v utlumení běžných bolestí, neméně důležitým aspektem léčby je také rychlost, se kterou dokážou bolest potlačit. Rychlost účinku je ovlivněna rychlostí vstřebávání aktivní látky organismem, a proto právě tato vlastnost je důležitým kvalitativním ukazatelem analgetické substance.

Huminové látky již našly své uplatnění ve spoustě různých průmyslových odvětví jako například v agroprůmyslu, ochraně životního prostředí, papírnictví a stavebnictví. Jejich široké spektrum vlastností, dostupnost a nenáročné uskladnění dělá z těchto látek skvělý cíl pro různé druhy experimentů a studií. V medicíně již své uplatnění také našly, a to hlavně díky svým protizánětlivým a antivirovým účinkům. Avšak jejich pole využití ještě není dostatečně prozkoumáno. V předchozí experimentální studii, realizované na pracovišti vedoucího práce, byla objevena výjimečná schopnost huminových látek, a to urychlit některých vstřebávání léčivých látek přes prasečí kůži.

Cílem této práce bude experimentálně dokázat nebo vyvrátit tuto schopnost urychlit vstřebávání léčivých přípravků s použitím syntetické Strat-M[®] membráně, která byla vyvinuta jako model lidské kůže pro studium transdermální absorpce aktivních farmaceutických ingrediencí. Vybranou aparaturou pro tuto studii jsou vertikální Franzovi difuzní cely, které se využívají pro různé experimenty, zaměřené na studium difúzního transportu. Pro detekci aktivních látek po jejich prostupu membránou byly využity metody UV-VIS spektrometrie a kapalinové chromatografie.

2. CÍL PRÁCE

Tato bakalářská práce si klade několik cílů, a to navrhnout a optimalizovat proceduru experimentálního studia transdermální absorpce aktivních farmaceutických komponent s využitím Franzových difúzních cel a Strat-M® membrán jako syntetického modelu simulujícího bariérové vlastnosti lidské kůže. Dalším cíle práce je posouzení efektu přítomnosti modelových huminových látek (Lignohumátu) na rychlost transdermální penetrace vybraných analgetik.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Huminové látky

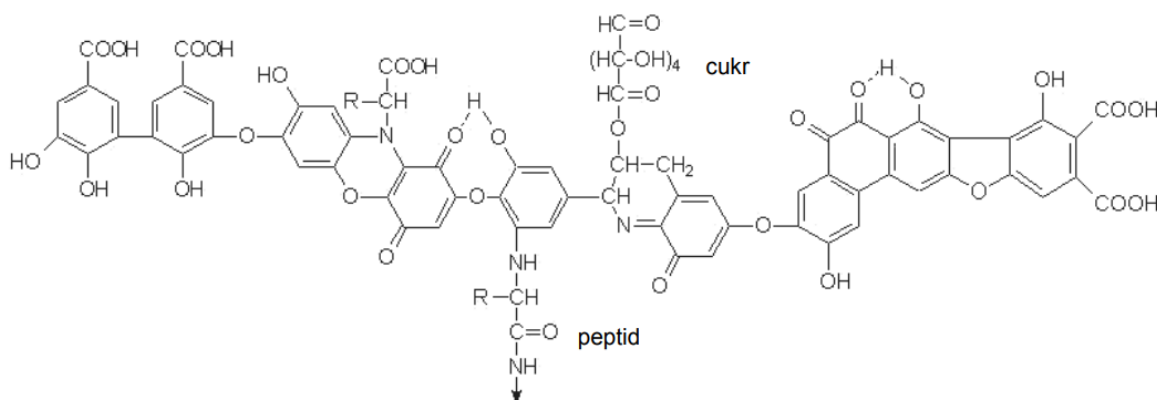
3.1.1. Charakterizace huminových látek

Huminové látky (HS, z angl. *humic substances*) jsou definovány jako přírodní organické sloučeniny, které vznikají chemickým a biologickým rozkladem rostlinných zbytků a organismů jak živočišného, tak i rostlinného původu. Jsou součástí rašelin, sedimentů, hnědého uhlí, zemin a lignitu. Lze je považovat za koloidní chemické látky vzniklé kondenzací anebo polymerací jednodušších složek, spojených přímo nebo pomocí můstkové vazby. Obsah huminových látek se v přírodních matricích pohybuje ve stopových množstvích (jíly, písky), přes jednotky procent (běžné zeminy) až k desítkám procent (lignit, hnědé uhlí). Mimořádně vysoký obsah – 80 % a více vykazuje např. rašelina [1,2].

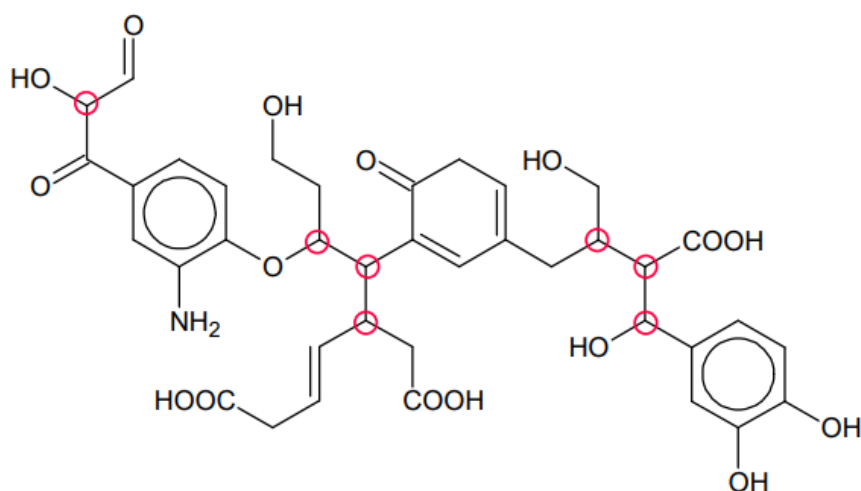
Huminové látky se dají rozdělit podle rozpustnosti v různých médiích na huminové kyseliny (HA, z angl. *humic acids*), fulvinové kyseliny (FA, z angl. *fulvic acids*) a humin. Huminové a fulvinové kyseliny jsou dobře rozpustné v zásaditých roztocích, fulvinové kyseliny jsou vodorozpustné při všech hodnotách pH. Pokud bychom tedy chtěli tyto dvě složky oddělit, vyextrahujeme HA pomocí zředěného zásaditého roztoku a vysrážíme kyselinou, tím HA oddělíme od rozpustných FA. Humin představuje ve vodě nerozpustný zbytek [3].

3.1.2. Struktura huminových látek

Struktura huminových látek není stále zcela objasněna. Je známo, že chemické složení huminové hmoty zahrnuje mnoho aromatických kruhů, které interagují mezi sebou a s alifatickými řetězci, a tím vznikají makromolekuly o různé hmotnosti. Dále huminové látky obsahují velké množství funkčních skupin, přičemž většinu tvoří karboxylové (–COOH) a hydroxylové (–OH) skupiny. HS vznikají kombinací několika reakčních cest a široké škály chemických vazebných systémů, je velmi obtížné definovat přesný vzorec jejich složení [4,5].



Obrázek 1: Hypotetický strukturní vzorec kyseliny huminové dle Stevensona [1]



Obrázek 2: Hypotetický strukturní vzorec kyseliny huminové dle Steelinka [6]

3.1.3. Původ huminových látek

O vzniku huminových látek existuje několik teorií. Na ukázkou budou uvedeny dvě nejčastěji skloňované: degradační (ligninová) a syntetická (polyfenolová) teorie. Je možné, že oba mechanismy pracují zároveň a mohou se mezi sebou prolínat. Degradační technika je pravděpodobnější pro vznik huminových látek ve vodním prostředí, oproti tomu syntetická je relevantní pro vysvětlení výskytu huminových látek v suchozemských ekosystémech [7].

3.1.3.1. Degradační teorie

Základem této teorie je mikrobiální rozklad odumřelého rostlinného materiálu. Vysokomolekulární huminy vznikají z těžko rozložitelných látek, jako je například lignin, melanin a kutin. Proces pokračuje oxidací na huminové kyseliny, dále se transformují na fulvokyseliny, poté na menší molekuly a po velmi dlouhé době by se i tyto menší molekuly měly rozložit na oxid uhličitý a vodu [7].

3.1.3.2. Syntetická teorie

Dalo by se říct, že tato teorie je protichůdná k degradační. Předpokládá se, že se rostlinné tkáně nejprve rozpadají na menší molekuly (karboxylové kyseliny, fenoly), ze kterých enzymaticky katalyzovanou syntézou vznikají nejdříve fulvokyseliny, poté huminové kyseliny a v poslední řadě Humin [7].

3.1.4. Využití huminových látek

Huminové látky mají využití ve spoustě různých odvětví. Velmi důležité jsou v agronomické oblasti, protože významně ovlivňují kvalitu a produktivitu půdy. Díky tomu, že zlepšují fyzikální vlastnosti půdy a zlepšují vlhkostní podmínky, se HS používají jako přísady do hnojiv [8]. Dokonce existují studie, které se zabývají hojivými účinky humátu sodného na listech rostlin nebo schopnosti humátu amonného stimulovat růst rostlin [9].

Co se týče průmyslu, využívají se od stavebnictví až po výrobu papíru. Používají se jako přísady k řízenému tuhnutí betonu, jako barvivo na kůži nebo jako přísady ke zvýšení mechanické pevnosti nezpracované keramiky [10]. Huminové látky se také uplatňují při výrobě a barvení

plastů nebo jako přísady změkčovadel pro PVC [11]. V papírenském průmyslu našly také své místo, například při výrobě listů papíru vedoucích elektrinu nebo papíru s vysokou pevností v tahu a v poslední řadě i v recyklaci [12].

Huminové a fulvinové kyseliny se označují jako přírodní organické koloidy, tvoří ve vodě komplexy kovů. Těto vlastnosti se využívá mimo jiné v ochraně životního prostředí. Tyto kyseliny jsou schopné odstraňovat toxické látky a další znečišťující látky z vody. Byly vyvinuty filtry na bázi humusu, které odstraňují pesticidy a fenol z odpadních vod [13].

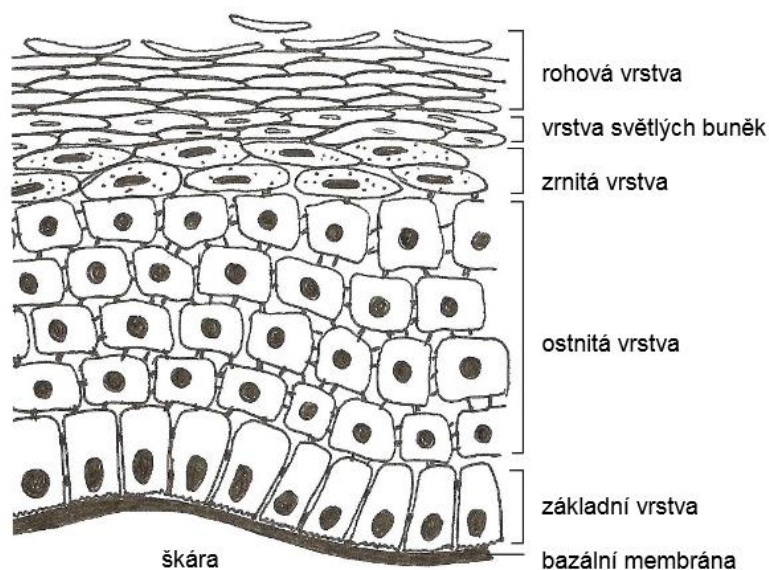
V posledním desetiletí roste zájem o využití huminových materiálů v medicíně a biologii. Hlavním důvodem tohoto zájmu jsou jejich antivirové a protizánětlivé účinky [14]. Díky schopnosti vytvářet chelátové komplexy s těžkými kovy (jako je kadmium), se dají huminové látky využít k eliminaci těžkých kovů z živých organismů [15].

3.2. Kůže jako klíčový bariérový orgán lidského těla

Kůže, jakožto největší orgán lidského těla, představuje u dospělého člověka plochu asi 2 m², což odpovídá 15% celkové tělesné hmotnosti. Poskytuje fyzickou i chemickou bariéru, která plní funkci ochrany před mechanickým poškozením, udržuje homeostázu omezením ztráty vody, elektrolytů a tepla a chrání před mikroorganismy, toxickými látkami a ultrafialovým zářením. Skládá se ze dvou typů tkání různé struktury, složení a embryologického původu a je oddělena bazální membránou. Existují tři základní vrstvy: epidermis, dermis a subkutánní vrstva. Vlasy, nehty, mazové žlázy a potní žlázy (apokrinní a ekrinní) se považují za kožní deriváty nebo přídatky. I když je strukturálně spojitá v celém těle, kůže se mění v tloušťce podle věku jedince a anatomického místa [16,17].

3.2.1. Struktura lidské kůže

Vnější vrstvu kůže tvoří pokožka (Epidermis). Neobsahuje cévy a je tvořena pěti vrstvami odlišných buněk, které jsou znázorněny na obrázku 3. Vrstva, která je nejbliž okolnímu prostředí se nazývá *rohová vrstva*. Tuto část tvoří zhruba 20 vrstev plochých bezjaderných buněk vyplněných keratinem. Skládá se z ceramidů, cholesterolu, volných mastných kyselin a dalších látek. V dolní části vrstvy jsou buňky kompaktní, v horní části dochází k odlupování rohových buněk. Pod rohovou vrstvou se nachází *vrstva světlých buněk*, která je takové tvořena plochými bezjadernými buňkami. Následuje *vrstva zrnitá*, ta obsahuje ploché buňky s plochými jádry. Jsou vyplněné keratohyalinem, což je prekurzor keratinu. *Vrstva ostnitá* je tvořena 4–8 vrstvami polygonálních buněk, které jsou spojeny buněčnými můstky. Tyto buňky se skládají z jadra a ostatních organel. Prostor mezi buňkami je vyplněn tkáňovým mokem. Poslední vrstvou je tzv. *základní vrstva*, je tvořena cylindrickými buňkami, které jsou umístěné na bazální membráně. Tato membrána odděluje pokožku od škáry.



Obrázek 3: Schématické znázornění stavby pokožky [18]

Mezi další typy buněk nacházející se v pokožce patří pigmentové buňky, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky, avšak tyto typy nejsou důležité z hlediska bariérové funkce pokožky.

Důležitým faktorem pro vstup chemických látek do organismu je rozdílný charakter hydrofobní rohové vrstvy a hydrofilní charakter ostatních vrstev pokožky. Rohová vrstva je hlavní bariérou proti průniku látek z prostředí. Pokud by byla poškozena, vrstvy pod ní a škára by díky svému hydrofilnímu charakteru mohly zabránit proniknutí lipofilních látek.

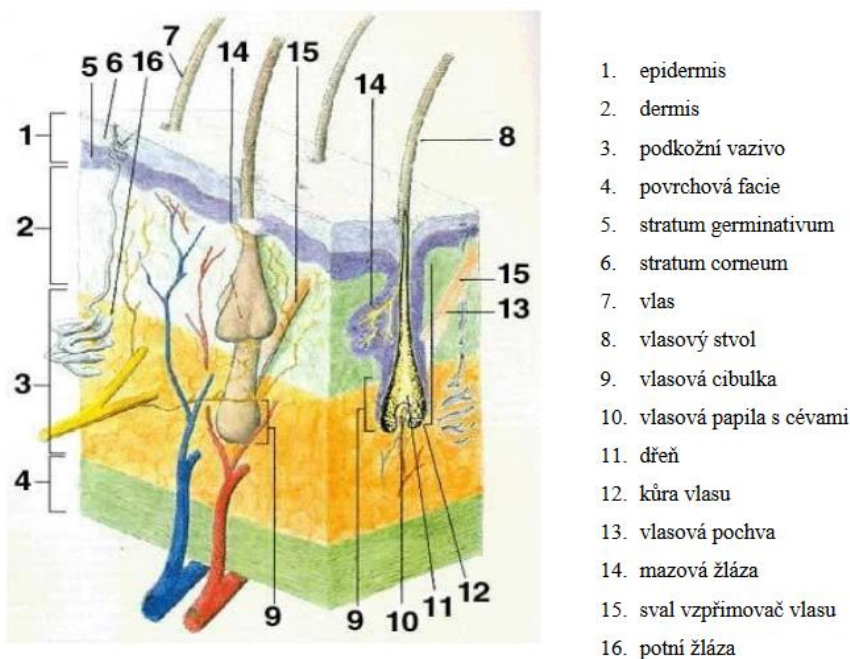
Další vrstva kůže zvaná dermis (škára) je tvořena vazivovými buňkami, vlákny a mezibuněčnou hmotou. Škára obsahuje krevní a lymfatické cévy, nervy a nervová zakončení, sekreční části potních, aromatických a mazových žláz, buňky imunitního systému a cibulky vlasových folikulů.

Subkutánní vrstva (podkožní vazivo) netvoří s dermis ostrou hranici. Podkoží obsahuje tukové buňky (množství je různé), cévní a nervové pleteně a je tvořeno vazivem. Z hlediska průniku chemických látek do organismu je tato část zanedbatelná [18].

3.2.2. Kožní transport

Jednou z klíčových vlastností kůže je řízení transportu látek do organismu, ale i transportu odpadních látek nebo látek regulující teplotu ven z organismu. V této práci je kladen důraz spíše na vstřebávání aktivních látek do organismu. Existuje několik způsobů, jak může látka penetrovat přes kožní bariéru. Transport přes těla buněk rohové vrstvy a následně přes ostatní buněčné vrstvy pokožky se nazývá transcelulární, oproti tomu u intercelulárního transportu prochází látky mezibuněčnými prostory. Přestup látek může probíhat i přes vlasové folikuly nebo mazové a potní žlázy, které jsou znázorněny na obrázku 4.

Nejčastěji využívaná cesta pro přestup přes kůži je intracelulární. Co se týče transportu přes vlasové folikuly a potní a mazové žlázy, některá studie jim nepřipisuje velký význam, jiná označuje vlasové folikuly jako místo, kde se možnost absorpce a penetrace chemických látek zvyšuje [18, 19].



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

Obrázek 4: Anatomická stavba kůže [20]

Permeabilita kůže je závislá na řadě faktorů. Patří mezi ně pohlaví, rozdílná tloušťka kůže na různých částech těla, hustota vlasových folikulů, průtok krve a věk.

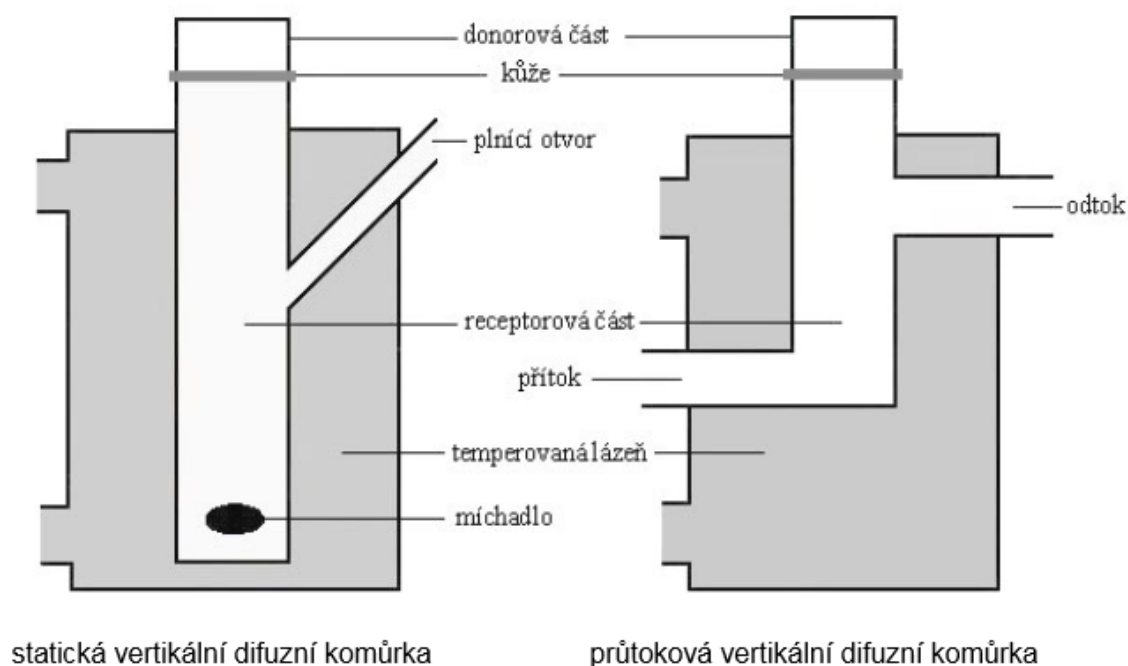
Existují látky, které dokážou narušit ochranou funkci kůže a tím i zvýšit propustnost. Jedná se o činidla, která mají schopnost denaturovat bílkoviny (např. detergenty), nebo rozpouštědla způsobující extrakci lipidů z rohové vrstvy. Zvýšení penetrace můžou způsobit také různá onemocnění, jako alergická kontaktní dermatitida nebo atopický ekzém [19].

