



**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

**VLIV HYDROXYKYSELIN NA RYCHLOST  
TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE VYBRANÝCH  
FARMACEUTICKY AKTIVNÍCH INGREDIENCÍ**

INFLUENCE OF HYDROXYACIDS ON TRANSDERMAL ABSORPTION OF SELECTED ACTIVE  
PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Anastasiya Volhinava**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

**BRNO 2020**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1420/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Anastasiya Volhinava**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Vliv hydroxykyselin na rychlost transdermální absorpce vybraných farmaceuticky aktivních ingrediencí

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat aktuální literární rešerši na téma diplomové práce.
2. Na základě zpracované literární rešerše navrhnout modelový experimentální systém pro studium vlivu hydroxykyselin na rychlost transdermálního transportu aktivních farmaceutických ingrediencí (výběr studovaných hydroxykyselin, API, modelové kožní membrány)
3. Navrhnout, realizovat a vyhodnotit sérii experimentů zaměřených na experimentální ověření vlivu přítomnosti hydroxykyselin na transport aktivních farmaceutických ingrediencí.

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2020:

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

-----  
Bc. Anastasiya Volhinava  
student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá experimentálním studiem transdermálního transportu vybraných modelových hydroxykyselin a jejich kombinací s vitaminy rozpustnými ve vodě. Během této práce byla vypracována literární rešerše se zaměřením na využití hydroxykyselin v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Zároveň byl prostudován současný stav užívání vodorozpustných vitaminů v přípravcích určených k topickým aplikacím. Následně byla provedena série experimentů s použitím Franzových difúzních cel pro simulaci transdermálního transportu *in vitro* přes kožní, syntetické a umělé Strat M® membrány. Byla navržena a optimalizována metodika přípravy vzorků a analýzy jejich transportních vlastností. Optimalizovaná metodika se následně využila v sérii difúzních experimentů, při nichž bylo transdermálně penetrované množství hydroxykyselin analyzováno pomocí iontové chromatografie. Koncentrace vodorozpustných vitaminů byla stanovena metodou HPLC. Všechny zkoumané aktivní látky projevily pozitivní penetrační vlastnosti. Nejlepšími výsledky disponovala kombinace kyseliny glykolové s pyridoxinem.

## ABSTRACT

Diploma thesis deals with the experimental study of transdermal transport of individual hydroxyacids and their combination with water-soluble vitamins. During this work the literature review was prepared, which was focused on the use of hydroxyacids in the cosmetic and pharmaceutical industries. At the same time the current state of use of water-soluble vitamins for topical applications was studied. Series of experiments was performed using Franz diffusion cells to simulate transdermal transport *in vitro* across cutaneous, synthetic and artificial Strat M® membranes. The methodology of sample preparation and analysis of their transport properties was invented and optimized. The optimized methodology was subsequently used in a series of diffusion experiments in which the penetrated amount of hydroxyacids was analyzed by ion chromatography. The concentration of water-soluble vitamins was determined by HPLC. All examined active substances demonstrate positive penetration properties. The best results were obtained with combination of glycolic acid with pyridoxine.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Hydroxykyseliny, vitaminy rozpustné ve vodě, Franzovy difúzní cely, transdermální transport, HPLC, iontová chromatografie, Strat M® membrány.

## KEYWORDS

Hydroxyacids, water-soluble vitamins, Franz diffusion cells, transdermal transport, HPLC, ion chromatography, Strat M® membranes.

---

VOLHINA, Anastasiya. *Vliv hydroxykyselin na rychlost transdermální absorpce vybraných farmaceuticky aktivních ingrediencí*. Brno, 2020. 79 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

Bc. Anastasiya Volhina

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala především mému vedoucímu diplomové práce **Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D.** za jeho odborné vedení, trpělivost, profesionální přístup a čas. Zároveň bych velmi ráda poděkovala **Ing. Natalii Zinkovské** za vždy poskytnutou včasnou pomoc v laboratoři, za nápady a podporu. **Ing. Jaromíru Pořízkovi Ph.D.** děkuji za spolupráci při měření vzorků pomocí iontové chromatografie. **RNDr. Ivu Buchtovi** patří poděkování za odborné rady a pomoc s vývojem HPLC metody pro řešenou problematiku. Dále bych chtěla poděkovat mému **partnerovi** za jeho trpělivost, náměty, pomoc s češtinou a psychickou podporu během celého magisterského studia. Mým **rodičům** děkuji za poskytnutou možnost studovat na zahraniční univerzitě a veškerou pomoc s tím spojenou.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>1. TEORETICKÝ ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>9</b>
1.1. Kůže a její strukturní komponenty.....	9
1.1.1. Pokožka .....	10
1.1.2. Škára .....	12
1.1.3. Podkožní tukové vazivo .....	12
1.2. Buněčná membrána .....	12
1.3. Transportní procesy.....	13
1.3.1. Pasivní transport .....	14
<b>2. EXPERIMENTÁLNÍ METODY</b> .....	<b>15</b>
2.1. Difúzní experimenty.....	15
2.2. UV-VIS spektrofotometrie .....	17
2.3. Vysokotlaká kapalinová chromatografie.....	18
2.4. Iontová chromatografie.....	19
<b>3. CHARAKTERIZACE POUŽITÝCH SUROVIN</b> .....	<b>20</b>
3.1. Alfa-hydroxykyseliny.....	20
3.1.1. Kyselina glykolová.....	20
3.1.2. Kyselina mléčná .....	21
3.1.3. Kyselina jablečná .....	21
3.2. Beta-hydroxykyseliny.....	22
3.2.1. 3-hydroxybutyrová kyselina .....	22
3.3. Vitaminy rozpustné ve vodě.....	22
3.3.1. Vitamin C – Kyselina askorbová.....	23
3.3.2. Vitamin B1 – Tiamin .....	23
3.3.3. Vitamin B3 – Niacin.....	24
3.3.4. Vitamin B6 – Pyridoxin .....	24
<b>4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>25</b>
4.1. Studium mechanismu působení alfa-hydroxykyselin na kůži .....	25
4.2. Aktuální souhrn studií orientovaných na kyselinu 3-hydroxybutyrovou .....	26
4.3. Současná studia zaměřená na topické aplikace niacinu .....	27
4.4. Přehled studií zaměřených na transdermální podání tiaminu.....	28
4.5. Kyselina askorbová a její využití v kosmetickém odvětví .....	29
4.6. Studia transdermálního transportu pyridoxinu .....	30

---

<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
5.1. Použité chemikálie .....	32
5.2. Použité přístroje .....	32
5.3. Příprava zásobních roztoků .....	33
5.4. Příprava modelových membrán .....	33
5.5. Difúzní experimenty .....	34
5.6. UV-VIS spektrofotometrie .....	35
5.7. Iontová chromatografie .....	35
5.8. Vysokotlaká kapalinová chromatografie .....	36
<b>6. OPTIMALIZACE POUŽITÝCH METOD</b> .....	<b>37</b>
6.1. Difúzní experimenty .....	37
6.1.1. Pilotní experimenty zaměřené na prostup alfa-hydroxykyselin .....	37
6.1.2. Hydroxybutyrová kyselina jako zástupce beta-hydroxykyselin .....	43
6.2. Vývoj metody HPLC na stanovení obsahu vitaminů .....	45
6.3. Iontová chromatografie .....	46
6.4. Využití UV-VIS spektroskopie pro stanovení niacinu .....	47
6.5. Membrány Strat M® .....	49
<b>7. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>51</b>
7.1. Botnání kůže vlivem hydroxykyselin .....	51
7.2. Vliv přítomnosti vitaminů na transport hydroxykyselin .....	54
7.3. Vliv přítomnosti hydroxykyselin na transport vitaminů .....	56
7.3.1. Niacin .....	56
7.3.2. Vitamin C .....	58
7.3.3. Tiamin .....	59
7.3.4. Pyridoxin .....	61
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>63</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>65</b>
<b>POUŽITÉ ZKRATKY</b> .....	<b>72</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>73</b>
<b>SEZNAM TERMÍNŮ</b> .....	<b>74</b>
<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>76</b>

## ÚVOD

Transdermální transport je komfortní a účinnou variantou pro podávání aktivních látek a je preferovaný mezi pacienty před jinými způsoby podání léčiv. Vstřebávání léků prostřednictvím pokožky pomáhá v léčbě lokálních i systémových poruch celého organismu. Používá se běžně pro léčení kožních onemocnění, zánětů, mikrobiálních infekcí, psoriázy či dermatitidy. Transdermální cesta podání léků překonává nevýhody perorálního a intravenózního užití, a to díky tomu, že nabízí relativně větší plochu pro vstřebávání léků a přitom možnost ukončení léčebné terapie kdykoliv je to nutné. Představuje tedy výhodný způsob pro podání aktivních látek do krevního řečiště pro jakoukoliv věkovou kategorii pacientů. Tento způsob aplikace se osvědčil zvláště u pacientů vyššího věku, kteří se často potýkají s problémy křehkosti žil. Po aplikaci injekce jsou náchylnější k modřinám či jiným zdravotním komplikacím. Další cílovou skupinou pro využití této metody jsou děti, které často trpí fobií z jehel. Z fyziologického hlediska se díky topickému aplikování aktivních látek můžeme vyhnout efektu prvního průchodu játry (tzv. „first-pass“ efekt), který negativně ovlivňuje biodostupnost aktivní látky v organismu. Transdermální podávání může zajistit nepřetržité dávkování léků bez nežádoucího kolísání koncentrace aktivních látek v krvi, což bývá často spojeno s perorálními dávkovými formami. Použitím transdermálního podání lze tedy aplikovat nižší dávky léčiva a dosáhnout stejného terapeutického účinku ve srovnání s orálním podáním, díky čemuž dochází k redukci, či dokonce eliminaci vedlejších účinků závislých na dávce. Příprava vhodných formulací je pro farmaceutické a kosmetické společnosti velkou výzvou. Vyžaduje překonání mnohých překážek, aby bylo dosaženo skutečně použitelné lokální dávkové formy. Samotná aktivní látka musí být vhodná pro transdermální administraci. Velikost molekuly, její náboj a polarita jsou důležitými faktory, které přispívají ke schopnosti látky pronikat skrz kůži.

Kůže může být považována za jeden ze základních markerů kvality životního stylu člověka. Pokožka představuje velký propojený komplex, který pro plnění všech svých funkcí vyžaduje rovnováhu a harmonii. Moderní uspěchaný rytmus života, stres, nevyvážená strava, expozice prachovým částicím, UV záření a infekce tuto rovnováhu negativně ovlivňují. Kvůli tomu se začínají projevovat změny v pokožce: vytvářejí se vrásky, dochází k transformacím ve složení kůže, její pevnosti a obsahu vlhkosti, snižuje se schopnost absorbovat aktivní látky. Každá věková skupina čelí různým problémům s kůží, což má negativní dopad především na vzhled a jas obličeje, způsobuje nespokojenost s vlastním vzezřením a rozmanitost estetických problémů. Dalším důležitým problémem, který se s přibývajícím věkem objevuje, jsou pigmentové skvrny, které jsou způsobené lokálně zesílenou tvorbou melaninu.

Neustále se rozvíjející kosmetický průmysl naštěstí pomáhá vrátit tento životně důležitý orgán opět do rovnováhy prostřednictvím velkého množství pečující kosmetiky a léčiv. Široká řada kosmetických produktů podporuje bariérovou funkci kůže. Mezi tyto produkty patří například krémy na opalování s SPF (z angl. „sun-protection factor“), které zvyšují odolnost pokožky před slunečním zářením a zároveň ji chrání před poškozením UV paprsky a vysušením. Hydratační kosmetika zase vytváří bariéru před zvýšenou ztrátou vlhkosti z povrchu pokožky, krémy s obsahem panthenolu nebo parafínu mohou zlepšovat stav suché pleti. Na trhu lze nalézt také kosmetické přípravky s obsahem antibakteriálních látek, které dokážou zmírnit či úplně zastavit růst bakterií na povrchu pokožky a tím se významně podílet na zvýšení imunity člověka.

Ačkoli jsou některé látky pozitivně působící na správné fungování kůže známy již tisíce let, dnešní trh je považuje za revoluční novinku. Například alfa-hydroxykyseliny (AHA) používali již ve starověkém Egyptě a Římě. Pro výrobu pleťových masek byly využívány tehdy dostupné potraviny obsahující kyseliny: citronovou a hroznovou šťávu nebo třeba kyselé mléko. V moderní kosmetologii začínají alfa-hydroxykyseliny nabírat na popularitě, a to z důvodu experimentálního potvrzení jejich pozitivních účinků na kůži. AHA v sobě kombinují vlastnosti alkoholů a organických kyselin, které byly původně používány pouze v dermatologii pro dezinfekční a léčebné účely, k odstranění lupů, ekzémů, akné a dalších kožních chorob. Později se ale ukázalo, že při zvýšené koncentraci mohou způsobit i jiný velice žádaný kosmetický efekt, a to tzv. omlazení pleti. Výsledkem působení vyšší koncentrace AHA na organismus je exfoliace, při níž dochází k oslabení spojení mezi buňkami horní vrstvy *epidermu* vedoucí k změkčení a následnému zrychlenému oddělení staré keratinové vrstvy kůže. Díky tomu na povrch pokožky dříve vstupují nové mladé buňky zabraňující vzniku malých vrásek. Kosmetika s alfa-hydroxykyselinami působí hlouběji než mechanický peeling, a proto je stále více žádaná.

K zhotovení kosmetických přípravků je zapotřebí mnoho různých aktivních látek a vitaminy lze zařadit mezi jedny z nejdůležitějších. Je známo, že vitaminy jsou pro nás jednou z esenciálních živin, ale v moderní době tyto molekuly získaly i novou roli. Jako přídavek do kosmetických přípravků pomáhají minimalizovat příznaky stárnutí, normalizovat rovnováhu pokožky a stimulovat obnovu buněk. Například, vitamin A je důležitou složkou ve výrobcích, které se podílejí na péči o suchou pleť. Vitaminy skupiny B jsou součástí produktů pro péči o vlasy. Vitamin E je široce používán jako přírodní konzervant pleťových olejů a jiných kosmetických přípravků. Lokální použití vitaminů v kosmetice může být prospěšné v případě prevence nadbytečné pigmentace, nežádoucí keratinizace anebo stimulace produkce kolagenu.

Společná aplikace hydroxykyselin s vitaminy a studium jejich vzájemného ovlivňování rychlosti transdermální absorpce se jeví jako zajímavá a dosud málo prozkoumaná oblast v kosmetickém a farmaceutickém odvětví. Případná účinná kombinace těchto dvou komponent může přivést ke vzniku nového produktu s unikátními vlastnostmi a účinkem, čímž může přispět k rozšíření poznatků v kosmetickém a farmaceutickém odvětví. Předložená diplomová práce se zaměřuje právě na tuto potenciálně zajímavou kombinaci. Cílem práce je navrhnout, realizovat a vyhodnotit sérii experimentů zaměřených na ověření vlivu hydroxykyselin na transdermální transport vitaminů.