4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1. Využití difúzních cel pro laboratorní testování kožního transportu

Difúzní komůrky jsou základním laboratorním zařízením používaným pro testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro*. Jsou klasifikovány podle směru penetrace na horizontální a vertikální, na obrázku 5 je vyobrazeno jejich schéma. Co se týče využití v praxi, převažuje při testování transdermální absorpce využití vertikálních zařízení. Komůrky bývají zhotoveny z inertních materiálů, jako je například sklo nebo teflon. Jsou rozdělené do dvou částí, mezi ně je upevněna membrána, na kterou se nanáší vzorek. Testovaná látka o známém složení a koncentraci je nanášena na přesně stanovenou plochu membrány (0,3–0,5 cm²).

Využívají se dva typy dávkování, tzv. „konečná dávka“ se využívá v případech simulace reálného použití aktivní látky. Množství aplikované látky by mělo být takové, aby dostatečně pokrylo vybranou membránu. Při této metodě dávkování může dojít k částečnému odpaření aplikované látky, stejně jako v reálném životě. Druhým typem dávkování je tzv. „nekonečné dávkování“. Testovaná látka se nanáší v nadbytku a odpaření se eliminuje použitím okluze (uzavřením donorové části) [18].



Obrázek 5: Statická a průtoková difúzní komůrka [18]

4.1.1. Franzova difúzní cela

Franzovy cely jsou široce používanou metodou pro hodnocení prostupu léčiv *in vitro*. Aparatura je vyráběna nejčastěji ze skla, skládá se ze dvou částí – donorové (dárcovské) a akceptorové (přijímací), tato část může být nazývána i receptorová. Léčivý přípravek se vloží do donorové části a v akceptorové části je nachystáno přijímací médium. Tyto dvě části jsou odděleny membránou, což může být vzorek kůže, anebo umělá membrána. Aby byla dosažena

homogenita koncentrace a rovnoměrnost difuze, je přijímací médium mícháno. Míchání má také vliv na rovnoměrné rozložení teploty v přijímací kapalině, ve které by měla být udržována konstantní teplota. Pokud by teplota nebyla konstantní, mohlo by dojít ke zkreslení výsledků, jelikož pohyb částic je závislý na teplotě [21,22].

Mezi výhody Franzovy difúzní cely patří minimální manipulace s tkáněmi, nekontinuální odběr vzorků a nízké množství léčiva potřebné pro analýzu [21].

4.2. Membrány využívané při testování kožního transportu

4.2.1. Lidská kůže

Nejlepší membránou pro testování transdermální absorpce chemických látek *in vitro* je lidská kůže. Vzorky kůže se získávají od živých dárců, kteří prodělali chirurgickou operaci a dali souhlas dárce, nebo z tkáňové banky. Vzorky kůže se nejčastěji odebírají z břicha, hrudníku, boku a zad. Dostupnost tohoto typu membrány je však velmi omezená, a to hlavně z důvodu malého množství dárců. Jedním z cílů této práce bylo experimentálně otestovat alternativu ke kožním membránám, který by byla dostupnější

4.2.2. Zvířecí kůže

Další z alternativ lidské kůže je kůže opičí nebo prasečí. Jsou svou fyziologií, anatomii a chemickým složením velmi podobné kůži lidské. V naší krajinné oblasti je dostupnější kůže prasečí. Pro experimenty je nejvhodnější vzorek kůže z ušního boltce, která je lidské nejvíce podobná, ale využívají se i vzorky z břicha, boků a zad. Kůže ostatních zvířat (např. králíci, potkaní) nejsou vhodné na laboratorní experimenty. Mají rozdílnou fyziologickou a anatomickou strukturu, taky obsahují velký počet vlasových folikulů, které významně zvyšují rychlost penetrace [18].

4.2.3. Umělá kůže

Z důvodu špatné dostupnosti lidské kůže a zvyšujícího se odporu vůči testování na zvířatech, roste snaha o vytvoření umělé kůže. Tato alternativa se vytváří *in vitro* z keratinocytů, vypěstovaných na vhodné podložce. Buňky pěstované ve 2D monovrstvách nejsou schopné napodobit složitost kožního mikroprostředí, proto je vývoj umělé kůže zaměřený spíše na 3D modely. Nicméně uměle vytvořená kůže zatím nedosahuje vlastností lidské a podstatným problémem je i umělé vytvoření kožních derivátů, jako jsou např. potní žlázy a vlasové folikuly, které mají nezanedbatelný vliv na penetraci chemických látek [18,23].

4.2.4. Syntetické membrány

Poslední alternativou jsou synteticky vyráběné membrány. Cíl jejich vývoje je vyřešit některé nedostatky, které vznikají při použití lidské kůže v transdermálních experimentech. Jsou to například špatná reprodukovatelnost z důvodu různé tloušťky kůže dárce, kožní onemocnění, podmínky skladování, složitost přípravy, různá hustota vlasových folikulů, věk dárce a vysoké náklady. Syntetické membrány oproti kůži nabízejí kontrolovanou tloušťku membrány, nízký skladovací prostor i nízké náklady [24].

Membrány, které se využívají pro transdermální penetrace jsou nejčastěji tenké porézní fólie, jako například acetát celulózy nebo polysulfon. Většina uměle vytvořených membrán se snaží napodobovat buď hydrofilní nebo lipofilní dráhu kůže. V kůži člověka se ovšem objevují obě tyto dráhy současně, proto se výzkumy zabývají spojením těchto dvou drah [25].

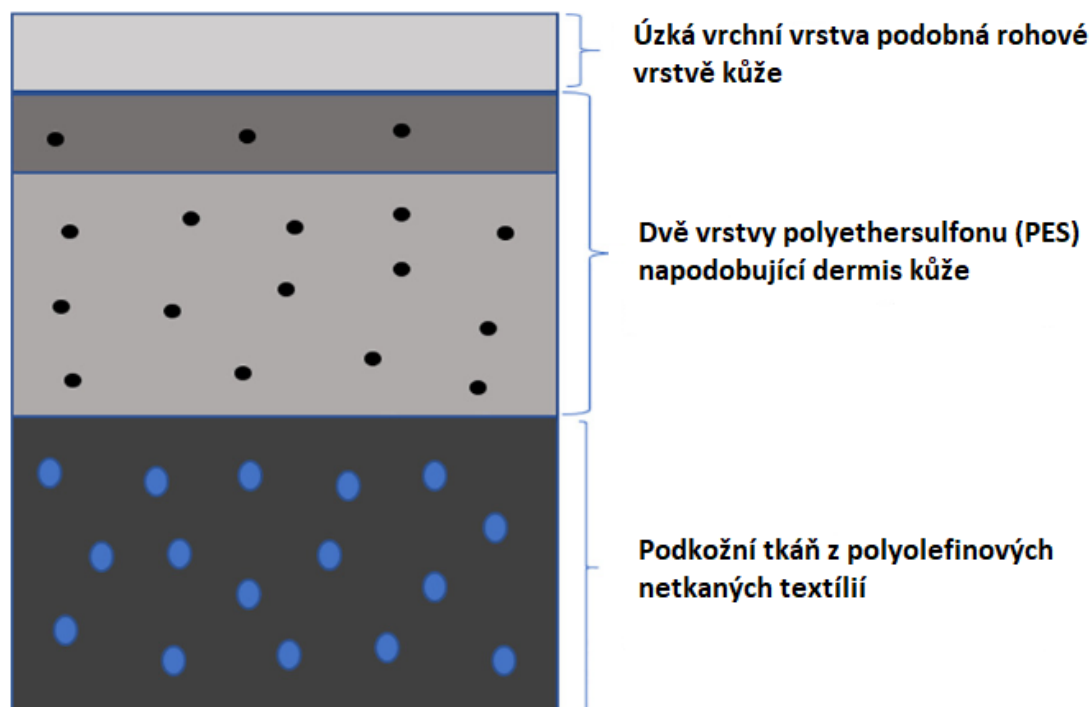
4.2.4.1. Membrány z acetát celulózy

Jde o jednoduchou syntetickou porézní membránu, která byla používána při difuzních studiích v posledních deseti letech. Bariérová funkce této membrány ovšem zcela nekoreluje s vlastnostmi lidské kůže. Kromě toho může interagovat s některými chemickými látkami a může ovlivňovat permeaci léčiva a v důsledku toho vykazovat nesprávnou hodnotu propustnosti [25].

4.2.4.2. Strat-M[®] membrána

Tato membrána je složena z několika vrstev polyether-sulfonu. Byla navržena tak, aby měla podobné strukturní a chemické vlastnosti, jaké se vyskytují v lidské kůži, avšak s vynecháním jakéhokoli biologického chování (absence životaschopných buněk). Je vyrobena tak, že imituje hydrofilní a lipofilní dráhu, čímž se vlastnostmi velmi podobá lidské pokožce [24,25]. Důkaz morfologické podobnosti podává výzkum, který membránu podrobil experimentu za využití skenovací a transmisní elektronové mikroskopie. Strat-M[®] membrána má podobnou tloušťku, velikost pórů, průměr a povrchovou morfologii jako lidská kůže [26].

Výsledky některých studií naznačují, že membrána Strat-M[®] je ideální náhradou kůže pro pilotní studie difuzních testů. Také vykazuje lepší výsledky, než konkurenční membrány z acetát celulózy [25].



Obrázek 6: Vícevrstvá struktura Strat-M[®] membrány [24]

4.3. Analgetika jako modelové farmaceuticky aktivní látky absorbované kůží

Analgetika jsou látky, které částečně nebo úplně tlumí bolest. Dělí se podle toho, jak silnou bolest jsou schopné potlačit a podle působení na organismus. Jejich využití sahá od běžného nekontrolovaného užívání v domácnostech až po léčbu chronických bolestí v nemocnicích.

Prvním typem jsou neopioidní analgetika, patří mezi ně antipyretika nebo nesteroidní antiflogistika. Účinnost těchto léků závisí na inhibici enzymů syntetizujících prostaglandiny. Jsou vhodná například proti zánětlivé bolesti, bolesti kostí a proti některým typům migrén. Jednou z vlastností této skupiny je tzv. stropní efekt, pokud je dávka analgetika zvýšena nad terapeutickou dávkou, nedochází ke zvýšení účinnosti, ale zvyšuje se riziko vedlejších účinků.

Skupina opioidních analgetik se využívá k léčbě velmi silných bolestí. Primárním místem účinku je pro tyto léky centrální nervová soustava. Velkou nevýhodou těchto analgetik je to, že při častém a nekontrolovaném užívání dochází k vytvoření závislosti. Nejznámějším zástupcem této skupiny je morfin, který je často používán v léčbě chronické bolesti [27,28,29].

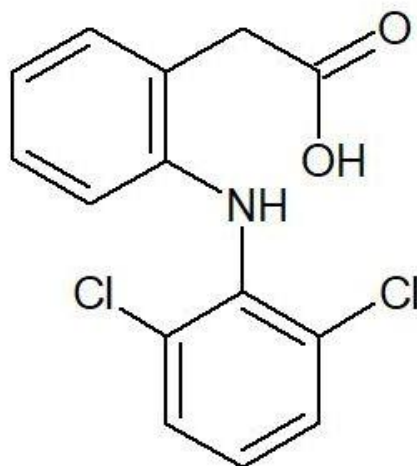
V této bakalářské práci se budeme dále zabývat neopioidními analgetiky, která jsou běžně komerčně dostupná a jsou využívány v řadě různých léčiv k topické aplikaci.

4.3.1. Diklofenak

Diklofenak je běžně používané nesteroidní protizánětlivé léčivo, které má analgetické, protizánětlivé a antipyretické vlastnosti. Bylo prokázáno, že je účinné při léčbě různých akutních a chronických bolestí a zánětlivých stavů. Při perorálním podání je absorpce diklofenaku rychlá a úplná. Další vlastností je, že se značně váže na plazmatický albumin.

Jeho účinnost je dána inhibicí prostaglandinů, přesněji inhibicí enzymů cyklooxygenázy-1 (COX-1) a cyklooxygenázy-2 (COX-2), čímž snižuje syntézu prostaglandinů, prostacyklinů a tromboxanových produktů [30,31].

V současné době je k dispozici několik typů diklofenaku, mezi které patří třeba sodná sůl diklofenaku (Voltaren) nebo transdermální náplast s diklofenakem epolaminem (Flector). Gel Voltaren je používán od poloviny 20. let 20. století k úlevě od bolesti artrózy v rukou a kolenou. Další diklofenakový gel Solaraze, je schválen pro léčbu lézí v důsledku aktinických keratóz (kožních nádorů). Flector, diklofenaková epolaminová náplast, poskytuje úlevu od akutní bolesti způsobené drobným namožením, podvrtnutím nebo modřinami [30].

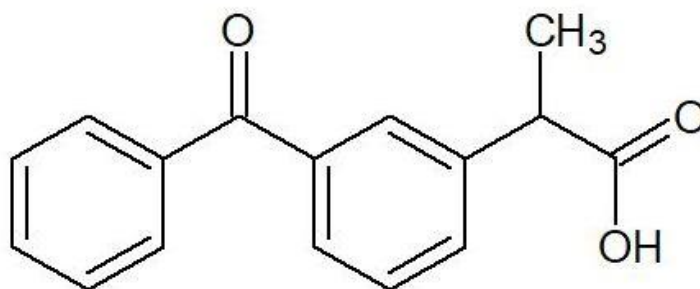


Obrázek 7: Strukturální vzorec diklofenaku

Diklofenak je léčivo s poměrně krátkým biologickým poločasem (1,2–1,8 h), proto je nutné opakované dávkování, nejčastěji 3× denně. Pokud dochází k dlouhodobému užívání konvenčních lékových forem, diklofenak vykazuje tendenci k hromadění se v organismu, což může mít za následek velmi vážné nežádoucí účinky na kardiovaskulární, gastrointestinální a centrální nervový systém [32].

4.3.2. Ketoprofen

Ketoprofen je nesteroidní protizánětlivý lék s mírně kyselým charakterem. Jde o lehce zbarvený prášek bez chuti a zápachu. Je rozpustný v organických rozpouštědlech, jako jsou aceton, chloroform, methanol, ether atd. Musí být chráněn před přímým světlem a vlhkostí, jinak je to látka stabilní při pokojové teplotě. Toto analgetické léčivo se rychle vstřebává bez ohledu na způsob podání. Nejvyšší účinnosti dosahuje v první hodině po podání (platí pro orální, rektální a parenterální podání) anebo po šesti hodinách (subkutánní podání) [33,34].



Obrázek 8: Strukturální vzorec ketoprofenu

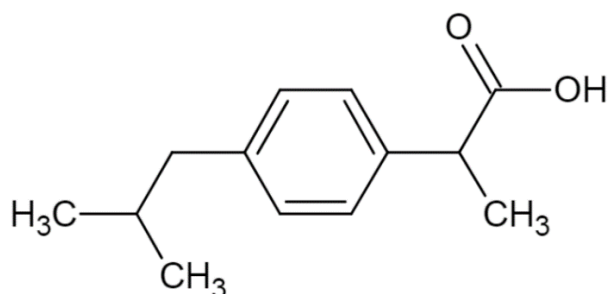
Ketoprofen je jedním z nejsilnějších inhibitorů cyklooxygenázy. Kromě účinků na cyklooxygenázu inhibuje ketoprofen lipoxygenázovou dráhu kyseliny arachidonové. Tato dráha produkuje necyklizované monohydroxykyseliny a leukotrieny. Klinický význam inhibice lipoxygenázy zatím nebyl objasněn. Jedna z možných teorií je, že inhibitory lipoxygenázy mohou zmírnit buněčně zprostředkovaný zánět, a tak zpomalit progresi destrukce tkáně v zanícených kloubech.

Tento lék má jednoduchý metabolismus, krátký biologický poločas a nehromadí se při větším dávkování v organismu. Díky těmto vlastnostem má ketoprofen rychlý nástup účinku, flexibilní dávkování a velmi dobrý profil tolerance. Dvě nezávislé studie potvrdily terapeutickou rovnocennost ketoprofenu s aspirinem, indomethacinem a ibuprofenem u revmatoidní artritidy a s aspirinem u osteoartritidy. V současné době je na celém světě prodáván v různých formách: injekční roztoky, čípky a topický gel.

Z některých studií, které prováděly testy na různých zvířecích modelech (potkani, myši, králíci, morčata a holubi) vyplývá, že ketoprofen vykazuje silnou aktivitu proti akutnímu a subakutnímu zánětu. V těchto studiích bylo prokázáno, že ketoprofen je při snižování zánětu 20krát účinnější než ibuprofen, 80krát účinnější než fenylobutazon a 160krát účinnější než aspirin [35].

4.3.3. Ibuprofen

Ibuprofen je jedním z nejpoužívanějších nesteroidních protizánětlivých léčiv v ČR [36]. Jedná se o bílý krystalický prášek, který je nerozpustný ve vodě, a to díky svým hydrofobním a vysoce soudržným vlastnostem. Dá se snadno rozpustit v acetonu, etheru, methanolu a v dichlormethanu [37, 38]. Může také tvořit bezbarvé jehlicovité krystaly, které komplikují výrobu ibuprofenových tablet. Ibuprofen je díky svým silným analgetickým, antipyretickým a protizánětlivým účinkům používán k úlevě od bolesti, proti horečce i příznakům revmatoidní artritidy a osteoartrózy, a to jak orálně, tak lokálně [38].



Obrázek 9: Strukturální vzorec ibuprofenu

Stejně jako diklofenak se ibuprofen váže na plazmatický albumin a také je jeho účinnost závislá na inhibici syntézy prostaglandinů. Z organismu se vylučuje pomocí moči, větší část před odbouráním projde biotransformací, ale menší procento se vylučuje beze změny. U lidí v konečném stádiu onemocnění ledvin může docházet k hromadění léčiva v těle [39].

Ibuprofen se řadí mezi chirální sloučeniny. Jeho S-(+)-enantiomer je farmakologicky aktivnější. Uvádí se, že S-(+)-ibuprofen je asi 160krát účinnější než R-(-)-ibuprofen při inhibici syntézy prostaglandinů in vitro [39].

Všechna analgetická léčiva se čím dál více nacházejí v různých složkách životního prostředí. Nejčastěji se nacházejí v půdě a ve vodním prostředí. Je to právě z důvodu vylučování léčiv do odpadních vod a následné nedokonalé odbourávání v čističkách odpadních vod. Ze splaškové vody se podaří odstranit pouze 60 až 90 % léčiv [36].

4.4. Huminové látky jako aktivní a pomocné farmaceutické ingredience

Problematikou huminových látek se již zabývalo velké množství různých studií. Poznatky z těchto vědeckých prací byly použity pro vylepšení vlastností léčiv, jako například sylimarinu, ketokonatolu, karmabazepinu, furosemidu a dalších. Z rešerše vyplývá, že často používaným zdrojem huminových látek je shilajit, který se vyskytuje zejména v pohoří Himálají [40]. Pro analýzu vybraných vzorků byly nejčastěji využívány analytické metody, jako diferenciální skenovací analýza, rentgenová difrakce nebo infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací. Velká většina studií se výsledky shodují na tom, že huminové látky, zvláště fulvinové kyseliny, zlepšily rozpustnost vybraných léčiv. Také bylo prokázáno zlepšení kyselých puřrovacích a mukoadhezních vlastností léčiv. Na obrázcích 10-14 jsou zpracovány tabulky se stručným popisem cíle, průběhu a výsledku vědeckých prací zabývajících se huminovými látkami.

V diplomové práci, na kterou tato bakalářská práce navazuje, byla objevena výjimečná schopnost huminových látek, a to urychlit vstřebávání některých léčivých analgetických přípravků přes prasečí kůži [41]. Pokud by se tyto výsledky potvrdily, mohli by se huminové látky využívat jako enhancery transdermálního transportu různých léčiv.