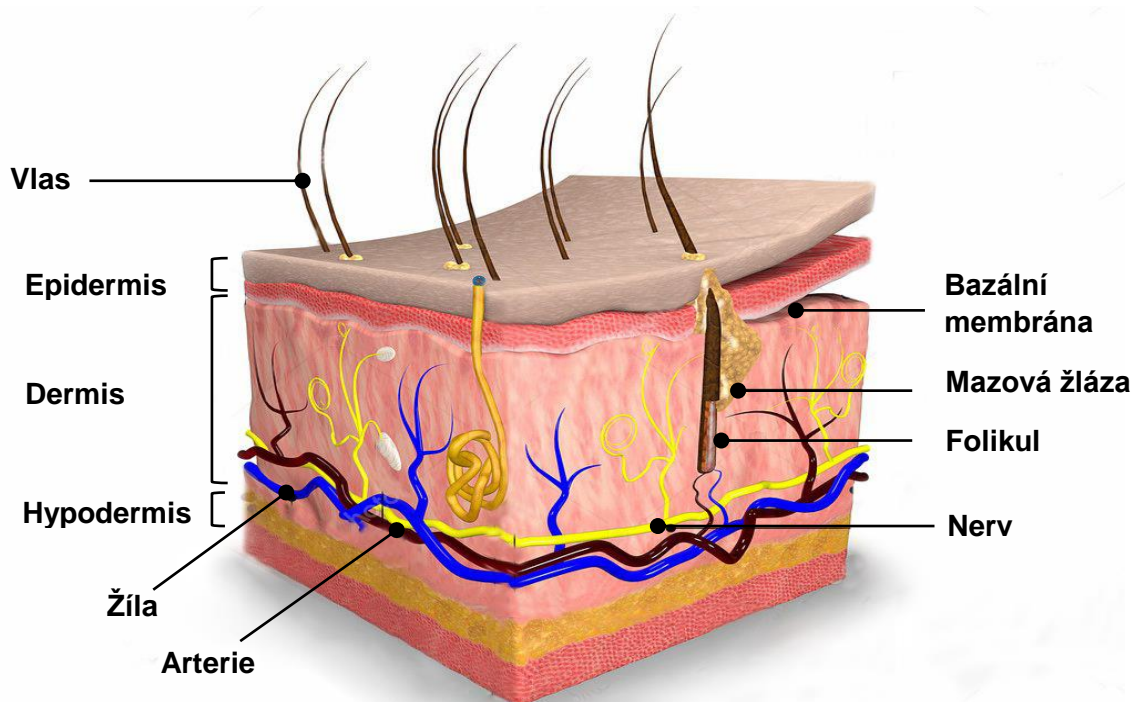
## 1. TEORETICKÝ ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Pro snadnější pochopení dané problematiky je nutné se nejprve důkladně seznámit s kompletní strukturou kůže, jednotlivými vrstvami a transportními procesy skrze ni. Porozumění struktuře *epidermu* je nesmírně důležité pro pochopení problémů spojených s dehydratací, citlivostí a nadbytečnou pigmentací, podstaty bariérové funkce kůže a transdermálního transportu aktivních látek. Na tento teoretický úvod navazuje popis vybraných analytických metod vhodných pro experimentální monitoring průchodu látek skrze kůži.

### 1.1. Kůže a její strukturní komponenty

Kůže je největším orgánem lidského těla s celou řadou klíčových funkcí. Na jejím povrchu i uvnitř ní se odehrávají rozsáhlá množství chemických a fyziologických procesů. Mezi její nejdůležitější funkce patří funkce bariérová, díky které je lidské tělo chráněno před externími vlivy vnějšího prostředí a proti oxidaci. Kůže zároveň pomáhá udržovat konstantní teplotu těla a regulovat ztrátu vody, která je pro organismus nezbytná. Kůže plní také vylučovací funkci a čistí organismus od toxinů a dalších látek vytvořených v průběhu metabolismu v játrech. Pomáhá se bránit proti infekcím, čímž se podílí na imunitě člověka. Vzhledem k všem výše uvedeným funkcím je skutečně důležité, aby kůže neztratila schopnost neustále se regenerovat a v průběhu života udržovala funkční integritu [1].

Kůže pokrývá celý vnější povrch těla. Celková plocha povrchu kůže u dospělého člověka je 1,5 až 1,8 m<sup>2</sup>, a její hmotnost spolu s podkožním tukem tvoří až 17 % tělesné hmotnosti. Na povrchu kůže je možné najít otvory – póry mazových a potních žláz. Kůže se skládá ze tří hlavních vrstev: *epidermis*, *dermis* a *hypodermis* (Obr. 1), přičemž každá se výrazně liší svou anatomii a funkcí [2].



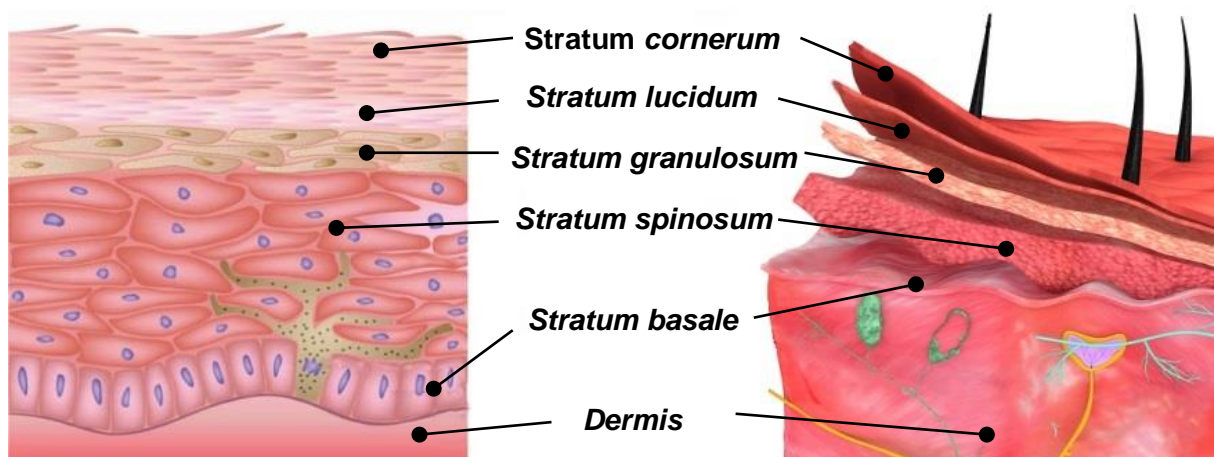
Obr. 1. Obecná struktura kůže [3]

### 1.1.1. Pokožka

Pokožka dodává kůži záři, mladost, strukturu a vzhled. Je zodpovědná za udržování vodní rovnováhy, zachycení škodlivých bakterií na povrchu a celkové zdraví pokožky. Jedná se o vrstevnatý dlaždicový epitel s tloušťkou od 0,04 do 1,6 mm s výraznou regenerační schopností [2].

Epidermální buňky se začínají tvořit v bazální vrstvě *epidermu*, který je tvořen přibližně z 80 % vodou. Buňky ve spodních vrstvách kůže se neustále dělí a vytlačují starší buňky k povrchu. Během růstu a dělení buňky migrují do horních vrstev a transformují se z měkkých a jemných do tvrdých, keratinem naplněných odumřelých buněk. Horní vrstvy kůže neustále rohovatí, odumírají a odlupují se. Je to způsobeno tím, že se buňky v horních vrstvách pokožky postupně vzdalují od zdroje krve a živin, a v průběhu času pozvolna odumírají. Obsah vody v části *stratum corneum* (viz. Obr. 2) činí 10 až 15 %. Schopnost pokožky udržovat vodu v buněčném a mezibuněčném prostoru klesá s věkem, proto je pokožka starších lidí víc náchylná k dehydrataci a tvorbě vrásek. Zároveň se s věkem zvyšuje doba, potřebná pro kompletní obnovení *epidermu*. V porovnání s mladými lidmi, u kterých proces migrace buněk z bazální vrstvy směrem k povrchu trvá přibližně 28 dní, stejný proces u lidí, kteří dosáhli věku 50 let, zabírá až 37 dnů [1].