Aktivní látka	Silymarin (extrakt z Ostropestřce) s kyselinou fulvinovou	Ketokonazol s kyselinou fulvinovou	Andrografolit s kyselinou huminovou
Z jakého zdroje je huminová látka		Novozélandská rašelina	
Cíl práce	Práce se zabývá problematikou zlepšení rozpustnosti a pronikání léku pomocí přídatku fulvinové kyseliny ve srovnání s čistým lékem.	Porovnání huminové a fulvinové látky z hlediska zvýšení rozpustnosti nerozpustných (nebo málo rozpustných) látek, které se využívají v medicíně.	Zvýšení rozpustnosti a hepatoprotektivní účinnost (účinnost na jaterní buňky).
Syntéza komplexů léčiva s FA nebo HA	Fyzikální směs: Fyzikální směs SILY a FA byla připravena rozemletím vhodného množství směsi po dobu 60 minut v čistém suchém skleněném tloučku a výsledná hmota byla protlačena sítím o velikosti 100 mesh, čímž byl získán prášek stejnoměrné velikosti. Hnětení: Odvážené množství SILY a FA a trituruje se po dobu 15 minut. Během procesu byl obsah vody v pastě empiricky upraven ethanolem a triturován pro udržení konzistence pasty. Triturace pokračovala, dokud se produkt nezačal sušit na stěnách malty. Produkt byl dále sušen v horké vzduchové peci při 60 ° C po dobu 15 minut, v prášku, prošel sítím o velikosti 100 mesh.	Byl zvolen optimální poměr vzorku KTZ a FA, byl připraven za magnetického míchání při 200 ot / min, do roztoku bylo přidáno vypočítané množství léčiva a ponecháno po dobu 48 hodin. Výsledný roztok byl zmrazen po dobu 24 hodin a poté lyofilizován. Jako kryoprotektant byl přidán roztok sacharózy (2% hm./obj.). Výsledná hmota byla poté rozprášena ve skleněné třecí misce a protlačena přes síto o velikosti 100 mesh, čímž byl získán jemný prášek stejné velikosti.	Komplexy AGP s HA byly připraveny v hmotnostním poměru 1: 1, 1: 2 a 2: 1 (HA: AGP) odpařením rozpouštědla. AGP byl rozpuštěn v methanolu, ve kterém byl roztok HA přidán. Byly dobře promíchány a podrobeny odpařování ve vakuu pomocí rotační odparky při 70 °C po dobu 20 minut. Získaný komplex byl uložen ve vzduchotěsné nádobě a použitý pro další studium.
Jaké metody byly využity při určování rozpustnosti	Stanovení rozpustnosti ve vodě – tvorba komplexů značně zvýšila rozpustnost silymarinu ve vodě, DSC – silymarin může být v amorfním stavu v binárních systémech, FT-IR – Bylo zjištěno, že disperze je lepší v PM (fyzikální směs) než KD (hnětení) Studie disoluce – zvýšení rychlosti rozpouštění PM ve srovnání s KD je vyšší.	pomocí DSC analýzy a Rentgenová difrakce – XRD byla prokázána krystalita vzorků a ztrátu krystalického charakteru v komplexu, Fourierovy transformační infračervené spektroskopie .	Pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie a Fourierovy transformační infračervené spektroskopie se dokázala interakce HA s AGP, rentgenové difrakce prokázala, že léčivo má krystalickou povahu, HA amorfní, a komplex vykazoval snížení krystalinity -> to může ovlivnit rozpustnost. Skenovací elektronové mikroskopie.
Závěr	Bylo prokázáno několikanásobné zvětšení rozpustnosti a pronikání léčiva v kombinaci s fulvinovou kyselinou.	Kyselina fulvinová má lepší výsledky v rozpustnosti než kyselina huminová. Výhodou FA je i její vedlejší pozitivní účinky. Jeden z problémů byl, že na malý vzorek léčiva byla velká spotřeba FA z důvodu přítomnosti velkého množství minerálů.	Kyselina huminová zlepšila rozpustnost, lék měl i lepší hepatoprotekci proti jaterní toxicitě než běžný lék.

Obrázek 10: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [42,43,44]

Aktivní látka	Karbamazepin v porovnání s kyselinou huminovou a fulvinovou	Itrakonazol s HA, FA, beta-CD, HP-P-CD a kofeinem	Karbamazepin s kyselinou fulvinovou
Z jakého zdroje je huminová látka	Shilajit	Shilajit	Shilajit
Cíl práce	Srovnání HA a FA jako komplexotvorná činidla a zvýšení dostupnosti léčiva do mozku.	Hledání nejideálnějšího komplexu, který zlepší vstřebávání léčiva.	Studování vlastností komplexu léčivo + FA.
Syntéza komplexů léčiva s FA nebo HA	Komplexy karbamazepinu byly připraveny s FA a MA, extrahovány ze shilajitu za použití různých technik ve dvou různých molárních poměrech 1:1 a 1:2. Výsledná hmota byla rozprášena ve skleněné třecí misce a tloučku a prošla sítím o velikosti 100 mesh, čímž byl získán jemný prášek s částicemi o stejné velikosti.	Požadované stechiometrické (1:1, 1:2 a 1:3) množství léčiva bylo přidáno do vodného roztoku komplexotvorného činidla a bylo mícháno na magnetickém míchadle po dobu 24 hodin. Jako kryoprotektant byl přidán roztok sacharózy (2%, hm./obj.). Výsledné roztoky byly zmrazeny při -70 °C v hlubokém mrazáku. Ten byl poté lyofilizován, čímž byla získána sušená hmota, která byla dále rozprášena ve skleněné třecí misce a tloučku a protlačena sítím o velikosti 100 mesh, čímž byl získán jemný prášek stejné velikosti. Vzorokly pak byly přeneseny do vakuových exsikátorů a sušeny na sílikagelu ve vakuu po dobu alespoň 24 hodin.	Komplexy CBZ byly připraveny s FA extrahovanými ze shilajitu použitím různých technik (fyzikální mísení, lyofilizace, odpařování rozpouštědla, hnětení) ve dvou různých molárních poměrech 1:1 a 1:2. Výsledná hmota byla rozprášena ve skleněné třecí misce s tloučkem a protlačena sítím o velikosti ok 100 mesh, aby se získal jemný prášek o stejné velikosti.
Jaké metody byly využity při určování rozpustnosti	Pomocí DSC analýzy, Fourierovy transformační infračervené spektroskopie se dokázala interakce mezi léčivem a komplexotvorným činidlem, práškové rentgenové difrakce dokázala, že léčivo má krystalickou povahu, FA a HA amorfni, hmotnostní spektroskopie.	DSC Itz mohl ztratit svůj krystalický charakter, je přítomen v amorfni formě, Rentgenová difrakce -> u komplexů s kofeinem a HP-P-CD byla prokázána krystalická povaha, zbytek komplexů byl takřka amorfni povahy, Protonová nukleární magnetická rezonance (1H NMR), Hmotnostní spektroskopie, Stanovení účinnosti komplexace (nevhodná metoda podle autora).	DSC a Fourierovy transformační infračervené spektroskopie dokázala vznik komplexů, Rentgenové výkonové difraktogramy -> všechny komplexy vykazovaly amorfni vlastnosti, Konformační analýza pomocí výpočetní metody -> dokazuje zvýšenou stabilitu komplexu FA a CBZ (vyšší než samotné CBZ).
Závěr	Komplexace CBZ s FA a HA indikuje její příznivý účinek na zvýšení propustnosti léčiva do mozku, to znamená, že se může snížit množství léku a tím se snížení výskytu nežádoucích účinků. Komplex CBZ – HA (1:2) se v různých studiích in vitro a in vivo objevil jako nejlépe fungující komplex.	FA s léčivem byla zhodnocena jako nejideálnější komplex. Zvýšila rozpustnost léčiva a také má kyselé pufrovací a mukoadhezivní vlastnosti, což silně podporuje její použití ve fyziologicky proměnném pH prostředí vaginální dutiny.	Analýzy potvrdily tvorbu komplexů a jako optimalizované metody označily hnětení a lyofilizaci. Profil uvolňování 1:2 lyofilizačního komplexu byl nejlepší. Ex vivo permeační studie hnětení a lyofilizace prokázala dobrou farmakodynamickou odpověď. Komplexace CBZ s FA by tedy mohla být zvolena jako slibný nástroj pro orální podávání léků a musí být klinicky vyhodnocena.

Obrázek 11: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [45,46,47]

Aktivní látka	Furosemid s HA	Furosemid s FA	Ketokonazol s FA
Z jakého zdroje je huminová látka	Shilajit	Shilajit	Shilajit
Cíl práce	Tato studie zkoumala účinky komplexace furosemidu s kyselinou huminovou na rychlost uvolňování a in vivo diuretický účinek na samce potkanů.	Cílem této práce bylo komplexovat furosemid (FSM) s kyselinou fulvovou extrahovanou z shilajitu a lepší pochopení komplexačního chování. Byl zkoumán vliv FA na rozpustnost ve vodě, rychlost rozpouštění a permeabilitu FSM.	Cílem výzkumné práce bylo prozkoumat potenciál kyseliny fulvové extrahované ze shilajitu jako látky zvyšující biologickou dostupnost.
Syntéza komplexů léčiva s FA nebo HA	komplexy byly připraveny pomocí lyofilizace a pomocí odpařování rozpouštědla.	Komplexy FSM s FA byly připraveny v molárních poměrech 1:1 a 1:2 pomocí těchto metod: fyzikální míšení, vymrazování, odpařování rozpouštědla.	Komplexy kyseliny fulvové s ketokonazolem byly připraveny v molárním poměru 1:0,5 a 1:1 odpařením rozpouštědla, sušením rozprašováním a fyzikálními směšovacími metodami.
Jaké metody byly využity při určování rozpustnosti	Pevné komplexy byly hodnoceny diferenční skenovací kalorimetrií, infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací a skenovací elektronovou mikroskopií.	Spektroskopie FTIR – poměr 1:2 má lepší schopnost tvorby komplexů, DSC – komplexy připravené odpařením rozpouštědla a technikou vymrazování v molárních poměrech 1:1 a 1:2, mají silnou indikaci tvorby komplexu s FA. Rentgenové práškové difrakto grafy – komplex FSM-FA v molárním poměru 1:2 připravený technikou lyofilizace ukázal úplnou absenci píků FSM -> došlo ke složité formaci. SEM – Lyofilizovaný FSM-FA (1:2) komplex se jeví jako homogenní amorfni hmota, což prokazuje úplnou tvorbu komplexu.	Rentgenový difraktogram – difraktogram komplexu sušeného rozprašováním a komplexu odpařeného rozpouštědlem ukazuje nepřítomnost píků, které svědčí o tvorbě komplexace mezi KET a kyselinou fulvovou. DSC – termogram bez píků u směsí připravených odpařením rozpouštědla a metodami sušení rozprašováním. To naznačuje vytvoření komplexu mezi KET s kyselinou fulvovou.
Závěr	rychlost uvolňování ukázala, že k tvorbě komplexu došlo jak při odpařování rozpouštědla, tak při lyofilizaci. Maximální komplex byl vytvořen v případě lyofilizace (lyofilizace 1:2). Rozpouštění samotného furosemidu bylo velmi pomalé, což bylo způsobeno nerozpustností furosemidu ve vodě. Pouze 1% uvolnění bylo získáno za 1 h ve srovnání s uvolňováním 64,1% z 1:2 lyofilizovaného komplexu systému furosemid-lidská kyselina.	Komplexní tvorba FSM s FA velmi zlepšila jeho rozpustnost ve vodě. Maximální rozpustnost ve vodě byla zvýšena 23krát v případě lyofilizovaného komplexu 1:2. Studie ukazuje, že když je FSM komplexován s FA, dochází k významnému zvýšení jeho rychlosti rozpouštění.	Komplexy připravené odpařením rozpouštědla a metodou sušení rozprašováním vykazovaly výrazné zvýšení v rychlosti rozpouštění KET. Dále komplexy sušené rozprašováním vykazovaly lepší rychlost rozpouštění ve srovnání s komplexy odpařenými rozpouštědlem, což lze připsat amorfni povaze komplexu sušeného rozprašováním.

Obrázek 12: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [48,49,50]

Aktivní látka	Celecoxib s HA a FA	Itrakonazol a FA
Z jakého zdroje je huminová látka	Shilajit	Shilajit
Cíl práce	Cílem studie bylo porovnat komplexační schopnost celecoxibu s různými komplexotvornými činidly.	Tato studie zkoumá farmaceutický potenciál přírodní organické hmoty (kyselina fulvová) pro trvalé uvolňování, pufovací kapacitu kyseliny a mukoadhezi při vaginálním dodávání léčiva.
Syntéza komplexů léčiva s FA nebo HA	Lyofilizace - komplexy v molárním poměru 1: 1 množství léčiva byly přidány do vodných roztoků komplexačních činidel a byly míchány na magnetickém míchadle po dobu 24 hodin. Jako kryoprotektant byl přidán roztok sacharózy (2% m / v). Výsledné roztoky byly zmrazeny při (-70 ° C) v hlubokém mrazáku přes noc. Ta byla poté lyofilizována. Výsledná hmota byla poté rozprášena ve skleněné třecí misce a tloučku a protlačena sítím o velikosti ok 100 mesh pro získání jemného prášku stejné velikosti. Vzorky byly poté přeneseny do vakuového exsikátoru a sušeny přes silikagel ve vakuu po dobu nejméně 24 hodin.	Molární poměry léčiva k komplexotvornému činidlu byly 1: 1 a 1: 2 na základě výsledků experimentů s fázovou rozpustností. Vypočtené množství komplexu bylo připraveno rozpuštěním Itz s HCl s použitím ethanolu a poté nalitím tohoto roztoku do vodného roztoku kyseliny fulvové. Roztok byl potom míchán za použití magnetického míchadla po dobu 48 hodin a potom sušen pomocí arotárního odpařovače. Výsledná hmota byla rozprášena ve skleněné třecí misce a tloučku a prošla sítím o velikosti ok 100 mesh, aby se získal jemný prášek auniformní velikosti
Jaké metody byly využity při určování rozpustnosti	Morfologická analýza – SEM analýza komplexu je užitečná pro charakterizaci velikosti a morfologie částic. SEM analýza komplexu odhalila, že inkluzní komplex byl sférický tvar s hladkým povrchem. DSC – je nástroj pro zkoumání chování tavení a rekrystalizace krystalických materiálů. Rentgenová difrakce – graf lze považovat za otisk prstu krystalové struktury a pro rozlišení s různým krystalografickým stavem systému. Jeden vrchol bude vystaven pro všechny opakující se roviny se stejným rozestupem. Naproti tomu amorfni vzorek bude vykazovat široký hrb ve vzorci zvaném amorfni halo. FA, HA a P-CD byla téměř amorfni povahy. Protonová nukleární magnetická rezonance – ukazuje na inkluzivní jevy pyrazolového jádra do dutiny β -CD. Téměř stejné jevy byly pozorovány u inkluzního komplexu CXB s FA, HA a HP β -CD.	DSC – Z termogramů lze odvodit, že Itz během komplexace s FA podléhá významnému krystalickému a amorfni přechodu. FT-IR spektrum – dokazuje interakci mezi léčivem a komplexotvorným činidlem. Rentgenová difrakce – prokázala amorfni povahu, což naznačuje zachycení léčiva. Konformační analýza pomocí výpočetních metod – Molekulární modelování ukázalo, že komplexy Itz-FA jsou stabilní. Hmotnostní spektroskopie – Tvorba komplexu byla také potvrzena hmotnostní spektroskopii.
Závěr	Komplexy inkluze celecoxibu byly úspěšně použity ke zlepšení výkonu tohoto špatně rozpustného léčiva. Data odhalila důležitost inkluzního komplexu pro zlepšení rozpustnosti komplexu a jeho případného použití při vývoji různých typů formulací.	Kyselina fulvová může být zkoumána ve třech zcela nových rolích, konkrétně pro pufování kyseliny, mukoadhezi a prodloužené uvolňování ve vaginálních systémech pro dodávání léčiv.

Obrázek 13: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [51,52]

Aktivní látka	Aspirin s HA	Karmabazepin s HA
Z jakého zdroje je huminová látka	Shilajit	Shilajit
Cíl práce	Cílem této studie bylo připravit pevné komplexy mezi aspirinem a huminem lyofilizací a odpařením rozpouštědla v molárním poměru 1:1 a 1:2.	HA se v této studii používá ke zvýšení rozpouštění, pronikání střeva a farmakodynamické odpovědi CBZ.
Syntéza komplexů léčiva s FA nebo HA	Komplexy HA s aspirinem byly připraveny v poměru 1:1 a 1:2 pomocí odpařování rozpouštědla a lyofilizací.	Komplexy HA s karmabazepinem byly připraveny v poměru 1:1 a 1:2 pomocí rozemletí, vymrazování, odpařování rozpouštědla a hnětení.
Jaké metody byly využity při určování rozpustnosti	DSC – Termogram komplexů aspirin-huminová kyselina připravený lyofilizací (1:1 a 1:2) vykazovaly úplné vymizení endotermických píků charakteristických pro aspirin, což naznačuje maximální / kompletní tvorbu komplexu. Fourierova transformace infračervené spektroskopie – lyofilizovaném molárním poměru 1:2 byly všechny reprezentativní píky léčiva zmizeny, což ukazuje na úplnou komplexaci. Rentgenová difrakce pevných komplexů – Inkluzní komplexy aspirinu s huminovou kyselinou vykazovaly nedefinované, široké, rozptýlené píky s nízkou intenzitou. I když to znamená amorfni povahu, ale bylo pozorováno několik ostrých vrcholů s menší intenzitou.	DSC – Úplná absence píků byla pozorována téměř ve všech komplexech s výjimkou 1:1 PM (fyzikální směs) a 1:2 FD. FT-IR spektrum – potvrzuje výsledky DSC. Rentgenové výkonové difraktogram – XRD vzorce HA vykazují téměř amorfni povahu. Konformační analýza pomocí výpočetní metody – Molekulární modelování ukázalo, že komplexy CBZ – HA jsou stabilní.
Závěr	Žádoucího zvýšení rozpustnosti a stability aspirinu lze dosáhnout komplexem huminové kyseliny. Zdá se, že takový nový přístup je prospěšný k překonání problému špatné biologické dostupnosti.	analýzy potvrdily tvorbu komplexů a jako optimalizované metody označily KD a lyofilizaci. Profil uvolňování 1:2 lyofilizovaného komplexu byl nejlepší. Ex vivo permeační studie KD a lyofilizace ukazuje důkaz dobré farmakodynamické odpovědi.

Obrázek 14: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [53,54]

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole jsou popsány pracovní postupy, procedury, přípravy zásobních roztoků aktivních látek, lignohumátu a chloridu sodného, dále které aktivní látky byly využity pro experiment a v jakých koncentracích, příprava roztoku lignohumátu s aktivní látkou, tvorba kalibrační řady, popis sestavení Franzových difuzních cel, měření pomocí UV-VIS spektrometru a HPLC.

5.1. Použité chemikálie

Lignohumát draselný	Amagro Humic Substances s.r.o.
Ibuprofen	Sigma-Aldrich; CAS: 15687-27-1
Ibuprofen sodný	Sigma-Aldrich; CAS: 31121-93-4
Diklofenak sodný	Sigma-Aldrich; CAS: 15307-79-6
Ketoprofen	Sigma-Aldrich; CAS: 22071-15-4
Chlorid sodný	LACH-NER s.r.o.; CAS: 7647-14-5; p.a. ≥99,5%
Ethanol farmaceutický	Merck s.r.o.; CAS: 64-17-5
Sonogel – gel pro ultrasonografii	SteriWund, spol. s.r.o.
Lukosan M14-inertní silikónová pasta	Lučební závody a.s. Kolín
Destilovaná voda	

5.2. Použité přístroje

Lednice	LIEBHERR profi line
UV-VIS spektrometr	Hitachi U-3900H
Vícemístné magnetické míchadlo	CIMEREC i Poly; Thermo-Scientific
Digitální váhy	SCALTEC SPB 52
Analytické váhy	DENVER 224A
Kapalinový chromatograf	Agilent 1260 Infinity

5.3. Další pomůcky a příslušenství

Franzova cela (25 mm)	SES GmbH-Analysesysteme
Strat-M [®] membrána (25 mm)	Merck Millipore Ltd
QS mikro kyveta	Hellma Analytics
Parafilm	Bemis
Jehly (0,8 – 120 mm)	B Braun Melsungen AG
Injekční stříkačky (10 ml)	Analytics Santiago
Filtry na injekční stříkačky (0,45 µm)	Chromservis
Vialky	Agilent Technologies
Reagenční láhev-Simax	Verkon

5.4. Příprava roztoků a disperzí použitých v experimentální části práce

5.4.1. Příprava zásobního roztoku chloridu sodného

Na přípravu zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,15 M bylo na digitálních vahách naváženo 8,8 g NaCl. Navážený chlorid sodný byl kvantitativně převeden do odměrné baňky 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku, dále byl roztok převeden do reagenční láhve. Tento roztok se používal jako přijímací kapalina v akceptorové části Franzovi difuzní cely a jako rozpouštědlo pro soli aktivních látek. Koncentrace 0,15 M byla zvolena z důvodu simulace fyziologických podmínek.