*Epidermis* představuje metabolicky aktivní tkáň, syntetizující lipidy a obsahující látky, které se podílí na primární bariérové funkci kůže. Díky obsahu volných radikálů, jako jsou například vitaminy E a C, má pokožka antioxidační vlastnosti a plní ochrannou roli pro celý organismus [1]. Z pohledu anatomie a histologie je možné rozlišit pět vrstev *epidermu* (viz Obr. 2).



Obr. 2. Vrstvy epidermu [3, 4]

- **Stratum basale**

Tato vrstva se nachází přímo na bazální membráně. Je tvořena buňkami prizmatického tvaru, které jsou umístěny kolmo k povrchu kůže. Bazální vrstva je primárním centrem mitoticky aktivních buněk v *epidermis*. Ne všechny bazální buňky mají potenciál se neustále dělit. V bazální vrstvě existují epidermální kmenové buňky, které jsou považované za klonogenní buňky s dlouhou životností, a za normálních podmínek mají pomalejší buněčný cyklus. Stav, jako je zranění, mohou stimulovat dělení těchto kmenových buněk. Migrace buněk z bazální vrstvy do horní vrstvy *epidermu* trvá u lidí nejméně 14 dní [5,6].

- ***Stratum spinosum***

Pokrývá bazální vrstvu a skládá se z 3 až 8 řad kubických, polygonálních nebo lehce zploštěných buněk s centrálně uloženým jádrem a cytoplazmou. Tvar, struktura a vlastnosti buněk této vrstvy jsou závislé na jejich umístění. Například suprabazální buňky ve *stratum spinosum* mají polygonální tvar a zaoblené jádro, zatímco buňky z horní části této vrstvy jsou obecně větší a víc zploštěné, protože jsou tlačeny k povrchu kůže. Mezibuněčné prostory jsou z větší části vyplněné *desmozomy* (pozn. vysvětlení vybraných termínů použitých v textu této práce je uvedeno na str. 74), které podporují mechanické spojení mezi buňkami *epidermu* a poskytují odolnost vůči fyzické zátěži. Zároveň se v této vrstvě nachází *lamelární granule*, které jsou považovány za určitý typ *lyzozomů*. Mezi spojením epidermálních buněk existují mezery nebo také mezibuněčné póry, které umožňují fyziologickou komunikaci prostřednictvím chemických signálů. Ta je nezbytná pro regulaci buněčného metabolismu, růstu a diferenciaci [5].

- ***Stratum granulosum***

Vrstva *epidermis*, která jako poslední obsahuje živé buňky ve své struktuře. Je složená ze zploštělých kosočtverečných buněk, zodpovědných za další syntézu a modifikaci proteinů zapojených do procesu keratinizace. Granulární vrstva se liší v tloušťce úměrně s tloušťkou nadcházející vrstvy odumřelých buněk. Například pod tenkou rohovatějící vrstvou může mít tloušťku pouze 1 až 3 buněčné vrstvy, zatímco na dlaních a chodidlech může být i 10krát tlustší. Velmi tenká nebo nepřítomná granulární vrstva může vést k rozsáhlé *parakeratóze*, při které jádra keratinocytů přetrvávají, což má za následek *psoriázu*. Zároveň vrstva obsahuje specializované zrna čili granule, jež mají funkci biologického intracelulárního tmelu, který zabraňuje pronikání cizorodých látek do organismu. Také zde se nacházejí lyzozomální enzymy. Jedná se o keratogenní zónu *epidermu*, ve které postupně probíhá rozpuštění buněčných organel a příprava buňky, aby podstoupila terminálnímu diferenciacnímu procesu pro vytvoření horní vrstvy *epidermu* [5].

- ***Stratum lucidum***

Čirá, tenká vrstva odumřelých kožních buněk v *epidermu*, která dostala název díky svému průsvitnému vzhledu. Nachází se mezi vrstvami *stratum granulosum* a *stratum corneum* a její tloušťka je řízena rychlostí mitózy epidermálních buněk. Nejčastěji se skládá z 3 až 5 vrstev mrtvých, zploštělých keratinocytů, které jsou snadno viditelné pomocí mikroskopu na dlaních a chodidlech. Vypadají jako bezbarvé proužky prodloužených bezjaderných buněk. Tyto buňky jsou obaleny *eleidenem* – čirým intracelulárním proteinem, který vzniká jako produkt transformace *keratohyalinu* s komplexem aminokyselin. Vytváří neživou hmotu uloženou ve formě drobných granulí v protoplazmě živých buněk, dává buňkám jejich transparentní vzhled a poskytuje bariéru vůči vodě. Eleidin je pak přeměněn na keratin ve *stratum corneum* [7].

- ***Stratum corneum***

Jedná se o 20 až 30 buněčných vrstev, které poskytují mechanickou ochranu celého *epidermu* a vytvářejí bariéru proti nadměrné ztrátě vody a pronikání cizích látek. Vrstva je složená z velkých plochých rohovitých buněk, které ztratily svá jádra během terminální diferenciaci. Technicky jsou považovány za mrtvé a nazývají se keratinocyty. Fyzické a biochemické vlastnosti buněk ve *stratum corneum* se liší v podle umístění. Například buňky uprostřed této vrstvy mají mnohem vyšší kapacitu pro vázání vody než hlubší vrstvy z důvodu vysoké koncentrace volných aminokyselin, které se nachází v cytoplazmě [5].

### 1.1.2. Škára

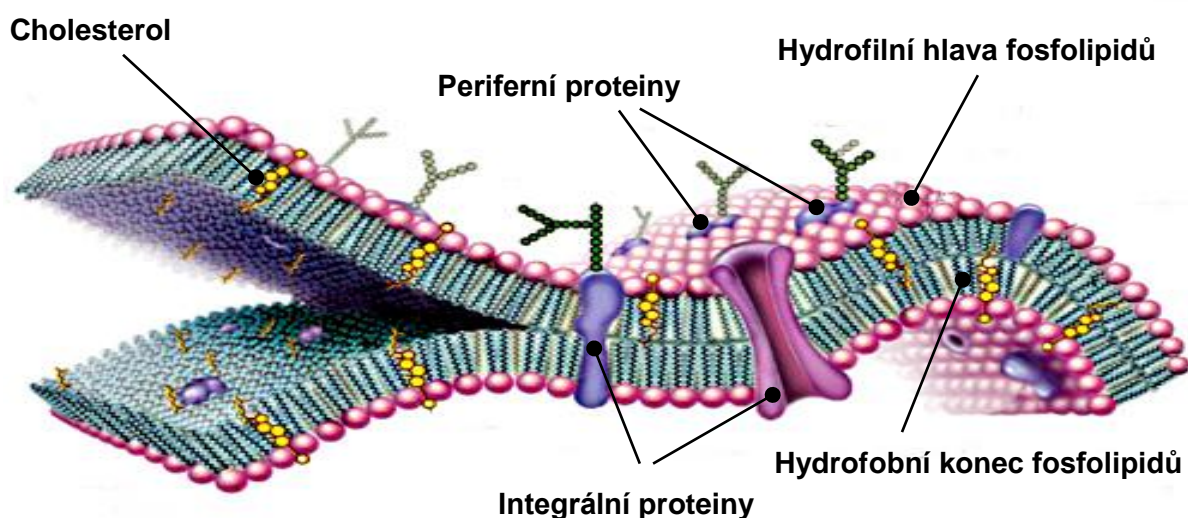
Druhou vrstvou kůže je *dermis*, která představuje integrovaný systém a je 15krát až 40krát tlustší než *epidermis*. Tvoří jej síť kolagenových a elastinových vláken, mezi která jsou naskládané vlasové folikuly, mazové a potní žlázy, krevní a lymfatické cévy. Díky velkému množství cév hraje *dermis* hlavní roli ve výživě buněk epidermu. Chrání tělo před mechanickým zraněním, váže vodu, napomáhá tepelné regulaci a zahrnuje receptory smyslových podnětů. Kolagen tvoří 70 % celkových přítomných proteinů v *dermis* a podílí se hlavně na pružnosti a pevnosti kůže. Elastinová vlákna tvoří jen 2 až 4 % *dermis* a mají vliv na elasticitu a roztažnost kůže. Prostor mezi kolagenovými a elastinovými vlákny je vyplněn *glykoproteiny* a *glykosaminoglykany*. Pokles pružnosti *dermis* je přirozeným projevem stárnutí, kdy vlákna ztrácí svoji elasticitu, pevnost a začínou se skládat do záhybů a vrásek [1, 2, 5].