5.4.2. Příprava kalibračních roztoků aktivních látek

Pro kvantifikaci aktivních látek na kapalinové chromatografii bylo zapotřebí vytvořit jejich kalibrační řady. Byly vytvořeny roztoky kyselého ibuprofenu, diklofenaku a ibuprofenu sodného o koncentracích 15; 1,5; 0,15 mg/l. Všechny aktivní látky byly připravené v roztoku 0,15 M chloridu sodného.

Také byla vytvořena kalibrační řada lignohumátu draselného o koncentracích 1; 0,5; 0,25 g/l pro potřeby kalibrace UV-VIS spektrofotometrie jako metody jeho kvantifikace ve vodném roztoku.

5.4.3. Příprava různých zdrojových lékových forem s obsahem aktivní látky

5.4.3.1. Přesycené vodné suspenze aktivních látek

Pro pilotní ověření permeability testované membrány pro aktivní látky bylo cílem připravit zdrojové lékové formy s maximální dosažitelnou koncentrací aktivních látek. Nasycená suspenze s celkovým obsahem 1% hm. aktivní látky byla připravena pro tři komerční léčiva, diklofenak sodný, ketoprofen a ibuprofen následujícím způsobem: Navážka 0,5 g léčiva byla kvantitativně převedena do odměrných baněk o objemu 10 ml, které byly doplněny 99% farmaceutickým ethanolem po rysku. Takto připravené roztoky byly přelity do odměrných baněk 50 ml, kde byly doplněny 0,15 M roztokem chloridu sodného po rysku. Vzhledem k tomu, že byla překonána rozpustnost se část v etanolu rozpuštěného množství aktivní látky vysrážela a takto vzniklá suspenze přesyceného roztoku se poté aplikovala. Následně byly suspenze přesunuty do reagenční lahve a uloženy do lednice. Ethanol byl při přípravě vzorků s aktivními látkami použit jako rozpouštědlo a jako konzervant.

5.4.3.2. Hydrogely s přesyceným roztokem aktivní látky

Vybraná analgetická léčiva se nejčastěji aplikují v léčivých přípravcích ve formě tablet nebo gelů. Pro reálnou aplikaci se léčivo ve formě roztoku nehodí, proto byla v rámci návrhu a optimalizace procedury pro realizaci experimentů zaměřených na transdermální absorpci léčiv testována také možnost převedení léčiva do formy univerzálně využitelného gelu, kterým by se lépe simulovalo reálné komerční využití. Jako gelová matrice byl zvolen sonogel, který je dostupný v řadě lékáren a využívá se ve zdravotnictví. Stejně jako v předchozím případě bylo cílem vytvořit lékovou formu s maximální dosažitelnou koncentrací aktivní látky. Aktivní látka byla dokonale rozpuštěna v odměrné baňce 10 ml pomocí 99% farmaceutického ethanolu. 2 ml

roztoku s aktivní látkou byly ručně vmíchány skleněnou tyčinkou do 8 g sonogelu. Stejně jako u přípravy přesycené suspenze byla překročena hranice rozpustnosti a část množství aktivní látky se vysrážela, ale zůstala homogenně dispergována ve formě gelu, což je výhodou oproti roztoku (suspenzi), kde sraženiny sedimentují ke dnu, resp. k membráně při difúzním experimentu. Takto vytvořený gel byl připraven na difúzní experiment.



Obrázek 15: Sonogel s ibuprofenem připravený na difúzní experiment

5.4.3.3. Roztoky aktivních látek

Po optimalizaci postupu a po realizaci pilotních difúzních experimentů byla pro další experiment zvolena forma roztoku. Jako aktivní látky byly zvoleny diklofenak sodný a ibuprofen, a to jak v jeho kyselém, tak sodném formě. Sodné soli aktivních látek jsou dobře rozpustné ve vodě. Při přípravě jejich roztoků bylo na analytických vahách naváženo 0,0015 g léčiva a toto množství bylo rozpuštěno v odměrné baňce 10 ml 0,15 M roztokem chloridu sodného. Tím byl vytvořen roztok s aktivní látkou o koncentraci 150 mg/l.

Kyselý ibuprofen je oproti sodné formě dobře rozpustný v ethanolu, ale řádově méně rozpustný ve vodě (rozpustnost ve vodě při 25 °C: 21 mg/l [55]). Pokud chceme toto léčivo rozpustit v ethanolu a následně přidat určitý objem destilované vody, nedokážeme určit přesnou koncentraci roztoku a může dojít ke vzniku krystalů, které by komplikovaly realizaci difúzního experimentu. Proto bylo naváženo 0,05 g ibuprofenu a toto množství bylo rozpuštěno v odměrné baňce 10 ml pomocí farmaceutického ethanolu. Celý obsah baňky byl přelit do odměrné baňky 50 ml a doplněn 0,15 M chloridem sodným. Vzniklá sraženina byla odfiltrována pomocí stříkačkových filtrů o velikosti pórů 0,45 μm . Bylo nutné provést filtraci ve třech opakováních, aby byl nasycený roztok zbaven všech částic vzniklé sraženiny.

5.4.3.4. Příprava roztoků aktivních látek s obsahem lignohumátu

Lignohumát draselný má strukturu hnědého prášku, který je velmi dobře rozpustný ve vodě. Pro ověření schopnosti lignohumátu penetrovat membránu Strat-M® byly vytvořeny roztoky o koncentraci 1, 5 a 10 g/l bez přídavku aktivních látek. Na tyto koncentrace bylo naváženo 0,1; 0,5 a 1 g lignohumátu, každá navážka byla rozpuštěna v odměrné baňce 100 ml pomocí destilované vody.



Obrázek 16: Navážka lignohumátu (vlevo), roztoky lignohumátu o koncentraci 1; 5; 10 g/l (vpravo)

Pro klíčovou difúzní studii této bakalářské práce, jejímž cílem bylo ověření vlivu lignohumátu na rychlost penetrace aktivních látek skrz modelovou membránu Strat-M® byly vybrány aktivní látky diklofenak sodný a ibuprofen v obou svých formách. Z testovaných koncentrací lignohumátu byla na základě výsledků jeho penetrace membránou zvolena koncentrace 10 g/l.

Pro přípravu roztoků s obsahem lignohumátu a sodných forem aktivních látek bylo na analytických vahách naváženo 0,003 g aktivní látky (diklofenak, resp. ibuprofen). Ta byla kvantitativně převedena do odměrné baňky 20 ml a doplněna roztokem lignohumátu o koncentraci 10 g/l po rysku. Takto připravený roztok byl následně využit k difuznímu experimentu.

V případě kyselého formy ibuprofenu bylo na digitálních vahách naváženo 0,2 g lignohumátu draselného. Prášek by převeden do odměrné baňky 20 ml a doplněn nasyceným roztokem kyselého ibuprofenu po rysku. Takto byl vytvořen roztok lignohumátu o koncentraci 10 g/l s nasycenou aktivní látkou. Následně byl roztok využit při difuzním experimentu.



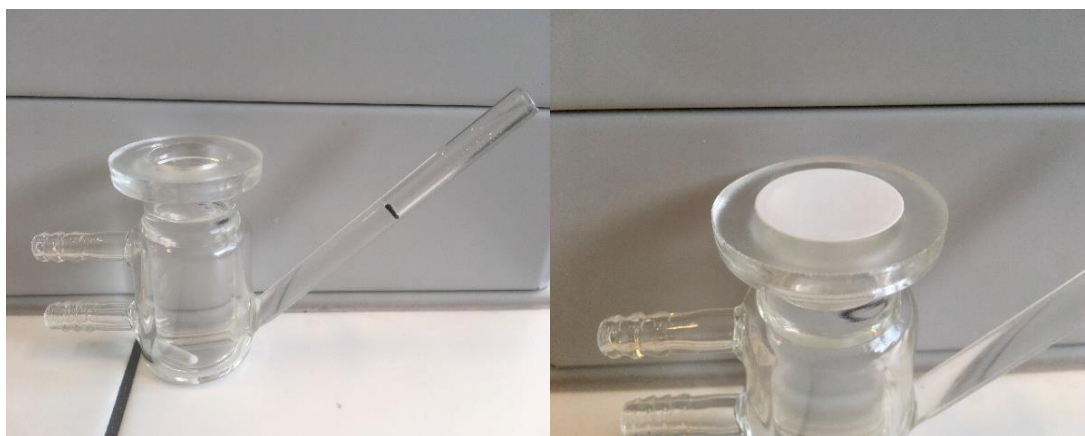
Obrázek 17: Franzova difuzní cela. v donorové části se nachází kyselý ibuprofen s lignohumátem o koncentraci 10 g/l

5.5. Postup difúzních experimentů ve Franzových celách

5.5.1. Sestavení difuzní aparatury

Základem experimentální části bylo zkoumání přestupu aktivních látek přes syntetickou membránu pomocí difuze. Pro tyto účely byly využity vertikální difuzní komůrky, tzv Franzovy difuzní cely. Počet cel, které byly k dispozici se v průběhu experimentu různě měnil.

Před začátkem experimentu bylo nutné aparatury důkladně vyčistit a vysušit. Franzovy cely jsou vyrobené z velmi tenkého a křehkého skla, proto bylo nutné s aparaturou manipulovat opatrně, aby nedošlo k jejímu poškození. Po vysušení bylo do donorové části vloženo magnetické míchadlo a tato část byla naplněna 0,15 M roztokem chloridu sodného cca 1 cm pod okraj. Na takto připravenou aparaturu byla položena Strat M[®] membrána, a to lesklou stranou vzhůru (dle instrukcí výrobce). Při manipulaci s membránou bylo dbáno zvýšené opatrnosti, protože jakékoliv zašpinění či mechanické poškození mohlo zkreslit výsledky měření.



Obrázek 18: Roztok chloridu sodného s míchadlem v akceptorové části (vlevo), strat-M[®] membrána položena lesklou stranou vzhůru (vpravo)

Na styčnou plochu akceptorové části okolo membrány byla pomocí vatové tyčinky nanesa inertní silikonová pasta, která sloužila k zabránění možného protečení vzorku do přijímacího roztoku. Tato pasta byla také nanesa na styčnou plochu donorové části aparatury. Dalším krokem bylo spojení donorové a akceptorové části tak, aby membrána svou plochou zaplnila celý přijímací otvor a nedošlo k případnému protečení.



Obrázek 19: Styčná plocha akceptorové části natřená silikonovou pastou (vlevo), donorová část natřená silikonovou pastou (uprostřed), spojení donorové a akceptorové části (vpravo)

Vzniklá mezera mezi donorovou a akceptorovou částí byla obalena parafilmem a obě části k sobě byly připevněny pomocí svorky.



Obrázek 20: Mezera mezi oběma částmi aparatury obalena parafilmem (vlevo), následné upevnění pomocí svorky (vpravo)

Do akceptorové části byl pomocí 10 ml injekční stříkačky s jehlou doplněn roztok 0,15 M chloridu sodného a to tak, že byla celá aparatura obrácena donorovou částí dolů. Tím se bublina, která se nacházela mezi membránou a roztokem 0,15 M NaCl, přesunula k plnicímu otvoru. Objem roztoku v akceptorové části činil 20 ml.

Do donorové části bylo převedeno 5 ml vzorku, donorová část a plnicí otvor byly zakryty parafilmem, kvůli zamezení odpařování. Takto připravená aparatura se přenesla do speciálně vyrobených boxů a byla položena na vícemístné magnetické míchadlo. Rychlost míchání byla nastavena na 250 RPM.



Obrázek 21: Cely se vzorky umístěné v boxech na vícemístném magnetickém míchadle

5.5.2. Stanovení obsahu komponent ve vzorcích odebíraných v rámci difúzních experimentů

5.5.2.1. UV-VIS spektrometrie

Ve vhodně zvolených časových intervalech byly z přijímací části difúzní aparatury odebírány vzorky, jejich absorpční spektra byla zaznamenána na UV-VIS spektrometru Hitachi U-3900H. Odběry probíhaly pomocí injekční stříkačky s dlouhou jehlou, vzorek byl odebrán z nejspodnější části akceptorové komory, kde se předpokládalo dokonalé promíchání. Po odběru 1 ml vzorku z přijímací kapaliny byla akceptorová část o tento objem doplněna čerstvým 0,15 M roztokem chloridu sodného. Tento postup byl zvolen z důvodu ponechání vzorků na kapalinovou chromatografii.

UV-VIS spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek od 200 do 500 nm. Jako referenční kapalina byla zvolena destilovaná voda. Kvůli malému objemu odebraného vzorku musela být použita speciální QS mikro kyveta. Získaná data sloužila hlavně pro orientaci, jestli se aktivní látky uvolňují do fyziologického roztoku a jestli experiment probíhá v pořádku. Vzorek byl po proměření vrácen do vialky a uchován v lednici pro další měření na HPLC.



Obrázek 22: UV-VIS spektrometr Hitachi U-3900H

5.5.3. Měření pomocí HPLC

Pro stanovení množství aktivních látek (kyselého ibuprofenu, ibuprofenu a diklofenaku sodného) byla na základě literární rešerše vybrána analytická metoda HPLC. Tato metoda sloužila k přesnému určení koncentrace vzorku, který prošel přes syntetickou membránu.

Vzorky uchovávané v lednici byly z vialek pomocí mikropipety přesunuty do označené reagenční nádoby. Po analýze všech vzorků byly z jednotlivých chromatogramů odečteny hodnoty ploch píků v retenčních časech, které odpovídaly různým aktivním látkám. Tato data byla dále zpracována pomocí programu MS excel.

Separace složek přijímacího roztoku a jejich kvantitativní analýza byla realizována na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity metodou isokratické eluce na koloně Kinetex C8 (velikost částic 2,6 μm , rozměry 150 \times 4,6 mm). Jako mobilní fáze byla pro pilotní měření využita směs vody a acetonitrilu (objemový poměr 1:1), následně pro zvýšení separační účinnosti pro sodné soli aktivních látek byla použita směs 10mM H_3PO_4 a acetonitrilu (objemový poměr 1:1). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, analýza probíhala při konstantní teplotě 30°C. Detekce byla realizována na DAD detektoru při 222 nm.

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1. Difuzní experimenty

Pro charakterizaci transportu vybraných aktivních látek přes syntetickou membránu Strat-M[®] byla použita vertikální difuzní cela, která je běžnou aparaturou pro zkoumání transportu různých léčiv. Důležitým předpokladem pro správnost experimentu byla optimalizace sestavování aparatury a práce s celou.

6.1.1. Optimalizace metody

6.1.1.1. Sestavení a manipulace s difúzní aparaturou

Při práci s Franzovou difuzní celou byla zapotřebí pečlivost a opatrnost. Výsledkem špatné nebo nepřesné přípravy mohla být zkreslená data z měření především vinou protečení vzorku z donorové části do akceptorové a tím znehodnocení celého časově náročného experimentu. Všechna kritická místa a případné optimalizace při práci s difuzními celami jsou popsány níže.

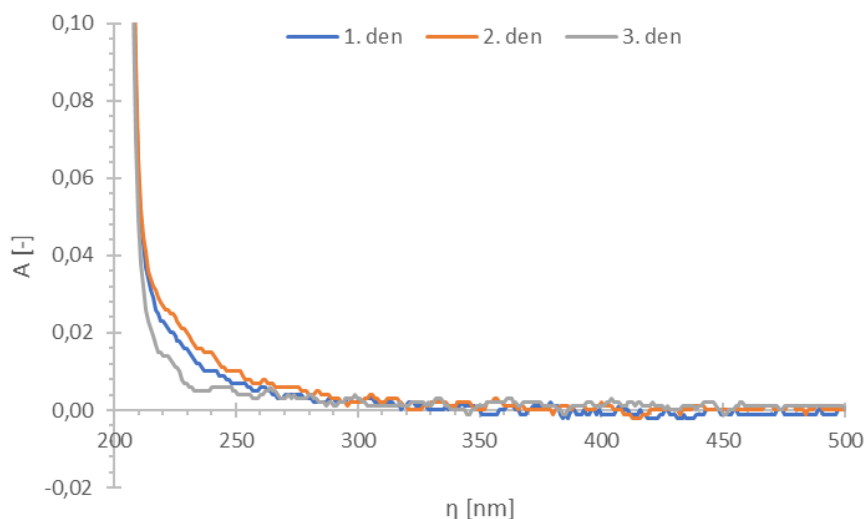
Důležitou částí přípravy bylo nanesení silikonové pasty na styčné plochy aparatury. Právě při nedostatečném nanesení mohlo dojít k protečení vzorku do akceptorové části. K nejlepšímu rozprostření silikonové pasty docházelo intenzivním přitlačením obou částí aparatury k sobě a následné mírné rotace do obou stran. Důsledkem tohoto postupu bylo velmi dobré rozprostření pasty do okolí membrány, mohlo ovšem dojít k situaci, kdy se pasta dostala do donorové části aparatury a mohla ovlivnit výsledek buď uvolněním cizích látek přes membránu nebo zmenšením plochy přestupu aktivních látek. Také již při nanášení pasty na styčné plochy kolem membrány docházelo k další manipulaci s membránou nebo k nechtěnému nanesení pasty na membránu, častým důvodem bylo opotřebení vatové tyčinky, která po více použití nedržela tvar a třepila se.

Dále mohl experiment velmi ovlivnit vznik bublin v akceptorové části. Bubliny často vznikaly při sestavování aparatury a při odebírání vzorků pro měření na UV-VIS spektrometru a HPLC. Zmenšení plochy kontaktu membrány s přijímacím roztokem vedlo k horšímu přestupu přes membránu. Tento problém byl vyřešen obrácením aparatury donorovou částí dolů, bublina nacházející se v akceptorové části u membrány se přesunula k plnicímu otvoru a tam byla pomocí injekční stříkačky s jehlou odebrána. Pokud již byl v donorové části vzorek, využilo se parafilmu, který zabránil vytečení vzorku.

I přes dodržení stejného postupu docházelo k občasným změnám objemu přijímací kapaliny bez známých příčin. Jedno z možných vysvětlení je, že při přípravě aparatur mohl okolní vzduch přestupovat přes membránu. Pokud nebyl do donorové části dán vzorek hned po sestavení aparatury, vzduch se mohl dostat do póru membrány. Během experimentu byl pak tento vzduch vytlačován vzorkem do akceptorové části a docházelo tak k vytlačování přijímací kapaliny. Důsledkem mohlo být omezení přestupu aktivních látek. Toto vysvětlení však není prokázáno.

Součástí optimalizace byl slepý experiment s 0,15 M chloridem sodným ve zdrojovém roztoku. Byly uskutečněny 3 odběry v časových intervalech 24; 48; 72 hodin, každý vzorek byl proměřen na UV-VIS spektrometru. Jak je vidět na obrázku 23, spektra přijímacího roztoku

jsou bez píku, s malým rozptylovým základem, který se pohybuje do absorpce 0,02. Tyto výsledky dokazují, že případné měření lignohumátu a aktivních látek pomocí UV-VIS spektrometrie není zatíženo interferencí se složkami aparatury, jako je třeba inertní pasta na zábrusy.



Obrázek 23: Fyziologický roztok NaCl, použitý jako zdrojový roztok do difuzní cely

6.1.1.2. Výběr aktivních látek

Cílem první sady experimentů bylo vybrat nejvhodnější kombinaci aktivních látek. Z komerčně dostupných analgetik byli na výběr ketoprofen, ibuprofen, ibuprofen sodný, diklofenak a diklofenak sodný. Zkoumaným parametrem byla rychlost přestupu přes membránu. Všechny zmiňované látky procházely v takových koncentracích, které byly dobře identifikovatelné absorpčním spektru. O výběru nakonec rozhodla možnost porovnat kyselé a zásadité formy léčiv. Proto byl z výběru vyřazen ketoprofen, u kterého nebyla možnost srovnání se zásaditou formou. Kyselá forma diklofenaku nakonec nebyla použita z časových důvodů.

6.1.1.3. Práce s aktivními látkami

Jak bylo zmíněno v kapitole 5.5.2, vybraná léčiva se často využívají v gelové formě. Sonogel byl svou strukturou dobrou matricí pro zvolená léčiva, ovšem při difuzních experimentech uvolňoval přes membránu také svoje další komponenty (pravděpodobně konzervanty), které zkreslovaly výsledky měření UV-VIS spektrometru. Proto se při dalších experimentech pracovalo pouze s roztoky aktivních látek.

6.2. Kalibrace metod kvantitativní analýzy

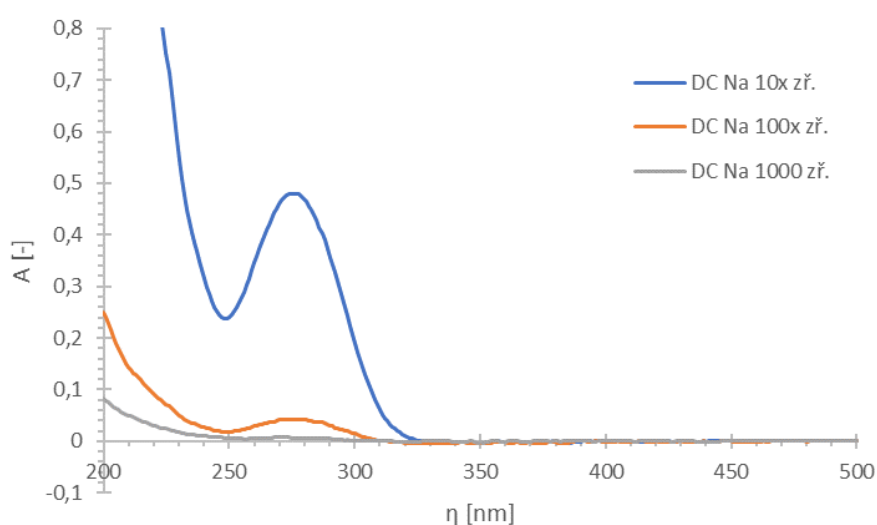
6.2.1. UV-VIS spektrometrie

Tato metoda byla vybrána pro detekci z důvodu rychlého a jednoduchého screeningového stanovení aktivních látek ve vzorcích. Nevýhodou této metody jsou vyšší detekční limity a nízká citlivost.

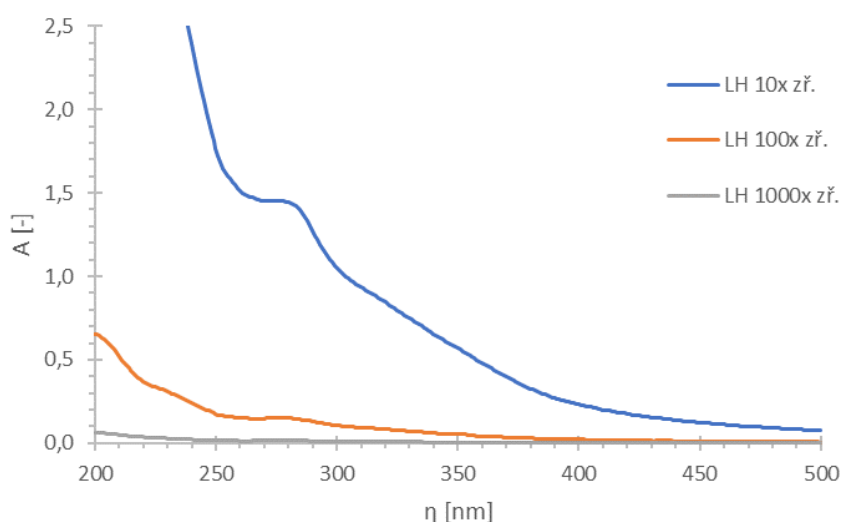
Kalibrační roztoky byly vytvořeny z roztoků diklofenaku a ibuprofenu sodného, kyselého ibuprofenu a z roztoku lignohumátu draselného. Jejich hlavní využití bylo v kapalinové chromatografii, kde tvořili důležitou předlohu pro kvantitativní stanovení prošlých aktivních látek při difuzních experimentech.

Objem přijímací kapaliny byl čtyřikrát větší než objem vzorku v donorové části. Pokud by se ze vzorku o přesné koncentraci aktivní látky transportovalo přes membránu celé množství této látky, byla by její koncentrace v přijímací kapalině menší než ve vzorku na začátku experimentu. Proto bylo zvoleno desítkové ředění použitého zdrojového roztoku pro vytvoření sady kalibračních vzorků.

Na obrázku 24 je pro příklad uvedena absorpční křivka kalibrační řady diklofenaku sodného. Kalibrační křivky obou forem ibuprofenu jsou uvedeny jako příloha 6 a 7.



Obrázek 24: Absorpční spektrum kalibrační řady diklofenaku sodného o koncentraci 150 mg/l

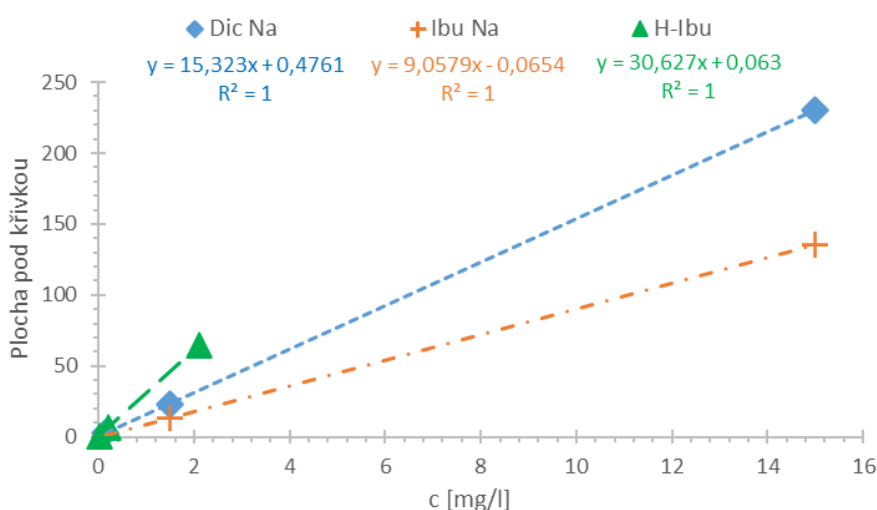


Obrázek 25: Kalibrační křivky lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l

6.2.2. HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Na rozdíl od UV-VIS spektrometrie je HPLC vhodnou metodou pro přesnou kvantitativní detekci aktivních látek i v roztoku s lignohumátem draselným. Výhodou této metody je vysoká citlivost, díky které detekuje i stopové množství látek a schopnost rozlišit léčiva od lignohumátu. Důležitou částí této metody byla příprava kalibračních roztoků, díky kterým bylo možné stanovit přesné koncentrace prošlých látek. Avšak oproti spektrometrii je to metoda složitější a časově náročnější.

Po změření kalibračních roztoků aktivních látek o známé koncentraci, byla data velikosti plochy pod píkem (získána automatickou integrací přímo v měřicím SW) vynesena v závislosti na koncentraci aktivní látky v programu MS excel. Byl vytvořen graf závislosti plochy píků na koncentraci aktivní látky. Byla vytvořena spojnice trendu a rovnice přímky, která byla následně použita pro výpočty koncentrací prošlých léčiv.



Obrázek 26: Graf závislosti velikosti píku na koncentraci aktivních látky

6.3. Difuze aktivních látek

Pro hlavní experimentální část byly vybrány kyselá forma ibuprofenu a sodné soli ibuprofenu a diklofenaku. Obě soli jsou ve srovnání s kyselými formami všech testovaných analgetik lépe rozpustné ve vodě, což zamezilo vzniku sraženin při přípravě zdrojových roztoků pro difúzní experimenty. Sraženiny mohou velmi negativně ovlivňovat difúzní experiment, a to hlavně z důvodu usazování se na membráně a bránění transportu rozpuštěných látek. Kyselá forma ibuprofenu byla zvolena z důvodu možnosti porovnání se sodnou variantou z hlediska posouzení vlivu disociace na penetraci membránou Strat-M®.

V experimentu byly použity roztoky solí o koncentraci 150 mg/l. Postup přípravy roztoků solí je uveden v kapitole 5.5.3. Byly nachystány 2 aparatury s diklofenakem sodným a 2 aparatury s ibuprofenem sodným. Odběry vzorků na UV-VIS spektrometrii a zároveň na HPLC byly naplánovány v časových intervalech 72; 120; 168 hodin.

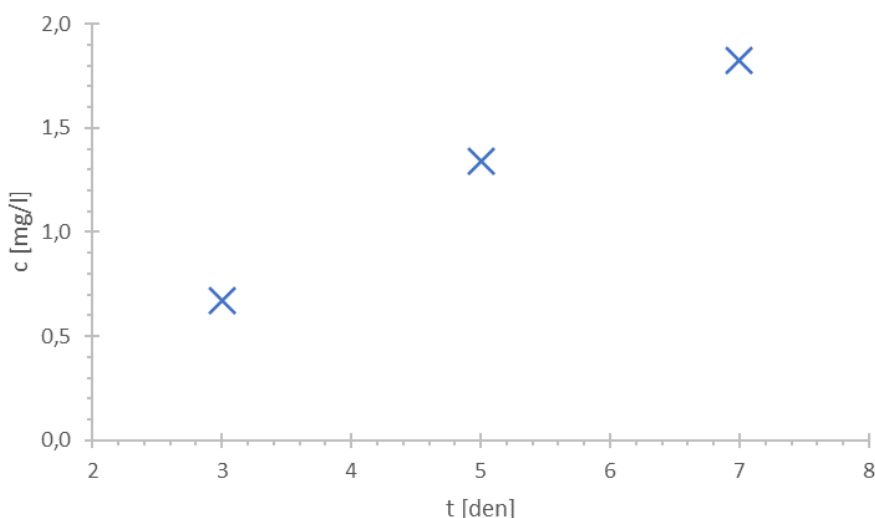
6.3.1. Transport ibuprofenu sodného

Hned při prvním odběru bylo zjištěno, že jedna aparatura s ibuprofenem sodným nebyla správně utěsněna, a proto došlo k protečení vzorku aktivní látky do přijímacího roztoku. Další odběry vzorků z této aparatury nebyly uskutečněny, neboť by výsledky byly zkreslené, proto byl pro tuto aparaturu experiment ukončen. Výsledky druhého vzorku ibuprofenu sodného prokázaly transport této aktivní látky přes Strat-M® membránu. Při prvních dvou odběrech měla při analýze přijímacího roztoku pomocí UV-VIS spektrometrie absorbance rostoucí tendenci, poslední odběr však ukázal pokles absorbance pod úroveň prvního odběru. Celkový tvar UV-VIS spekter nicméně připomínal spíše rozptyl, až při posledním odběru se objevily oba charakteristické absorpční píky odpovídající svou vlnovou délkou ibuprofenu sodnému (příloha 10).

Při analýze stejných odebraných vzorků pomocí HPLC bylo zjištěno, že koncentrace léčiva s každým odběrem rostla. Toto zjištění bylo důkazem, že transport ibuprofenu přes syntetickou membránu probíhá. Potvrdilo se, že UV-VIS může sloužit k rychlému screeningu (viz charakteristické píky v posledním odběru), ale nikoli ke kvantitativní analýze. Vznikla úvaha, že rozptylový charakter spekter mohl být důsledkem uvolňování neznámých látek z aparatury.

Data na obrázku 19 vykazují zdánlivě lineární charakter růstu, který je ale jen zdánlivý proto, že po proložení lineární regresí dává kladný průsečík s osou koncentrace. To by mohlo platit v případě, že na počátku experimentu bylo v přijímací cele nenulové množství prošlé látky. Ovšem v přijímací cele byl čistý roztok 0,15 M chloridu sodného.

Pro vzniklou situaci existují dvě možná vysvětlení. Jedním je ředění vzorku po odběrech (celková koncentrace by byla větší, kdyby byl vzorek vrácen zpátky do přijímací cely, sklon závislosti na obrázku 27 by byl tedy větší), druhým je to, že pro vyšší časy je koncentrace prošlé aktivní látky ve fázi, kdy závislost spěje k ustálení koncentrace na maximální rovnovážné hodnotě.

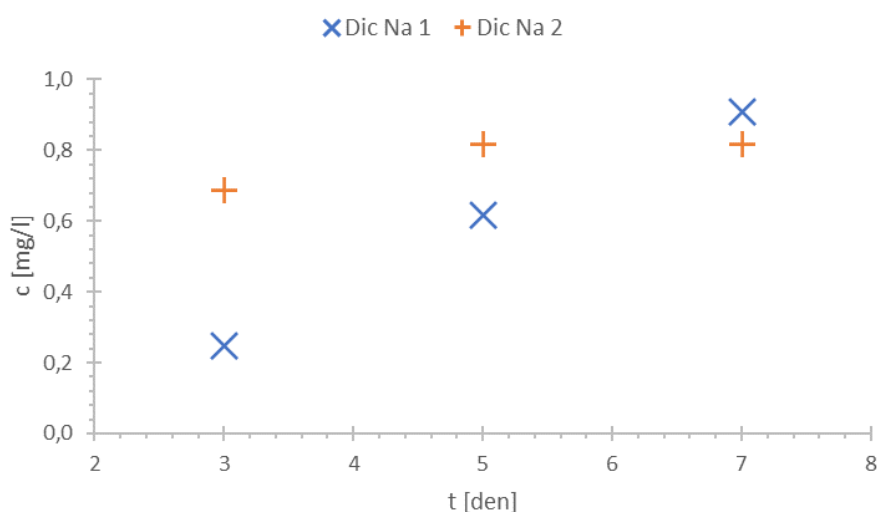


Obrázek 27: Závislost koncentrace ibuprofenu sodného na čase

6.3.2. Transport diklofenaku sodného

Podle grafů UV-VIS absorpčních spekter vznikla úvaha, že transport diklofenaku je přes syntetickou membránu daleko intenzivnější než transport ibuprofenu. První sada měření se velikostí absorbance lišila mezi jednotlivými odběry, při druhém měření byl rozdíl mezi absorbancemi podstatně menší. U posledního odběru se absorpční spektra obou vzorků, odebraných z difúzních aparatur, výrazně lišila. Zatímco u prvního vzorku došlo k dalšímu nárůstu absorbance, u druhého vzorku došlo ke snížení oproti předchozím odběrům. Stejně jako u ibuprofenu sodného byl ve spektru zaznamenán rozptyl světla, který ale nepřekrýval signál léčiva, jako tomu bylo v případě ibuprofenu.

Kapalinová chromatografie potvrdila přestup diklofenaku sodného při obou opakováních experimentu. Z výsledných grafů se dá usoudit, že již po 24 hodinách přestupuje toto léčivo ve velké míře, dokonce druhý vzorek diklofenaku se blížil k maximálnímu nasycení přijímacího roztoku. Proto se pro další experimenty nabízí možnost kratšího intervalu při odběru. Zatímco u prvního vzorku koncentrace diklofenaku s časem rostla, u druhého vzorku se koncentrace druhého a třetího odběru takřka nelišily. Pro druhý vzorek to znamená, že nejspíš došlo k rychlejšímu přestupu aktivní látky přes membránu. Z výsledků vyplývá, že při uvolňování diklofenaku nedochází k výrazné retenci léčiva a již za 1 den dochází k výraznému transportu. Avšak při porovnání výsledků chromatografie s výsledky ibuprofenu sodného je zřejmé, že koncentrace prošlého ibuprofenu byla vyšší.



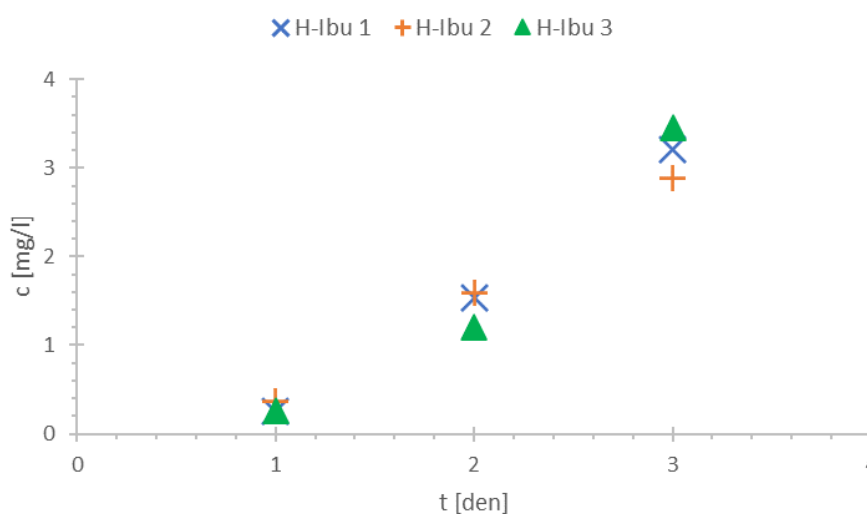
Obrázek 28: Závislost koncentrace diklofenaku sodného na čase

6.3.3. Transport kyselého ibuprofenu

Komplikace se sestavováním aparatury se negativně projevila na počtu použitelných výsledků. Proto byly experimenty s kyselým ibuprofenem realizovány ve třech opakováních (3 aparatury se stejným vzorkem o stejné koncentraci). Také byl zkrácený interval odběrů na 24; 48; 72 hodin. Díky tomu se mohlo uskutečnit více experimentů a částečně byla potlačeno riziko spojené s netěsností aparatury. Jako vzorek byl zvolen ibuprofen v kyselé formě, jehož příprava je popsána v kapitole 5.5.4.

Výsledky poskytnuté UV-VIS analýzou prokázaly, že nedošlo k žádnému rozptylu a píky obou složek ibuprofenu byly dobře viditelné. První dva vzorky se svou absorbancí lišily jen velmi málo. Třetí vzorek se lišil ve druhém a třetím odběru, rozdíly absorbancí nebyly ovšem tak velké, jako u předchozích experimentů.

Vzorek kyselého ibuprofenu byl připraven jako nasycený roztok, proto se při výpočtu koncentrace počítalo s maximální rozpustností ibuprofenu ve vodě, která odpovídá 21 mg/l [33]. Tato hodnota byla využita při sestavení kalibrační křivky. Výsledky z HPLC potvrdily předpoklad, že tato forma ibuprofenu prochází přes membránu rychleji než výše zmíněná léčiva. Nepolární charakter Strat-M[®] membrány zapříčinil intenzivnější penetraci nepolárního léčiva, jakým je kyselá forma ibuprofenu.



Obrázek 29: Závislost koncentrace kyselého ibuprofenu na čase

6.4. Difuze lignohumátu

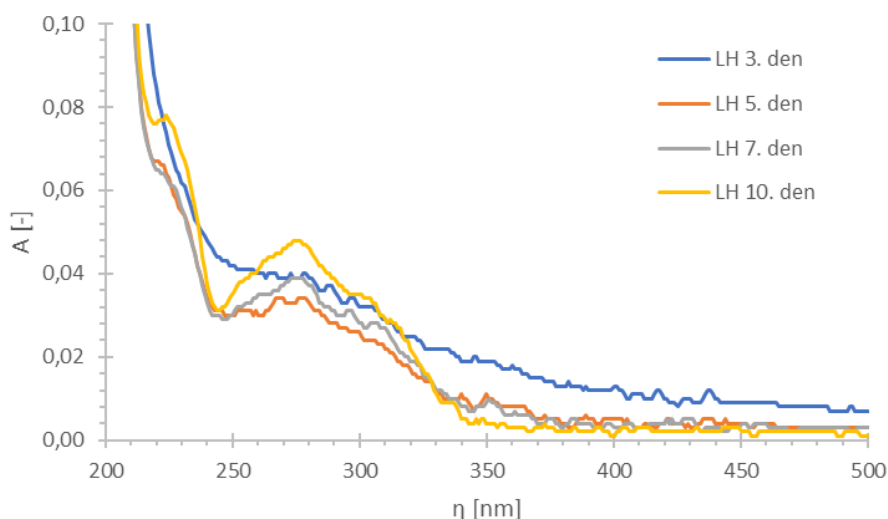
Lignohumát je oproti čistým aktivním látkám supramolekulární směs organických sloučenin o různých molekulových hmotnostech a chemických vlastnostech. Díky hnědému zbarvení roztoku lignohumátu dochází při UV-VIS analýze k absorbanci ve všech vlnových délkách bez patrných absorpčních maxim. Přesto se UV-VIS spektrometrie běžně používá pro stanovování obsahu lignohumátu ve vodném roztoku. U analýzy pomocí HPLC je velmi komplikované stanovit přesnou koncentraci této směsi, právě z důvodu různorodosti organických látek, které mají různé velikosti, a tudíž i různé retenční časy.