### 1.1.3. Podkožní tukové vazivo

Třetí a poslední vrstva je *hypodermis*, neboli pojivová tkáň, obsahující tukové buňky. Leží těsně pod *dermis* a hlubšími tkáněmi jako jsou fascie a svaly. Tato vrstva dává pokožce tvar a funguje jako izolátor tepla, tlumič nárazů a nutriční skladiště, kde jsou uloženy živiny, hormony a vitaminy rozpustné v tucích. Vrstva není pevně připojená k povrchu škály, ale je volně vázána na struktury nacházející se pod ní, což dává pokožce mobilitu. *Hypodermis* není přítomná v místech, kde je pokožka tenká, jako jsou víčka očí, bradavky, genitálie apod. Vzhledem k tomu, že fibrózní tkáň *hypodermu* jsou pokračováním pojivových vláken *dermis*, tyto dvě vrstvy nemají mezi sebou viditelnou hranici [1,2].

## 1.2. Buněčná membrána

Tak jako kůže představuje primární bariéru při vstupu látky do organismu, na úrovni jednotlivé buňky tuto bariérovou funkci plní buněčná membrána, která je klíčovým prvkem živé buňky. Lze se setkat s vnější cytoplazmatickou buněčnou membránou, která odděluje buňku od okolního prostředí, a ostatními buněčnými membránami, které jsou součástí různých organel. Vnější buněčná membrána (Obr. 3) je nejtlustší z buněčných membrán, dosahuje šířky 7,5 až 11 nm, a je definována jako tenký film skládající se z fosfolipidů a proteinových molekul, které se mohou v rámci jedné vrstvy relativně volně pohybovat [10].



Obr. 3. Struktura buněčné membrány [3]

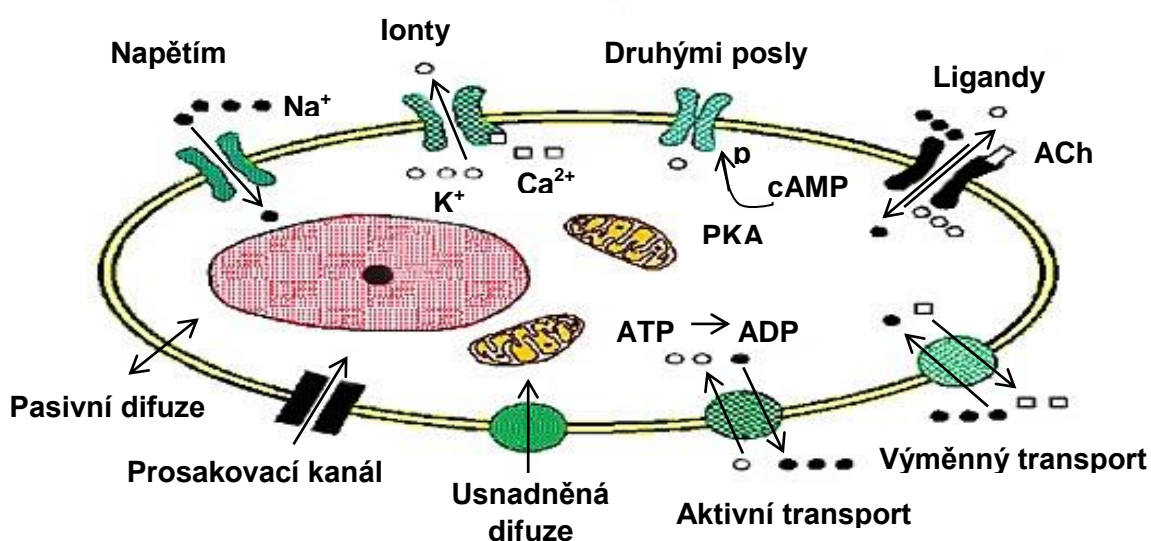


Ve vodném prostředí mají polární lipidy tendenci se samovolně organizovat do tvaru tzv. lipidové dvojvrstvy a působit jako prakticky neproniknutelná bariéra pro mnoho aktivních látek, a to z důvodů specifické struktury fosfolipidů. Každý fosfolipid se skládá z polární části (hydrofilní hlavy) a nepolární lipidové části (hydrofobního konce), díky čemuž má celá membrána amfifilní charakter. V důsledku to znamená, že membrána má povrchovou hydrofilní vrstvu a vnitřní hydrofobní část [8, 9,10].

Membránové proteiny pronikají do lipidové dvojvrstvy a zajišťují řadu specifických procesů, jako je rozpoznávání specifických molekul a jejich transport skrz membránu nebo katalýza membránových reakcí, např. syntéza ATP. Některé proteiny jsou strukturálními jednotkami spojující cytoskelet svou vláknitou aktinovou strukturou, zatímco jiné hrají důležitou roli biosenzorů, které přijímají a přenášejí chemické signály do buněčného prostředí. Podle spojení s membránou je možné proteiny rozdělit na *integrální*, které jsou vázané k membráně silně hydrofobními vazbami, a *periferní*, jež se vážou k povrchu integrálních proteinů obvykle iontovými nebo vodíkovými vazbami. Přibližně 30 % proteinů kódovaných v genomu živočišné buňky reprezentují membránové proteiny. Pokud se vezme v úvahu, že buňka je živý otevřený systém, který vyměňuje s okolím látky, energii i informace, je zřejmé, že izolační schopnost membrán musí být kompenzována určitými mechanismy, které dovolí regulovaně přenášet molekuly a signály dovnitř buňky [8, 9,10].

### 1.3. Transportní procesy

Mezi nejdůležitější funkce vnější buněčné membrány patří řízení transportu částic nebo látek do cytoplazmy a z ní. Například pohyb léčiv v organismu a jejich koncentrace v cílovém místě je primárně závislá na schopnosti molekuly procházet biologickými membránami v těle člověka. V případě transdermální aplikace kosmetického nebo farmaceutického přípravku kůže nejvíc projevuje své bariérové vlastnosti. Některé látky s malou molekulou mohou přecházet přes buněčné bariéry pomocí pórů a nemusejí překračovat membrány, ale to se většiny aktivních farmaceutických ingrediencí netýká. Navíc v organismu je velká řada míst, kde mezi buňkami existují těsné spoje, a přestup póry není možný. Z tohoto důvodu je proces absorpce aktivní látky ve skutečnosti transport přes biologické membrány a je výrazně determinován chemickou podstatou molekuly [6,9]. Schematické zobrazení možných způsobů transportování látek je uvedeno na Obr. 4.