6.4.1. Roztoky lignohumátu draselného

Cílem prvního experimentu s lignohumátem bylo stanovení, při které koncentraci se lignohumát uvolňuje přes membránu v největší míře a také to, jestli absorbuje ve stejných vlnových délkách jako použité aktivní látky. Byly vytvořeny roztoky o různých koncentracích, jak je popsáno v kapitole 5.6. Tyto vzorky byly napipetovány do donorových částí aparatur. Tímto způsobem byly vytvořeny 3 aparatury s lignohumátem o koncentraci 1; 5; 10 g/l. Vzorky na proměření přes UV-VIS byly odebírány v časových intervalech 72; 120; 168; 240 hodin.

Již při prvním odběru bylo zjištěno, že aparatura s lignohumátem o koncentraci 5 g/l nebyla správně sestavena a vzorek lignohumátu protekl do přijímacího roztoku. Roztok přijímací kapaliny se vizuálně lišil slabě hnědým zbarvením oproti ostatním dvěma roztokům. Proběhla kontrola pomocí UV-VIS, který potvrdila protečení vzorku. Proto byl pro tuto koncentraci experiment ukončen. U vzorku o koncentraci lignohumátu 1 g/l byla naměřena velmi malá absorbance, což znamenalo pomalý přestup látky přes membránu. Při druhém a třetím odběru absorbance postupně klesala, ovšem při posledním odběru dosáhla největší hodnoty za celý experiment. U vzorku lignohumátu o koncentraci 10 g/l byla naměřena absorbance přibližně 4krát větší, než u koncentrace 1 g/l. V tomto případě měl výsledek z druhého měření klesající tendenci, oproti tomu při třetím a čtvrtém odběru absorbance vzrostla.

Ačkoliv výsledky měření neměly stále zvyšující nebo snižující tendenci, závěr experimentu byl přínosný. Lignohumát o koncentraci 10 g/l prostupoval přes membránu s větší efektivitou, proto byla tato koncentrace využita při dalších experimentech zaměřených na transport aktivních látek společně s lignohumátem draselným. Dále bylo očividné, že použitá léčiva budou v kombinaci s lignohumátem těžko rozeznatelná přes UV-VIS spektrometr, neboť lignohumát absorbuje světelné záření ve stejných vlnových délkách.



Obrázek 30: Čistý lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l použitý jako zdrojový roztok do difuzní cely

Při porovnání absorpčních křivek na obrázku 25 a 30 by se dalo usoudit, že membrána zabraňuje prostupu některých organických komponent, obsažených v lignohumátu. Naopak některé látky prostupují efektivněji, proto se mění tvar UV-VIS spektra a objevuje se kombinace píků, které jsou dobře patrné na obrázku 29. S rostoucí koncentrací prostoupených molekulárních komponent do přijímacího roztoku se absorbance těchto píků postupně zvětšuje.

6.5. Difuze aktivních látek ze směsi s lignohumátem

Experimenty s lignohumátem prokázaly (viz kap. 6.4.1.), že ze vzorku o koncentraci 10 g/l prochází lignohumát přes použitou syntetickou membránu nejlépe. Proto byla tato koncentrace použita při přípravě vzorků lignohumátu s aktivními látkami, která je popsána v kapitole 5.7. Tímto experimentem by se měl potvrdit nebo vyvrátit předpoklad, že huminové látky obsažené

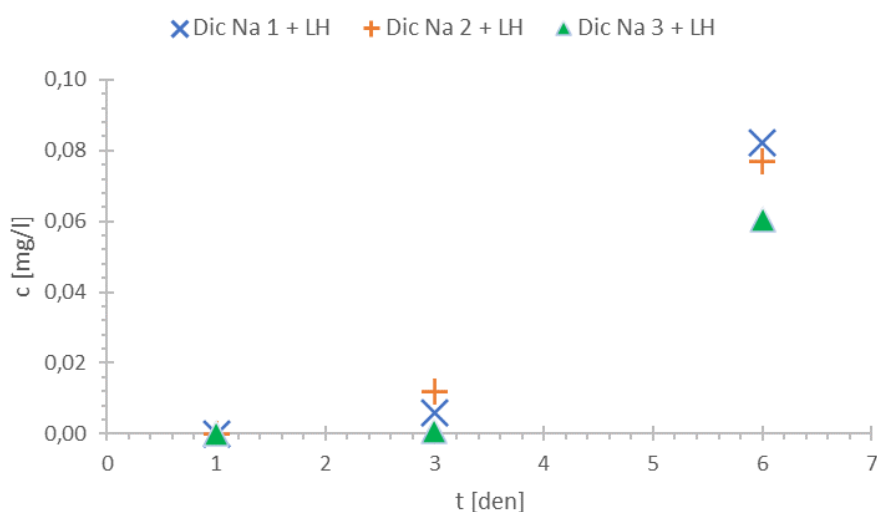
v lignohumátu draselném urychlují transport aktivních látek přes membrány napodobující lidskou kůži. Tato informace byla publikována v diplomové práci, na kterou tato práce navazuje [34].

6.5.1. Transport diklofenaku sodného s lignohumátem

Jako první byl vybrán diklofenak sodný, který při experimentech popsaných v kapitole 6.3.2. postupoval v menší koncentraci než ibuprofen sodný. Byly připraveny 3 aparatury s roztokem diklofenaku sodného a lignohumátu draselného o stejných koncentracích. Vzorčky byly odebrány v časových intervalech 24; 72; 144 hodin na UV-VIS spektrometrii, poté byly uloženy do lednice a následně využity při měření pomocí HPLC.

UV-VIS analýza sloužila spíše pro kontrolu, jestli některý ze vzorků neprošel do přijímacího média. Každý vzorek se při měření mírně lišil, všechny tři měly stoupající tendenci absorbance. Avšak oproti výsledkům z měření samostatných aktivních látek byla absorbance několikanásobně nižší. Tento výsledek vede k úvaze, že lignohumát s diklofenakem sodným přestupuje přes syntetickou membránu pomaleji než při experimentu s čistou látkou. Z tvaru absorpčních spekter se dá usoudit, že přes membránu prošel jak lignohumát, tak aktivní látka.

Výsledky analýzy kapalinové chromatografie nám potvrdily úvahu o tom, že lignohumát výrazně zpomalil transport diklofenaku přes membránu. Na obrázku 31 jsou vyobrazeny koncentrace všech 3 vzorků diklofenaku s lignohumátem. První a druhý vzorek se koncentrací aktivní látky liší minimálně, třetí vzorek měl koncentraci nižší.



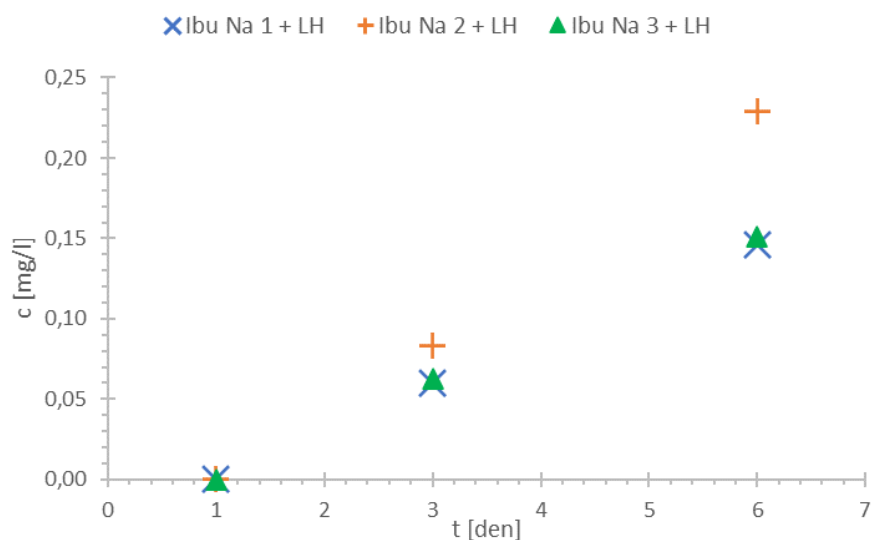
Obrázek 31: Závislost koncentrace aktivní látky na čase. Porovnání 3 stejných vzorků diklofenaku sodného s lignohumátem draselným

6.5.2. Transport ibuprofenu sodného s lignohumátem

Stejně jako u experimentu s diklofenakem byl ibuprofen sodný připraven s lignohumátem o koncentraci 10 g/l. Byly sestaveny 3 aparatury s intervalem odběru 24; 72; 144 hodin. Při pokusu s čistým ibuprofenem sodným, který je popsán v kapitole 6.3.1. absorpční křivka připomínala spíše rozptylové než absorpční spektrum (chybí charakteristický absorpční pík).

Výsledky měření UV-VIS analýzy ukázaly, že nedošlo k žádnému protečení vzorku do přijímacího média. Absorbance všech 3 vzorků měla po celý experiment stoupající tendenci. V porovnání s absorpční křivkou čistého ibuprofenu sodného byla absorbance ibuprofenu s lignohumátem znatelně menší. Tento výsledek by mohl znamenat, že lignohumát zpomalil transport i této aktivní látky.

Pomocí HPLC analýzy byla úvaha o zpomalení transportu tohoto léčiva potvrzena. Na obrázku 32 jsou zobrazeny všechny 3 vzorky ibuprofenu sodného s lignohumátem. Rozdíl mezi prvním a třetím vzorkem je takřka zanedbatelný, koncentrace druhého vzorku je vyšší.



Obrázek 32: Závislost koncentrace aktivní látky na čase. Porovnání 3 stejných vzorků ibuprofenu sodného s lignohumátem draselným

6.5.3. Transport kyselého ibuprofenu s lignohumátem

Posledním zdrojovým vzorkem, pro nějž byl realizován samostatný difúzní experiment, byl nasycený roztok kyselého ibuprofenu, který byl také smíchán s lignohumátem a tento roztok byl napipetován do donorových částí 3 aparatur. U tohoto experimentu byly vzorky odebírány v časových intervalech 24; 48; 72 hodin.

Stejně jako u předchozích měření aktivní látky s lignohumátem byly absorbance všech 3 vzorků velmi nízké, a to až desetinásobně ve srovnání s prostupem samotného ibuprofenu. Velmi zajímavým výstupem tohoto experimentu je tedy fakt, že podle absorpčních spekter jeden typ ibuprofenu (sodná sůl) prostoupil skrz testovanou difúzní membránu jak čistý, tak i ze směsi s lignohumátem, zatímco jeho nedisociovaná forma prostupovala s lignohumátem ve velmi malé míře. Výsledky UV-VIS nám také prokázaly, že nedošlo k protečení vzorků.

Výsledky z HPLC nám opět potvrdily úvahu o tom, že lignohumát výrazně zpomaluje transport aktivních látek přes syntetickou membránu. Kyselý ibuprofen byl lignohumátem ovlivněn více než sodné soli aktivních látek a to natolik, že u všech tří odběrů nebyla aktivní látka analyzována. Jedno z možných vysvětlení je, že právě ty molekulární komponenty lignohumátu, které špatně procházejí přes Strat-M[®] membránu (viz diskuse v kap. 6.4.1.), na sebe efektivně sorbují kyselý ibuprofen a tím mu zabraňují transport.

7. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce zkoumala vliv lignohumátu draselného na rychlost transportu vybraných léčiv přes syntetickou Strat-M[®] membránu. Důležitou částí byla optimalizace přípravy Franzových difuzních cel, která byla popsána jako univerzální návod pro práci s touto aparaturou. Dalším cílem bylo porovnat výsledky transportu aktivních látek s lignohumátem přes syntetickou Strat-M[®] membránu a přes modelovou kožní bariéru z prasečí kůže, jejíž vlastnosti jsou popsány v diplomové práci, na kterou tato studie navazuje.

Hlavním důvodem všech komplikací, vzniklých během celé experimentální části, bylo obtížné sestavování a manipulace s Franzovou difuzní celou, což vede k riziku protečení difúzní aparatury a znehodnocení časově náročného experimentu. Doporučení pro další práci s touto aparaturou je častější opakování experimentů a měření v kratších časových intervalech. Při porovnání 3 experimentů s aktivními látkami vznikl předpoklad, že Strat-M[®] membrána jakožto nepolární komponenta méně zabraňuje transportu nepolárních látek, jako je například kyselý ibuprofen. Sodné soli diklofenaku a ibuprofenu jsou záporně nabitě, tudíž se řadí mezi polární látky a jejich rychlost transportu přes membránu je proto nižší.

Experimenty s čistým lignohumátem prokázaly, že dochází k separaci molekulárních komponent lignohumátu na základě jejich odlišné permeability skrz použitou membránu. Tato úvaha vznikla při porovnávání absorpčního spektra kalibračních roztoků a spektra vzorků z přijímacího média. Špatná prostupnost některých složek lignohumátu by mohla ovlivnit i experimenty s aktivními látkami.

Transportu aktivních látek s lignohumátem přinesl naprosto opačný výsledek, než jaké bylo očekávání. Je naprosto zřetelné, že lignohumát nepůsobí jako tzv. enhancer transportu přes Strat-M[®] membránu, ale naopak zpomaluje nebo dokonce znemožňuje prostup vybraných aktivních látek. Toto zjištění je v konfliktu s výsledky diplomové práce, která lignohumát označila jako látku urychlující transport léčiv přes model prasečí kožní membrány. Zatímco u prasečích kůží se zdálo, že u hydrofilních aktivních látek může lignohumát zrychlovat průchod, tak tato práce dokazuje, že pokud máme hydrofobní bariéru, která je označena jako vhodný model lidské kůže, může docházet k opačnému efektu, a to zpomalení transportu léčivých látek přes tuto membránu. Z výsledků obou prací vyplývá, že oba použité modely kůže nefungují stejným způsobem a pouze na základě realizovaných experimentů není možné určit, který z nich je vhodnější pro korektní simulování reálných transdermálních absorpcí přes lidskou kůži. Syntetická membrána nedokáže simulovat všechny mechanismy penetrace látek (popsané v kapitole 3.2.2.) přes lidskou (nebo zvířecí) pokožku. Ovšem i tak má Strat-M[®] membrána své výhody, jako je reprodukovatelnost experimentu, nemá složitý postup přípravy a může se skladovat při laboratorní teplotě. Uskutečněné experimenty tedy naznačují především to, co se děje při transportu přes nepolární složky/vrstvy kůže. Závěrem této práce je doporučení zopakovat tyto experimenty na modelu reálné lidské kůže.

8. ZDROJE

- [1] VESELÁ, Lenka, Martin KUBAL, Jozef KOZLER a Petra INNEMANOVÁ, 2005. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolit. *Chemické listy* [online]. **99**, 711-717 [cit. 2020-11-16]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_711-717.pdf
- [2] MIKULÁŠOVÁ, Barbora, Lubomír LAPČÍK a Ivan MAŠEK, 1997. Lignit – struktura, vlastnosti a použití. *Chemické listy* [online]. **91**, 160-168 [cit. 2016-03-02]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_03_160-168.pdf
- [3] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL, Jiří PATOČKA a Petra INNEMANOVÁ, 2005. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. **3**(1), 13-24 [cit. 2020-11-16]. ISSN 1214021X. Dostupné z: doi:10.32725/jab.2005.002
- [4] SCHNITZER, M., 1978. Chapter 1 Humic Substances: Chemistry and Reactions. *Soil Organic Matter*. Elsevier, 1978, 1-64. Developments in Soil Science. ISBN 9780444416100. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(02)00174-8
- [5] PÉDROT, Mathieu, Aline DIA a Mélanie DAVRANCHE, 2010. Dynamic structure of humic substances: Rare earth elements as a fingerprint. *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier, 1978, **345**(2), 206-213. Developments in Soil Science. ISBN 9780444416100. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2010.01.069
- [6] SEIN, L. T. Jr., VARNUM, J. M., JANSEN, S. A.: Conformation Modeling of a New Building Block of Humic Acid: Approaches to the Lowest Energy Conformer, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, vol. 33, pp. 546-552.
- [7] PIVOKONSKÝ, Martin, Lenka PIVOKONSKÁ, Petra BUBÁKOVÁ a Václav JANDA, 2010. Úprava vody s obsahem huminových látek. *Chemické listy* [online]. (104), 1015-1022 [cit. 2020-11-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_11_1015-1022.pdf
- [8] ARANCON N.Q., EDWARDS C.A., BIERMAN P., WELCH C., METZGER J.D.: Influences of vermicomposts on field strawberries: 1. Effects on growth and yields. *Bioresource Techn.* 93:145-153, 2004.
- [9] LOTOSH T.D.: Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production. (In Russian) *Nauch. Dokl. Vyss. Skoly. Biol. Nauki* 10: 99-103, 1991.
- [10] WAKSMAN S.A.: Humus: origin, chemical composition, and importance in nature. Williams and Wilkins Co., Baltimore 1938.

- [11] MAJAKOVA E.F. and V.A. PROSKURJAKOV: Proc. 4th International Peat Congress, Ontaniemi 1972 p. 235.
- [12] PEÑA-MÉNDEZ, Eladia M., Josef HAVEL, Jiří PATOČKA: Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine, 2005. *J. Appl. Biomed.* (3), 13-24.
- [13] GREEN J.B. and S.E. MANAHAN: Absorption of sulphur dioxide by sodium humates. *Fuel* 60: 488-494, 1981.
- [14] YAMADA E., T. OZAKI, M. KIMURA: Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water. *Anal. Sci.* 14: 327-332, 1998.
- [15] KLÖCKING R.: Humic substances in the global environment and implications in human health. *Monopoli* 1992, p. 129.
- [16] ABD, Eman, Shereen YOUSUF, Michael PASTORE, Krishna TELAPROLU, Yousuf MOHAMMED, Sarika NAMJOSHI, Jeffrey GRICE a Michael ROBERTS, 2016. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* [online]. **8**, 163-176 [cit. 2020-11-27]. ISSN 1179-1438. Dostupné z: doi:10.2147/CPAA.S64788
- [17] SALA, M., R. DIAB, A. ELAISSARI & H. FESSI (2018) Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535, 1-17.
- [18] KOTINGOVÁ Lenka, Lenka BORSKÁ a Zdeněk FIALA. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické listy*. 2009, č. 103, 533-539 s.
- [19] LARESE FILON, Francesca, Marcella MAURO, Gianpiero ADAMI, Massimo BOVENZI a Matteo CROSERI, 2015. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **72**(2), 310-322. ISSN 02732300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2015.05.005
- [20] ČIHÁK, R. Anatomie 3. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 1997. Anatomie kůže, s. 559-574.
- [21] SALAMANCA, Constain, Alvaro BARRERA-OCAMPO, Juan LASSO, Nathalia CAMACHO a Cristhian YARCE, 2018. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics* [online]. **10**(3) [cit. 2020-11-29]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10030148
- [22] KLIMUNDOVA, J, D SATINSKY, H SKLENAROVA a P SOLICH, 2006. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection

chromatography coupled with Franz cell. *Talanta* [online]. **69**(3), 730-735 [cit. 2020-11-29]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2005.11.011

- [23] BROHEM, Carla A., Laura B. DA SILVA CARDEAL, Manoela TIAGO, Maria S. SOENGAS, Silvia B. DE MORAES BARROS a Silvyva S. MARIA-ENGLER, 2011. *Artificial skin in perspective: concepts and applications*. **24**(1), 35-50. ISSN 17551471. Dostupné z: doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x
- [24] HAQ, Anika, Benjamin GOODYEAR, Dina, Vivek JOSHI a Bozena MICHNIAK-KOHN, 2018. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*. **547**(1-2). ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.012
- [25] HAQ, Anika, Mania DORRANI, Benjamin GOODYEAR, Vivek JOSHI a Bozena MICHNIAK-KOHN, 2018. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International Journal of Pharmaceutics*. **539**(1-2), 58-64. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.01.029
- [26] KAUR, Lakhvir, Kanwaldeep SINGH, Surinder PAUL, Sukhprit SINGH, Shashank SINGH a Subheet KUMAR JAIN, 2018. A Mechanistic Study to Determine the Structural Similarities Between Artificial Membrane Strat-M™ and Biological Membranes and Its Application to Carry Out Skin Permeation Study of Amphotericin B Nanoformulations. *AAPS PharmSciTech*. **19**(4), 1606-1624. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-018-0959-6
- [27] HERSH, Elliot V., Paul A. MOORE a Gilbert L. ROSS, 2000. Over-the-counter analgesics and antipyretics: A critical assessment. *Clinical Therapeutics*. **22**(5), 500-548. ISSN 01492918. Dostupné z: doi:10.1016/S0149-2918(00)80043-0
- [28] DLOUHÁ, J., Havlíková, J., & Marek, O. (2002). Léčba chronické bolesti. *Interní Medicína Pro Praxi*, 4(12), 578-581. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2002/12/02.pdf>
- [29] KUKANICH, Butch a Ashley J. WIESE, 2015. Opioids. *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. Chichester, UK, 2017-04-28, 207-226. ISBN 9781119421375. Dostupné z: doi:10.1002/9781119421375.ch11
- [30] GAN, Tong J., 2010. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*. **26**(7), 1715-1731. ISSN 0300-7995. Dostupné z: doi:10.1185/03007995.2010.486301
- [31] TODD, P.A., Sorkin, E.M. Diclofenac Sodium. *Drugs* **35**, 244–285 (1988). <https://doi.org/10.2165/00003495-198835030-00004>
- [32] KREJČOVÁ, Kateřina, Eva GRYZOVÁ a Miloslava RABIŠKOVÁ, 2009. Polymeric Microparticles for Oral Administration of Diclofenac Sodium. *Chemické*

listy. **103**(1), 81-87. Dostupné také z: <http://www.w.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2886/2873>

- [33] EL-KAMEL, A.H, M.S SOKAR, S.S AI GAMAL a V.F NAGGAR, 2001. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. **220**(1-2), 13-21. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(01)00574-9
- [34] LIVERSIDGE, Gary G., 1981. *Ketoprofen*. Elsevier, 1981, 443-471. Analytical Profiles of Drug Substances. ISBN 9780122608100. Dostupné z: doi:10.1016/S0099-5428(08)60647-4
- [35] KANTOR, Thomas G., 1986. Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. **6**(3), 93-102. ISSN 02770008. Dostupné z: doi:10.1002/j.1875-9114.1986.tb03459.x
- [36] VÁVROVÁ Milada, Pavlína LANDOVÁ, Tereza ŠVESTKOVÁ a Jitka BUREŠOVÁ. Stanovení ibuprofenu a diklofenaku v povrchových vodách metodou LC-MS-MS. *Chemické listy*. 20018, č. 112, 329-332 s.
- [37] PISKAČ P., Chalupová M., Prokopcová Š.. Český Lékopis 1997: Léčivé a pomocné látky – Ibuprofenum [Online]. 2002-3 cit. [2014-10-23]. Dostupné z: < <http://www.lekopis.cz/> >.
- [38] ABIOYE, Amos OLUSEGUN, Adeola KOLA-MUSTAPHA a Ketan RUPARELIA, 2014. Impact of in situ granulation and temperature quenching on crystal habit and micromeritic properties of ibuprofen-cationic dextran conjugate cristanules. *International Journal of Pharmaceutics*. 462(1-2), 83-102. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.12.043
- [39] DAVIES, Neal M., 1998. Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen. *Clinical Pharmacokinetics*. 34(2), 101-154. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-199834020-00002
- [40] AGARWAL, Suraj P., Rajesh KHANNA, Ritesh KARMARKAR, Md. Khalid ANWER a Roop K. KHAR, 2007. Shilajit: a review. *Phytotherapy Research*. 21(5), 401-405. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.2100
- [41] PALANOVÁ, V. Experimentální studium a teoretické modelování transdermálního transportu aktivních látek z gelových matric. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 95 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..
- [42] JAVED S., KOHLI K., AHSAN W. (2016) Solubility and Dissolution Enhancement of Silymarin with Fulvic Acid Carrier. *Int J Drug Dev & Res* 8: 009-014. Dostupné

také z: <https://www.ijddr.in/drug-development/solubility-and-dissolution-enhancement-of-silymarin-with-fulvic-acidcarrier.php?aid=8920>

- [43] KHAN, Rahmuddin, Pooja JAIN, Mohd. AQIL, Suraj P. AGARWAL, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL, 2020. Pharmacokinetic evaluation of fulvic acid-ketoconazole complexes: A validation and line extension study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 55(1), 16-26. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2019.101469
- [44] THINGALE, Amol D., Karimunnisa S. SHAIKH, Prajakta R. CHANNEKAR, Upendra C. GALGATTE, Praveen D. CHAUDHARI a Chellampillai BOTHIRAJA, 2014. Enhanced hepatoprotective activity of andrographolide complexed with a biomaterial: a review. *Drug Delivery*. 22(1), 117-124. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2013.871602
- [45] MIRZA, Mohd. Aamir, Niyaz AHMAD, Suraj Prakash AGARWAL, Danish MAHMOOD, M. KHALID ANWER a Z. IQBAL, 2011. Comparative evaluation of humic substances in oral drug delivery: a review. *Results in Pharma Sciences*. 1(1), 16-26. ISSN 22112863. Dostupné z: doi:10.1016/j.rinphs.2011.06.001
- [46] MIRZA, Mohammad Aamir, Mohammad Akhlaquer RAHMAN, Sushama TALEGAONKAR, Zeenat IQBAL, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL, 2012. In vitro/in vivo performance of different complexes of itraconazole used in the treatment of vaginal candidiasis: A validation and line extension study. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 48(4), 759-772. ISSN 1984-8250. Dostupné z: doi:10.1590/S1984-82502012000400020
- [47] MIRZA, Mohd Aamir, Suraj Prakash AGARWAL, Zeenat IQBAL, Zeenat IQBAL, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL, 2011. Effect of Fulvic Acid on Oral Delivery of Carbamazepine: A validation and line extension study. *Science of Advanced Materials*. 3(2), 223-232. ISSN 19472935. Dostupné z: doi:10.1166/sam.2011.1149
- [48] AGARWAL, S. P., AQIL, M., & ANWER, M. K. (2007). Enhancement of the dissolution and diuretic effect of furosemide through a novel complexation with humic acid extracted from Shilajit. *Asian J. Chem.*, 19, 4711–4718.
- [49] AGARWAL, Suraj Prakash, Mohammad Khalid ANWER, Mohammad AQIL, Zeenat IQBAL, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL, 2008. Complexation of Furosemide with Fulvic Acid Extracted from Shilajit: A Novel Approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 34(5), 506-511. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.1080/03639040701744053
- [50] AGARWAL SP, ANSARI SH, KARMARKAR RR. Enhancement of the dissolution rate of ketoconazole through a novel complexation with fulvic acid extracted from shilajit. *Asian J Chem* 2008;20:879

- [51] AFTAB ALAM,, Md, Mohammad Khalid ANWER, Mohammad AQIL, Zeenat IQBAL, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL, 2013. Development of Celecoxib Complexes: Characterization and Cytotoxicity Studies in MCF-7. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 04(02), 506-511. ISSN 21532435. Dostupné z: doi:10.4172/2153-2435.1000211
- [52] MIRZA MA, TALEGAONKAR S, AHMED FJ, IQBAL Z. (2011). A novel and multifaceted excipient for vaginal drug delivery. *J Excip Food Chem* 2:98–112.
- [53] ANWER, Md. Khalid, Suraj P. AGARWAL, Asgar ALI, Yasmin SULTANA, Mohd Aamir MIRZA a Zeenat IQBAL, 2010. Molecular complexes of aspirin with humic acid extracted from shilajit and their characterization: Characterization and Cytotoxicity Studies in MCF-7. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 67(1-2), 209-215. ISSN 0923-0750. Dostupné z: doi:10.1007/s10847-009-9699-2
- [54] MIRZA, Mohd. Aamir, Suraj Prakash AGARWAL, Md. Akhlaquer RAHMAN, Abdur RAUF, Niyaz AHMAD, Aftab ALAM a Zeenat IQBAL, 2010. Role of humic acid on oral drug delivery of an antiepileptic drug: Characterization and Cytotoxicity Studies in MCF-7. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37(3), 310-319. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.3109/03639045.2010.512011
- [55] Ibuprofen. PubChem [online]. USA: National Center for Biotechnology Information [cit. 2021-7-13]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Hypotetický strukturní vzorec kyseliny huminové dle Stevensona [1]	9
Obrázek 2: Hypotetický strukturní vzorec kyseliny huminové dle Steelinka [6]	10
Obrázek 3: Schématické znázornění stavby pokožky [18]	12
Obrázek 4: Anatomická stavba kůže [20]	13
Obrázek 5: Statická a průtoková difuzní komůrka [18]	14
Obrázek 6: Vícevrstvá struktura Strat-M® membrány [24]	16
Obrázek 7: Strukturní vzorec diklofenaku	18
Obrázek 8: Strukturní vzorec ketoprofenu	18
Obrázek 9: Strukturní vzorec ibuprofenu	19
Obrázek 10: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [42,43,44]	21
Obrázek 11: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [45,46,47]	22
Obrázek 12: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [48,49,50]	23
Obrázek 13: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [51,52]	24
Obrázek 14: Tabulka odborných článků, zabývajících se problematikou huminových látek ve farmacii [53,54]	25
Obrázek 15: Sonogel s ibuprofenem připravený na difuzní experiment	28
Obrázek 16: Navážka lignohumátu (vlevo), roztoky lignohumátu o koncentraci 1; 5; 10 g/l (vpravo)	29
Obrázek 17: Franzova difuzní cela. v donorové části se nachází kyselý ibuprofen s lignohumátem o koncentraci 10 g/l	30
Obrázek 18: Roztok chloridu sodného s míchadlem v akceptorové části (vlevo), strat-M® membrána položena lesklou stranou vzhůru (vpravo)	30
Obrázek 19: Styčná plocha akceptorové části natřená silikonovou pastou (vlevo), donorová část natřená silikonovou pastou (uprostřed), spojení donorové a akceptorové části (vpravo). 31	
Obrázek 20: Mezera mezi oběma částmi aparatury obalena parafilmem (vlevo), následně upevnění pomocí svorky (vpravo)	31
Obrázek 21: Cely se vzorky umístěné v boxech na vícemístném magnetickém míchadle	32
Obrázek 22: UV-VIS spektrometr Hitachi U-3900H	33
Obrázek 23: Fyziologický roztok NaCl, použitý jako zdrojový roztok do difuzní cely	35
Obrázek 24: Absorpční spektrum kalibrační řady diklofenaku sodného o koncentraci 150 mg/l	36
Obrázek 25: Kalibrační křivky lignohumátu draselného o koncentraci 10 g/l	36
Obrázek 26: Graf závislosti velikosti píku na koncentraci aktivní látky	37
Obrázek 27: Závislost koncentrace ibuprofenu sodného na čase	38
Obrázek 28: Závislost koncentrace diklofenaku sodného na čase	39
Obrázek 29: Závislost koncentrace kyselého ibuprofenu na čase	40
Obrázek 30: Čistý lignohumát draselný o koncentraci 10 g/l použitý jako zdrojový roztok do difuzní cely	41
Obrázek 31: Závislost koncentrace aktivní látky na čase. Porovnání 3 stejných vzorků diklofenaku sodného s lignohumátem draselným	42
Obrázek 32: Závislost koncentrace aktivní látky na čase. Porovnání 3 stejných vzorků ibuprofenu sodného s lignohumátem draselným	43

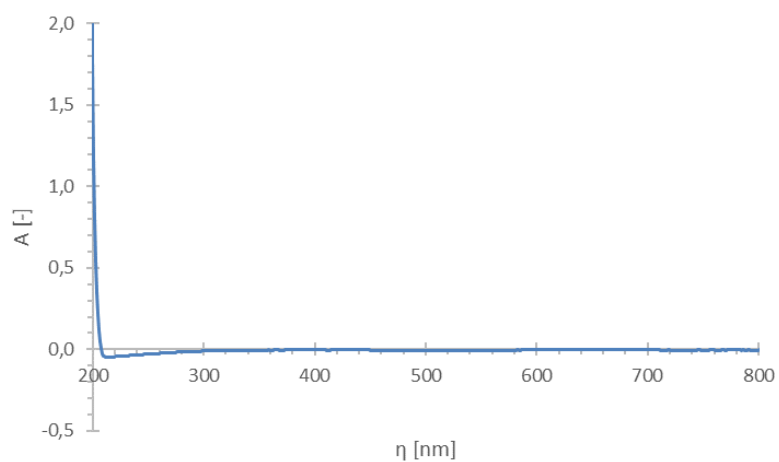
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HS	Huminová látka
HA	Kyselina huminová
FA	Kyselina fulvinové
PVC	Polyvinylchlorid
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Viditelná a ultrafialová oblast
RPM	Počet otáček za minutu
LH	Lignohumát draselný
Dic Na	Diklofenak sodný
Ibu Na	Ibuprofen sodný
Ibu H	Kyselý ibuprofen

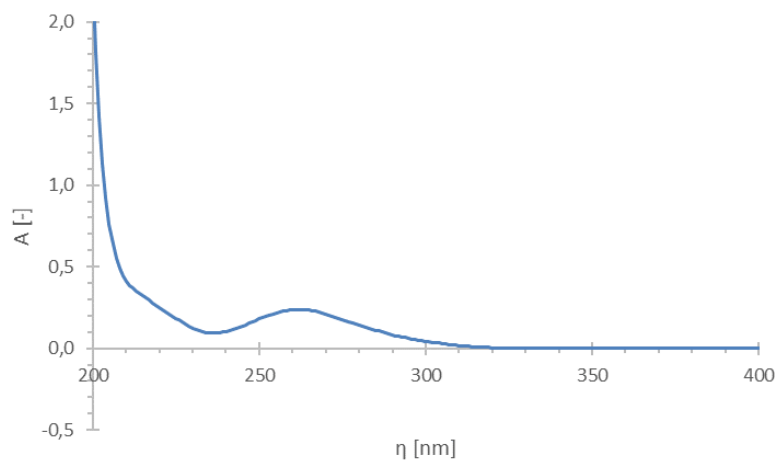
11. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Absorpční spektrum fyziologického roztoku NaCl	54
Příloha 2: Absorpční spektrum nasyceného roztoku ketoprofenu	54
Příloha 3: Absorpční spektrum ketoprofenu, kyselého ibuprofenu a diklofenaku sodného v sonogelu	54
Příloha 4: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu v sonogelu se slepými vzorky sonogelu (1. experiment)	55
Příloha 5: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu v sonogelu se slepým vzorkem sonogelu (2. experiment)	55
Příloha 6: Absorpční spektrum kalibrační řady ibuprofenu sodného o koncentraci 150 mg/l	55
Příloha 7: Absorpční spektrum kalibrační řady kyselého ibuprofenu o koncentraci 150 mg/l	56
Příloha 8: Absorpční spektrum diklofenaku sodného o počáteční koncentraci 150 mg/l (1. experiment).....	56
Příloha 9: Absorpční spektrum diklofenaku sodného o počáteční koncentraci 150 mg/l (2. experiment).....	56
Příloha 10: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného o počáteční koncentraci 150 mg/l	57
Příloha 11: Absorpční spektrum diklofenaku sodného s lignohumátem (1. experiment).....	57
Příloha 12: Absorpční spektrum diklofenaku sodného s lignohumátem (2. experiment).....	57
Příloha 13: Absorpční spektrum diklofenaku sodného s lignohumátem (3. experiment).....	58
Příloha 14: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného s lignohumátem (1. experiment)	58
Příloha 15: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného s lignohumátem (2. experiment)	58
Příloha 16: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného s lignohumátem (3. experiment)	59
Příloha 17: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu (1. experiment)	59
Příloha 18: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu (2. experiment)	59
Příloha 19: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu (3. experiment)	60
Příloha 20: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu s lignohumátem (1. experiment).....	60
Příloha 21: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu s lignohumátem (2. experiment).....	60
Příloha 22: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu s lignohumátem (3. experiment).....	61

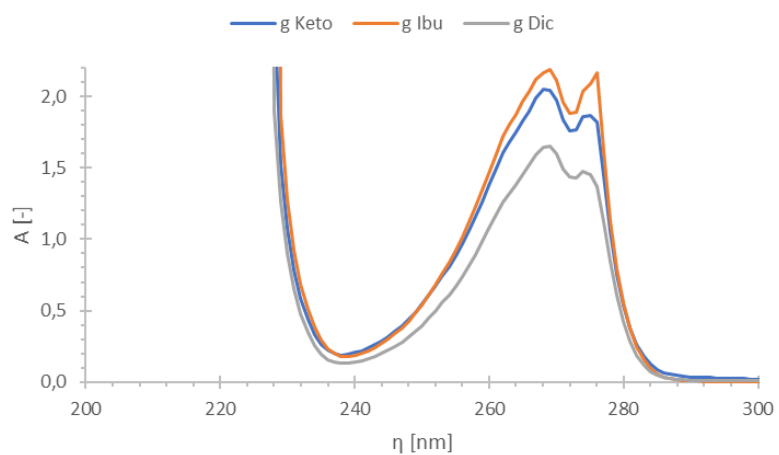
12. PŘÍLOHY



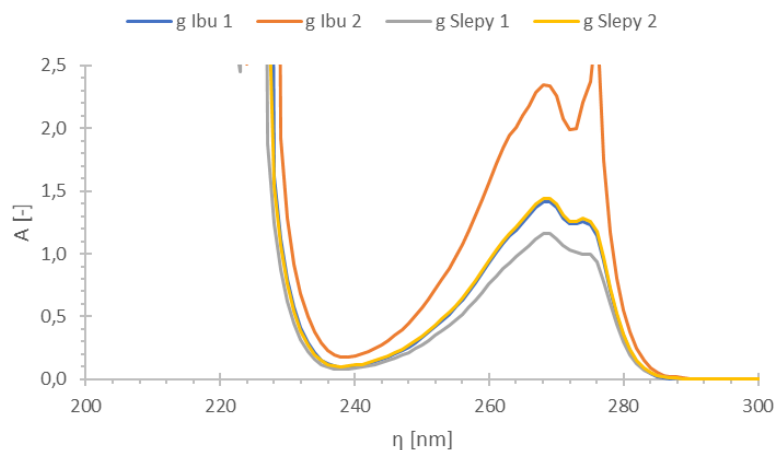
Příloha 1: Absorpční spektrum fyziologického roztoku NaCl



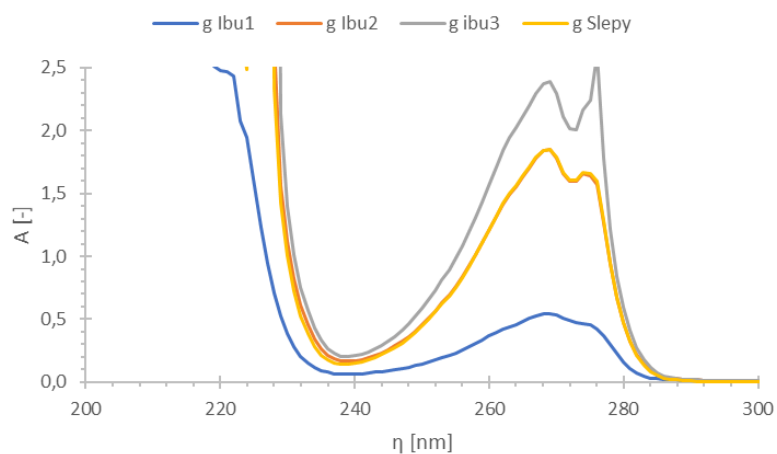
Příloha 2: Absorpční spektrum nasyceného roztoku ketoprofenu



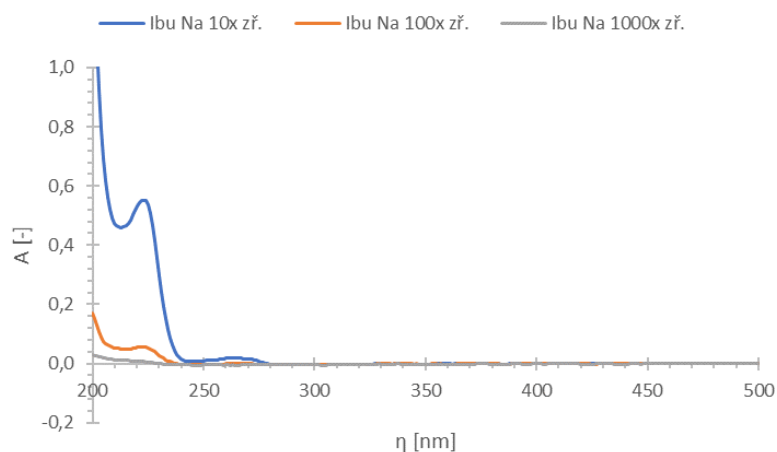
Příloha 3: Absorpční spektrum ketoprofenu, kyselého ibuprofenu a diklofenaku sodného v sonogelu