Obr. 4. Možností transportu látek přes membránu [11].

Při klasifikaci transportního procesu je nutné věnovat zvýšenou pozornost energetické charakteristice. Konkrétně zda látka přechází přes membránu ve směru gradientu svého elektrochemického potenciálu nebo proti němu. Podle toho je možné transport rozdělit na pasivní (exergonický) a aktivní (endergonický). Do pasivního transportu patří osmóza, nesespecifická permeace neboli obyčejná difuze a usnadněná difuze (pokud je látka dobře rozpustná v lipidech membrány). Aktivní transport je nejčastěji zprostředkován pomocí specifických nosičů a iontových kanálů [10].

### 1.3.1. Pasivní transport

Difuze je nejčastější a z aplikačního hlediska nejžádanější mechanismus absorpce aktivních látek z kosmetických a léčivých přípravků, protože nevyžaduje dodání energie. Jedná se o jednoduchý proces, který se uplatňuje u většiny aktivních farmaceutických ingrediencí při jejich absorpci, distribuci i eliminaci v organismu. Vzhledem k tomu, že pro experimentální sledování uvolňování aktivních látek byly vybrány syntetické, biologické kožní a umělé kožní Strat M® membrány a celá praktická část diplomové práce byla provedena *in vitro*, je právě pochopení mechanismů pasivního transportu klíčové.

Při pasivní difuzi se uplatňuje Fickův zákon (viz rovnice 1), který říká, že míra přestupu látky je úměrná schopnosti molekuly difundovat (vyjádřené jejím difúzním koeficientem), rozdílu koncentrací látky na opačných stranách membrány, velikosti plochy, přes kterou k přestupu dochází a tloušťce membrány. Difúzní koeficient je závislý na charakteru transportované látky, především na její hydrofobicitě, která určuje rozpustnost látky v membráně [6,10].

$$\frac{1}{A} \times \frac{dn}{d\tau} = -D \frac{\partial c}{\partial x}, [T, p] \quad (1)$$

kde:  $dn/d\tau$  – difuzí způsobená změna látkového množství látky [mol] za jednotku času [s],  
 $A$  – plocha membrány [ $m^2$ ],  
 $D$  – difúzní koeficient [ $m^2/s$ ],  
 $\partial c/\partial x$  – koncentrační gradient [ $mol \cdot m^3/m$ ].

Mechanismus nesespecifické permeace lze popsat následujícím způsobem: během absorpce aktivní látky nejprve koncentrují v kapalině při povrchu membrány. Při následném prostupu skrz buněčnou membránu se molekuly buď rozpouštějí v lipidové vrstvě anebo volí cestu skrz drobné dočasné póry. Pohyb aktivních látek trvá do vyrovnání koncentrací [10, 12].

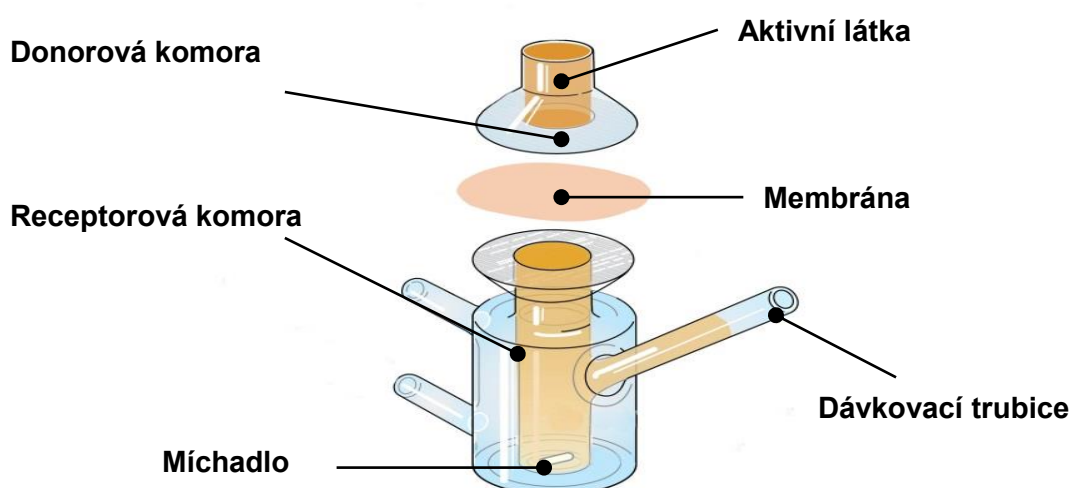
Tok dočasnými póry vychází z přirozené schopnosti lipidové dvojrůstvy dočasně tvořit volná místa, která vznikají intenzivním vnitřním chaotickým pohybem dlouhých fosfolipidových řetězců. Je třeba zdůraznit, že mezery mezi buňkami v *epidermis* vznikají pouze krátkodobě a jsou velice úzké (poloměr pór se pohybuje v rozmezí od 0,4 do 1,0 nm). Přes tyto póry mají možnost projít pouze molekuly o maximální hmotnosti 100 až 150 Daltonů, jako voda, ethanol, močovina, salicylová kyselina atd. [6, 10].

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ METODY

Pro modelování transdermálního transportu v laboratorních podmínkách a ověření penetračních vlastností aktivních látek je v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu hojně využívána metoda difúzních cel. Nezbytnou částí vyhodnocení experimentálně získaných výsledků jsou také analytické metody, jejichž výběr pro potřeby této diplomové práce byl založený především na povaze použitých aktivních látek. V této kapitole shrnuty základní charakteristiky a parametry nastavení použitých experimentálních metod. Vzhledem k využití několika druhů bariérových membrán je zde uveden také jejich základní popis a vlastnosti.

### 2.1. Difúzní experimenty

Difúzní experiment s využitím difúzních cel (Obr. 5) je nejpoužívanější metodou pro simulaci transportu aktivních látek *in vitro*. Výhodou metody difúzního experimentu je jednoduchost aparatury a snadná opakovatelnost. Mezi nevýhody patří časová náročnost experimentu, protože aplikační doba přípravku přímo ovlivňuje délku měření. Franzova difúzní cela představuje jednoduchou aparaturu, která je doporučena organizacemi FDA (z angl. Food and Drug Administration) a OECD (z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development) pro provádění experimentálních testů za účelem měření uvolňování léčivých a aktivních látek z krémů, mastí a gelů.



Obr. 5. Schéma Franzovy difúzní cely [13]

Tato vertikální difúzní cela se skládá z donorové komory, která obsahuje zkušební vzorek, a receptorové komory, která obsahuje vhodné přijímací médium. Tyto komory jsou oddělené membránou, která fyzicky odděluje tyto dvě části Franzovy difúzní cely a zároveň představuje vhodný model studované biologické bariérové vrstvy. Z důvodu zachování ustáleného charakteru difuze a koncentrační homogenity musí být přijímací roztok stále promícháván. Teplota přijímacího média je obvykle nastavena okolo 32 až 35 °C, pro splnění normálních teplotních podmínek případně použité kůže. Odběry vzorků se provádí z dávkovací trubice v nastavených intervalech pro konkrétní experiment, poté je odebrané množství receptorového roztoku analyzováno pomocí vhodných vybraných instrumentálních metod [13].