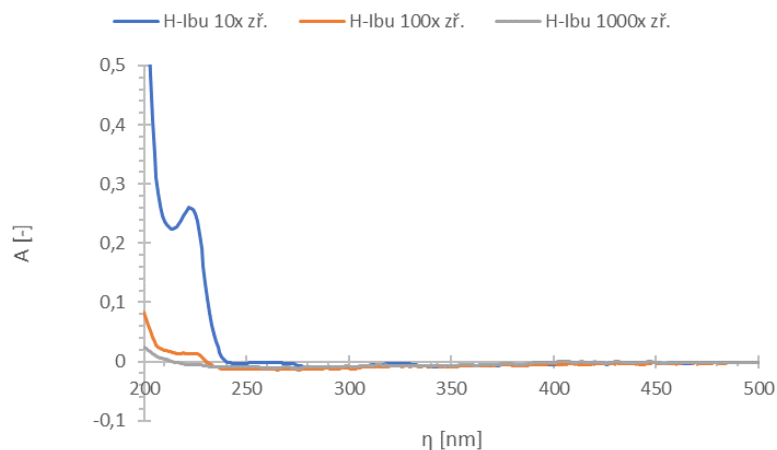
Příloha 4: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu v sonogelu se slepými vzorky sonogelu (1. experiment)



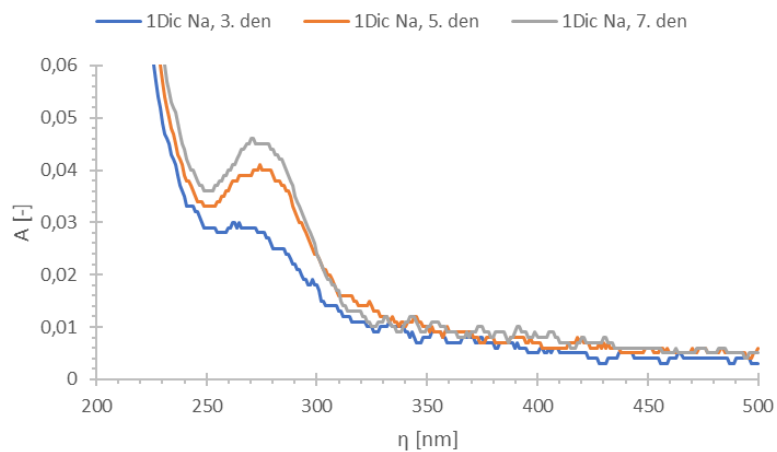
Příloha 5: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu v sonogelu se slepým vzorkem sonogelu (2. experiment)



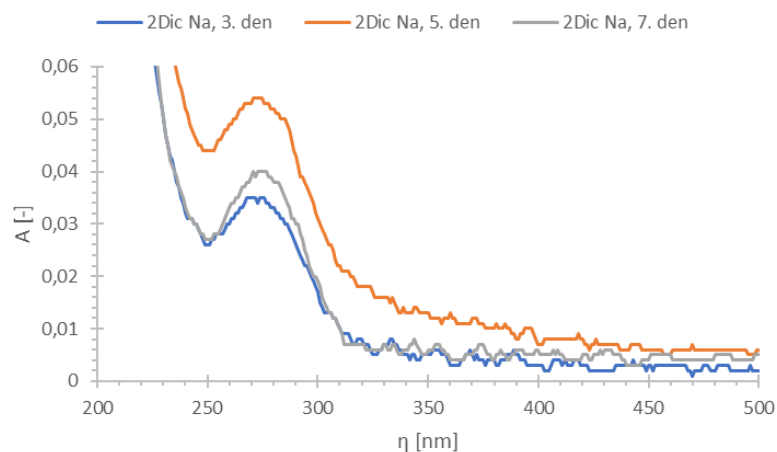
Příloha 6: Absorpční spektrum kalibrační řady ibuprofenu sodného o koncentraci 150 mg/l



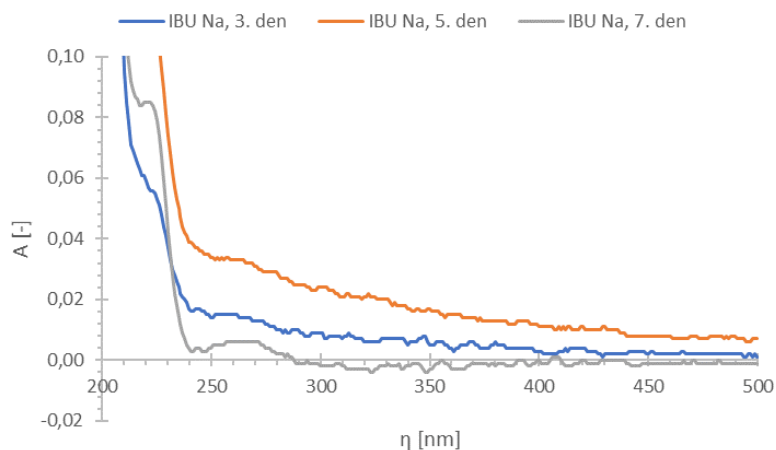
Příloha 7: Absorpční spektrum kalibrační řady kyselého ibuprofenu o koncentraci 150 mg/l



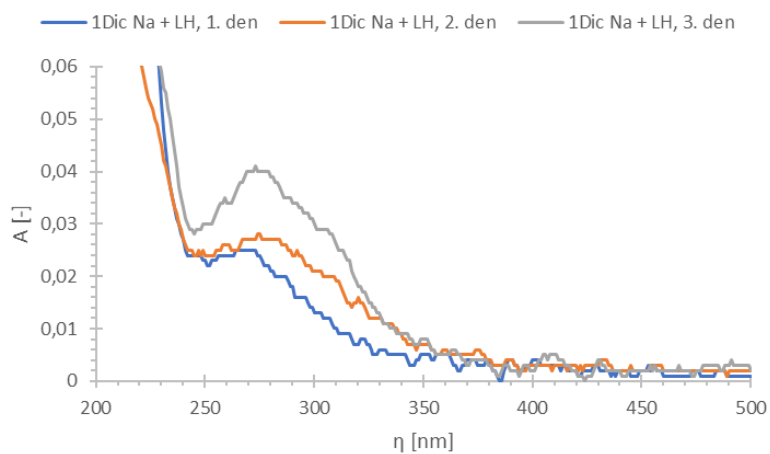
Příloha 8: Absorpční spektrum diklofenaku sodného o počáteční koncentraci 150 mg/l (1. experiment)



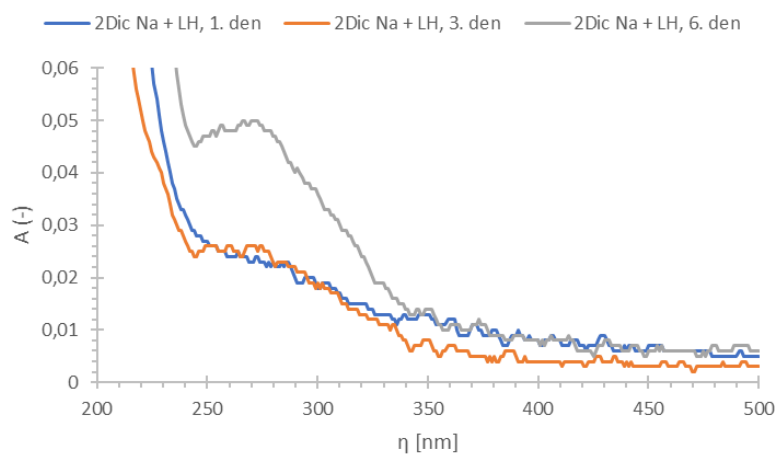
Příloha 9: Absorpční spektrum diklofenaku sodného o počáteční koncentraci 150 mg/l (2. experiment)



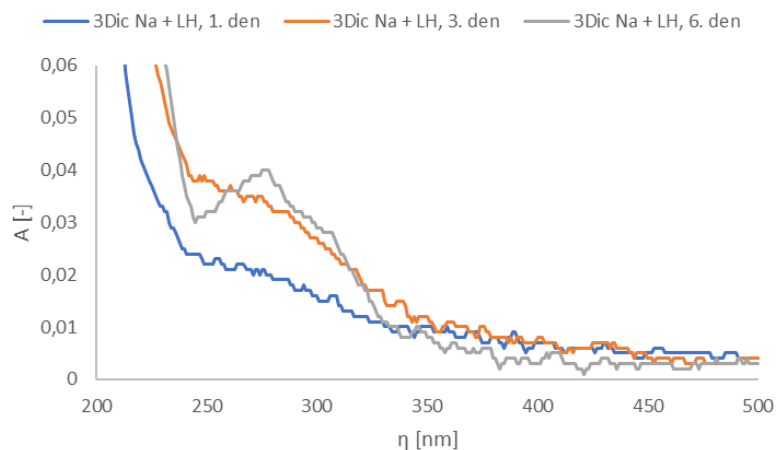
Příloha 10: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného o počáteční koncentraci 150 mg/l



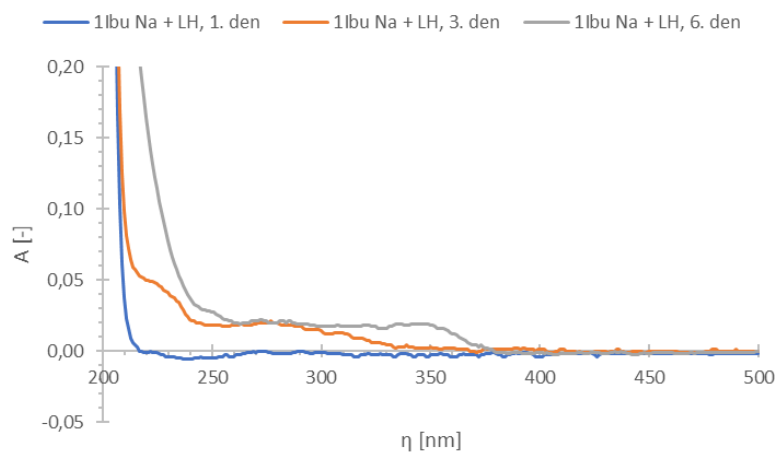
Příloha 11: Absorpční spektrum diklofenaku sodného s lignohumátem (1. experiment)



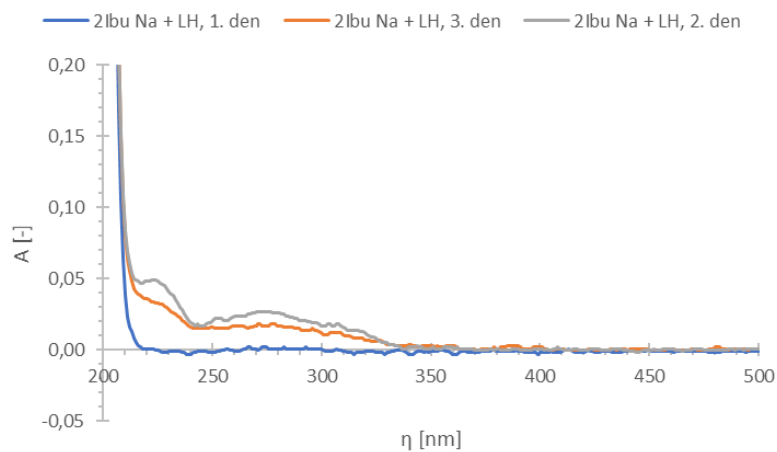
Příloha 12: Absorpční spektrum diklofenaku sodného s lignohumátem (2. experiment)



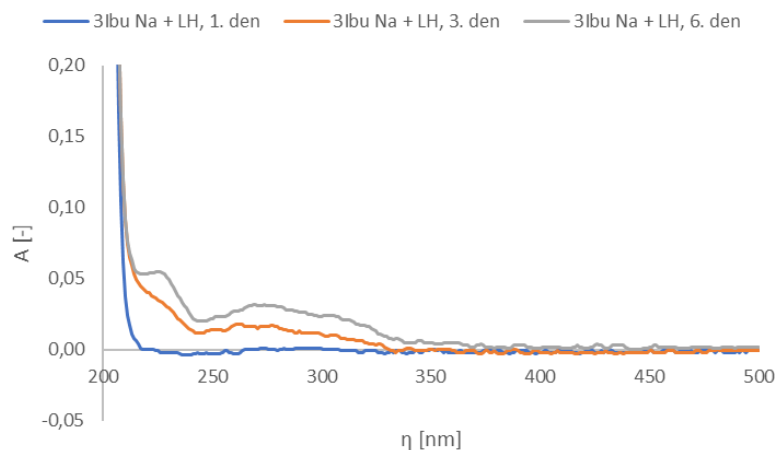
Příloha 13: Absorpční spektrum diklofenaku sodného s lignohumátem (3. experiment)



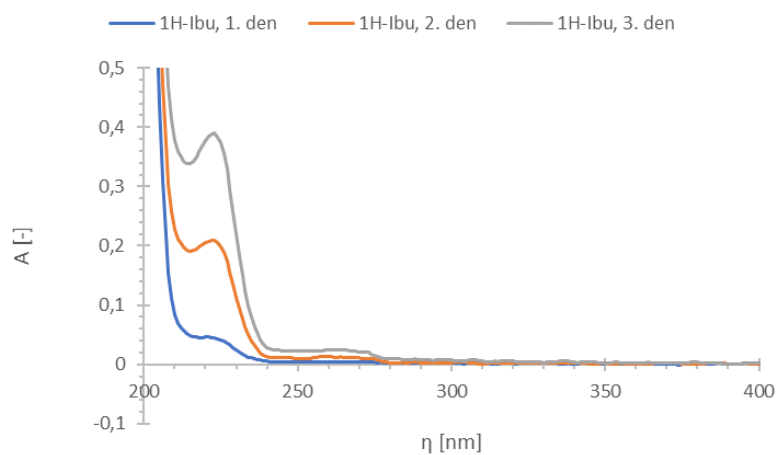
Příloha 14: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného s lignohumátem (1. experiment)



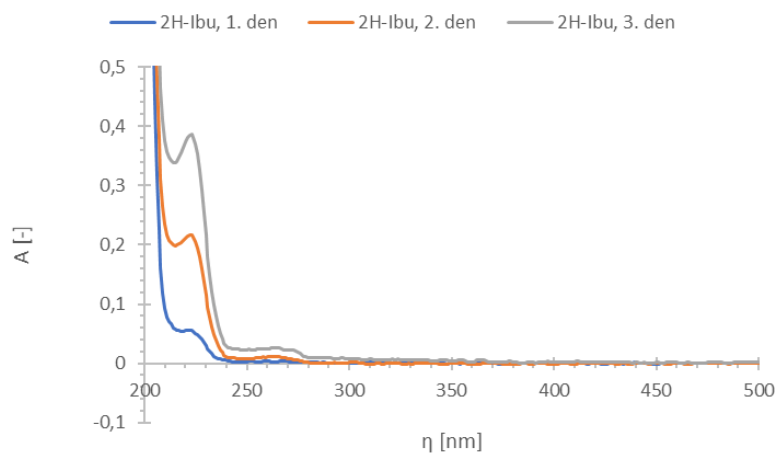
Příloha 15: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného s lignohumátem (2. experiment)



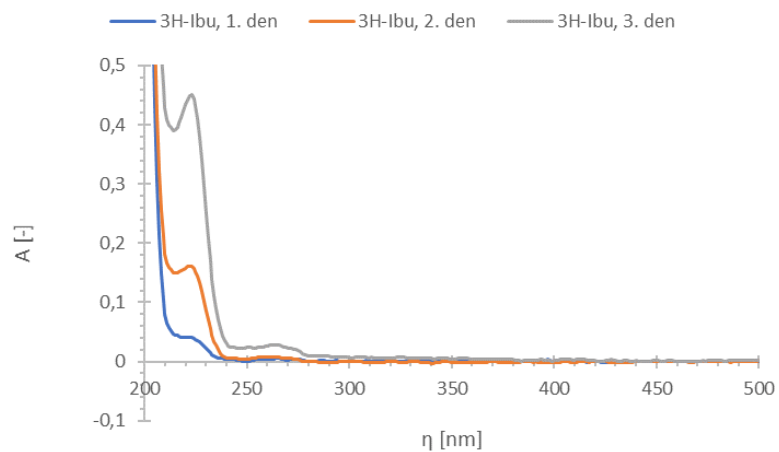
Příloha 16: Absorpční spektrum ibuprofenu sodného s lignohumátem (3. experiment)



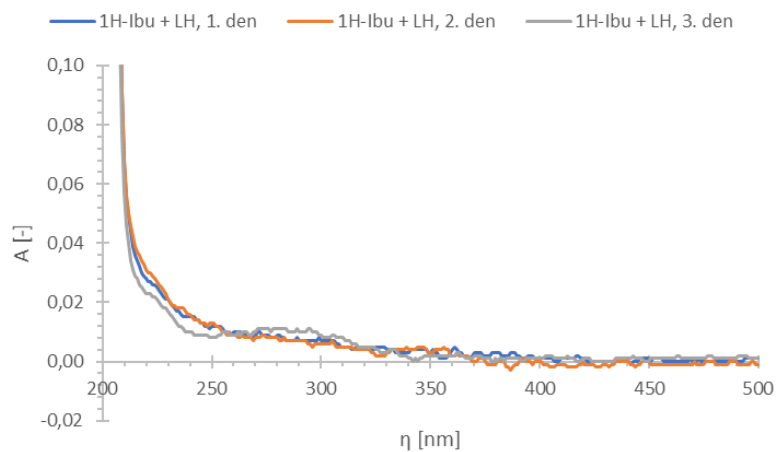
Příloha 17: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu (1. experiment)



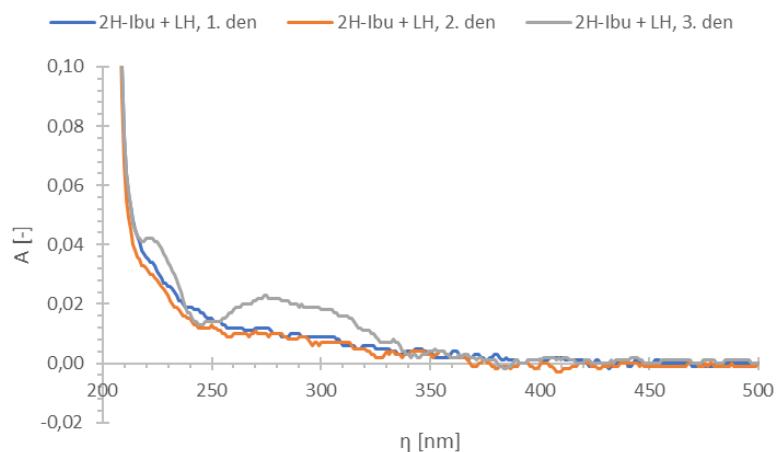
Příloha 18: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu (2. experiment)



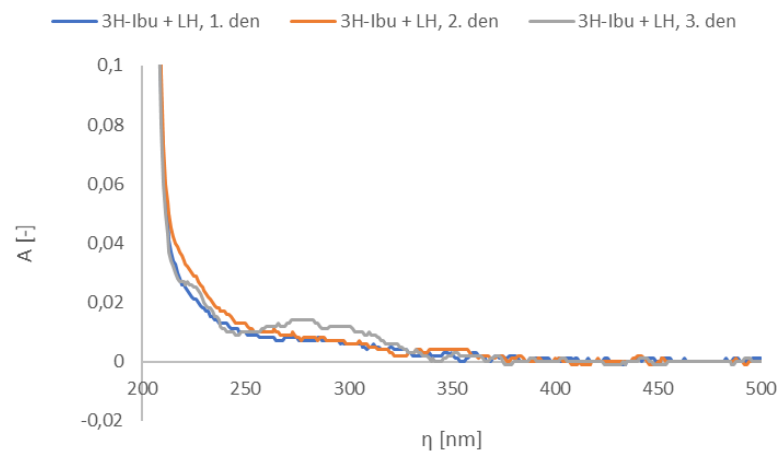
Příloha 19: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu (3. experiment)



Příloha 20: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu s lignohumátem (1. experiment)



Příloha 21: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu s lignohumátem (2. experiment)



Příloha 22: Absorpční spektrum kyselého ibuprofenu s lignohumátem (3. experiment)