- **Syntetické porézní membrány**

Nejjednodušším modelem pro studium difuze aktivních látek bez toho, aby se bralo v úvahu specifické chemické složení a struktura kůže, se používají syntetické membrány s definovanou velikostí pórů (např. Nuclepore leptané membrány nebo Cyclopore™ z polykarbonátu). Jako zástupce syntetických membrán v experimentální části diplomové práce byly vybrány membránové filtry firmy Pragopor. Jsou vyrobeny z upravené nitrocelulózy, která poskytuje dobrou odolností vůči kyselinám, zásadám a některým rozpouštědlům. Jedná se o kruhové výseky s velikostí pór 0,23 μm s hmotností v řádech desetin gramu a nízkou hygroskopičností. Umožňuje zachycování i velmi malých částic, mikroorganismů. Dle informace, kterou poskytuje dodavatel, jsou vhodné na použití v mikrobiologii a virologii, farmacii, hygieně, pro stanovení bakteriálního znečištění vody a vzduchu, pro analýzu vody apod. Vzhledem k jejich jednoduché struktuře, byly membrány Pragopor vybrány pro simulaci experimentů transdermálního transportu, protože poskytují výsledky, které nejsou ovlivněné případnými vedlejšími interakcemi studovaných látek s membránou [15].

- **Modelové umělé kožní membrány**

Alternativou k jednoduchým porézním membránám představují syntetické membrány, které berou v úvahu specifické vlastnosti (hydrofobicitu, vrstevnatou strukturu) kůže. Příkladem takové membrány je Strat M®, která byla vybrána pro diplomovou práci. Jejich nespornou výhodou je eliminace testování přípravku na zvířatech. Umělé kožní membrány jsou nástrojem pro simulaci difuze v lidské kůži. Tyto membrány nejsou nikterak toxické a nemají omezení ve skladování, taktéž jsou „humánnější“ z pohledu jejich neživočišného původu. Dle informace od dodavatele, Strat M® jsou určeny pro monitorování libovolných farmaceutických složek, kosmetických aktivních látek, pesticidů a chemikálií. Zároveň je zaručena reprodukovatelnost difúzních dat, což umožňuje neprovádět testování po každém otevření nového balení membrán a porovnat difúzní data z jakéhokoliv časového úseku experimentu. Membrány Strat-M® vykazují v přítomnosti „enhancerů“ rozdílnou permeabilitu a jsou kompatibilní s běžnými formulacemi, jako jsou roztoky, krémy, gely, emulze atd. Každá membrána je jednotlivě balena ve formě předřezaných disků a před použitím nemusí být hydratována. Membránový disk je umístěn do Franzovy cely mezi donorovou a receptorovou komorou stejným způsobem, jako obyčejné kožní membrány [14].



Obr. 6. Strat M® membrány [14]

- **Biologické membrány izolované z živých organismů**

Za ideální biologickou membránu pro testování transdermálního transportu *in vitro* lze považovat lidskou kůži, která může být získána z tkáňové banky anebo od dárců, kterýmiž jsou pacienti při chirurgických operacích. Vzhledem k legislativním omezením a nutnosti písemného souhlasu dárce, ji lze nahradit zvířecí kůží. Použití kůže zvířat (myši, morčat, králíků) je doprovázeno vyšší rychlostí penetraci aktivních látek v porovnání s lidskou kůží kvůli velkému množství vlasových folikul. Nejvhodnějším analogem k lidské kůži je kůže prasečí díky své anatomické, fyziologické a chemické podobnosti [16]. Pro přípravu membrán na provedení difúzních experimentů v této diplomové práci byla vybrána kůže z uší prasat. Podrobný postup jejich přípravy je popsán v kap. 5.4.



## 2.2. UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie je fyzikálně-chemická metoda, která se řadí mezi molekulovou absorpční spektrometrii a je běžně používána v analytické chemii pro kvantitativní stanovení různých analytů, jako jsou např.: ionty přechodných kovů, organických sloučenin nebo biologických makromolekul. Ve spektroskopii jsou nejčastěji stanovovány analyty v roztoku, mohou se ale analyzovat také pevné látky a plyny [17, 18].

Principem UV-VIS spektrofotometrie je měření energie, kterou je vzorek schopen pohltit při průchodu záření. Při absorpci elektromagnetického záření molekulou dochází ke změně elektronového stavu látky a následně k elektronovým přechodům. Nejčastěji je používáno měření absorbance. Její velikost je přímo uměřená koncentraci absorbující látky a tloušťce měřicí kvyety. Výsledkem měření jsou absorpční spektra v grafické podobě vyjádřená jako závislost absorbance na vlnové délce. Další alternativou je graf závislosti transmitance nebo extinkčního koeficientu na vlnové délce. Rozsah vlnových délek UV-VIS spektrofotometrie leží v rozmezí 200 až 800 nm. Díky platnosti Lambert-Beerova zákona (viz rovnice 2) umožňuje tato metoda stanovit koncentraci látek ve zředěných roztocích do koncentrace  $10^{-2}$  mol/dm<sup>3</sup>. U roztoků s koncentrací nad tuto hodnotu je extinkční koeficient závislý na indexu lomu roztoku, a poté už je koncentračně nezávislý. Extinkční koeficient je pro různé látky rozdílný [17, 20].

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (2)$$

kde: A – absorbance,

$\lambda$  – vybraná vlnová délka [nm],

$\varepsilon$  – molární absorpční koeficient dané látky při vybrané vlnové délce [l/cm·mol],

c – koncentrace absorbující látky [mol/l],

l – tloušťka vrstvy [cm].

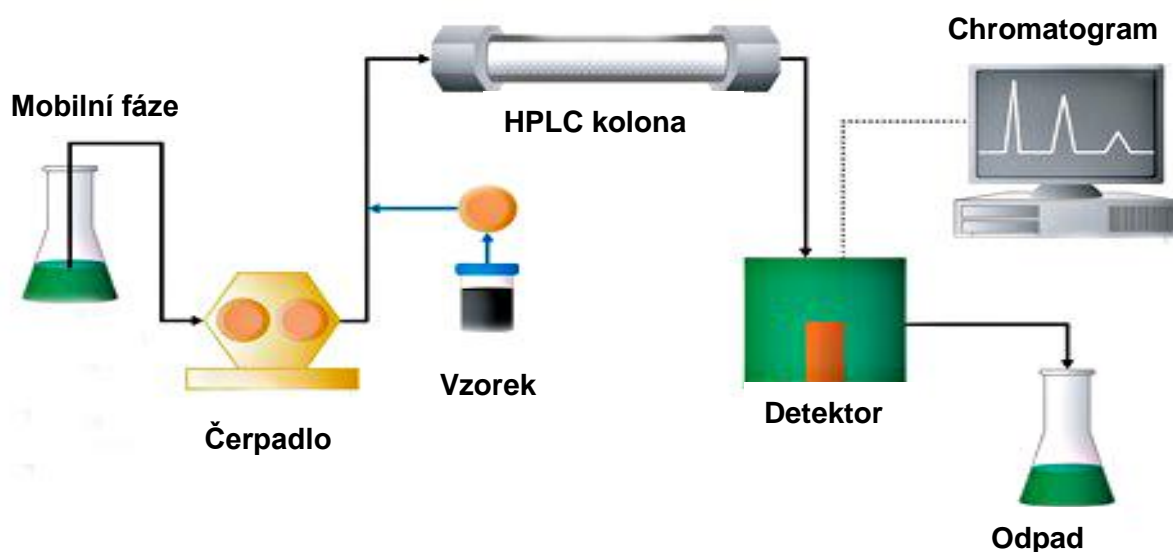
Stanovení koncentrace neznámých látek v roztoku lze provádět dvěma způsoby: metodou standardního přídávku a metodou kalibrační křivky [17, 19]. Při použití metody standardního přídávku se nejprve měří absorbance analytu v roztoku. Následně se koncentrace látky ve vzorku zvýší přesně známým množstvím přidaného standardu a změří se odpovídající absorbance roztoku. Touto metodou lze stanovit analyt ve složitých směsích, ve kterých může docházet k absorpci záření i jinou látkou přítomnou ve vzorku. V praxi to znamená vytvořit sérii roztoků tímto způsobem: první vzorek je tvořen pouze analyzovaným roztokem. Do následujících vzorků je postupně přidáván standard tak, aby jeho přidaný objem tvořil určitou aritmetickou řadu. Následně jsou odměrné baňky s roztoky doplněny rozpouštědlem po rysku. U takto připravených roztoků je změřena jejich absorbance [18, 20].

Druhá metoda kalibrační křivky spočívá v měření absorbance několika kalibračních roztoků o známých koncentracích stanovovaného analytu. Je to poměrně jednoduchý a univerzální způsob. Nevýhodou tohoto stanovení je časová náročnost přípravy řady a potřeba měření většího počtu roztoků. Z naměřených hodnot absorbancí se sestavuje kalibrační křivka, která vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci analytu při zvolené vlnové délce. Mezi nezbytné podmínky analýzy patří použití jednotné vlnové délky a kvyety stejné tloušťky pro všechna měření. Tato metoda může být použita jen pro roztoky s jednoduchým složením. Pomocí rovnice lineární regrese získané z kalibrační křivky lze vyjádřit teoretickou závislost naměřené absorbance vzorku na koncentraci. Vzorec obecné rovnice lineární regrese vychází z Lambert-Beerova zákona [17, 20].

### 2.3. Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (dále HPLC – high pressure liquid chromatography) je v současné době jedním z neúčinnějších nástrojů analytické chemie. Výhody této metody spočívají v možnosti separovat, identifikovat a současně kvantifikovat libovolné sloučeniny, které jsou přítomny v jakémkoliv vzorku, který je rozpuštěn v kapalině. Současná instrumentace dovoluje identifikovat a stanovovat analyty i ve stopových koncentracích. HPLC je univerzální snadno aplikovatelná metoda na téměř jakékoliv látky, mezi něž lze zařadit léčiva, potraviny, kosmetiku, průmyslové chemikálie apod. Schematické zobrazení aparatury pro HPLC je uvedeno na Obr. 7. [25, 26].

Vysokotlaké čerpadlo je využito ke generování a měření specifikovaného průtoku mobilní fáze. Automatický vzorkovač (autosampler) provádí nástřik vzorku do kontinuálně tekoucího proudu mobilní fáze, která ho následně vnáší do HPLC kolony. Kolona obsahuje chromatografickou náplň potřebnou k provedení separace. Během průtoku mobilní fáze se vzorkem, dochází na koloně k zadržování látek následujícím způsobem: každá aktivní látka má specifickou afinitu k stacionární fázi kolony a je na ní odpovídající dobu zadržována. Doba setrvání analytu na koloně závisí na síle vytvořených vazeb mezi jeho molekulami a stacionární fází. Mobilní fáze svým průtokem vymývá z kolony separované analyty v pořadí jejich rostoucí zadržení, které jsou následně přenášeny na vhodný detektor [25, 26].



Obr. 7. Schematické uspořádání HPLC aparatury [25]

Detektor obsahuje průtočnou celu, která detekuje každou látku zvlášť na pozadí mobilní fáze. Detektor je spojen s počítačem a zaznamenává změnu elektrického signálu vznikajícího po převedení detekovaného signálu. Výstupem měření je záznam – chromatogram. Separované látky jsou definovány píky v daném retenčním čase. Retenční čas je doba, kterou stráví analyt v chromatografické koloně. Závisí tedy mimo jiné i na délce použité kolony. Na základě různých fyzikálních či chemických vlastností analytů je vybrán vhodný detektor. Při složitějším složení směsi analyzovaných látek lze použít více detektorů zapojených v sérii. Například, detektor UV-VIS anebo ELSD (z angl. Electrolytic Conductivity Detector) lze použít v kombinaci s hmotnostním spektrometrem pro analýzu výsledků chromatografické separace, které poskytují z jedné injektáže komplexnější informace o analytu [25, 26].

## 2.4. Iontová chromatografie

Iontová chromatografie (dále IC – ion chromatography) je jedna z forem vysokotlaké kapalinové chromatografie, která slouží k separaci, detekci a následnému stanovení množství iontů v roztocích. Princip IC spočívá v interakci molekul analytu iontové povahy s povrchem stacionární fáze, která obsahuje iontové funkční skupiny nesoucí opačný náboj oproti analytu. Iontová chromatografie se řadí do skupiny separačních metod s kapalnou mobilní fází. Podle náboje analytu ji můžeme dále rozdělit na iontovou a kationtovou [21, 23].

Hlavní složkou mobilní fáze (dále MF) je konkurenční ion, který pohání eluci složek vzorku kolonou. Mezi často používané MF patří vodné roztoky solí nebo pufrů, které protékají pevnou stacionární fází umístěnou v koloně ve formě ionexových částic. Důležitými vlastnostmi MF, které ovlivňují separaci, jsou pH, koncentrace a povaha konkurenčního iontu. Vliv na retenční časy má také teplota. Zvýšením teploty dochází ke zkrácení retenčních časů analyzovaných látek. K vytvoření konstantního průtoku mobilní fáze v iontové chromatografii se používá vysokotlaké čerpadlo [22, 23].

Kolona je tzv. srdce jakékoliv chromatografie. Existují dva hlavní typy iontoměničových kolon pro iontovou chromatografii, lišící se stacionární fází, která je nanosená na vnitřní povrch kolony. Nejčastěji je stacionární vrstva tvořena iontoměničem anorganického nebo organického původu, na kterém jsou navázány funkční skupiny. Nejrozšířenější stacionární fáze je vyrobena na bázi silikagelu a modifikovaných organických polymerů. Pro analýzy aniontů se používá silný nebo slabý aniont s kvartérními nebo terciárními amoniiovými skupinami. Separace kationtů probíhá na katexové koloně obsahující sulfonové, silné fosfonové nebo slabé karboxylové skupiny [22,23]. Kolony na bázi křemičitých nosičů nemohou být použity v aniontové chromatografii se supresorem kvůli vysokému pH těchto eluentů. Běžné uhličitanové eluenty mají pH kolem 10, zatímco hydroxidové mají pH blízké 12. Kolony založené na oxidu křemičitém nejsou schopné dlouhodobě snášet pH nad 7,5 a po delší době se rozpouští v alkalických roztocích. Kolony na bázi křemíku jsou určeny pouze pro aniontovou chromatografii bez supresoru [21, 24].

V současné době existuje mnoho typů kolon na bázi polymeru, které mohou snášet mnohem extrémnější podmínky než kolony na bázi oxidu křemičitého. Iontoměničová skupina však musí být hydrofilní, aby se zvýšila selektivita kolony pro hydroxidové ionty a umožnila použití přiměřených koncentrací eluentů. Běžné jsou kolony, jejichž povrch je zpracován methakrylátovými polymery nebo S-DVB (z angl Styrene-divinylbenzene copolymer), díky čemuž je dosažena hydrofilnější povrchová funkčnost a zvýšená účinnost kolony [21, 24].

Nejběžnějším typem detektoru používaným v iontové chromatografii je vodivostní detektor, protože elektrolytická vodivost je univerzální vlastnost sdílená všemi ionty. V některých případech lze použít UV-VIS detektor, který se většinou využívá v systémech bez supresoru. Nevýhodou detekce UV-VIS je to, že jen málo anorganických iontů absorbuje světlo. Vodivostním detektorem prochází eluát přes průtokovou kvetu se dvěma elektrodami, mezi nimiž je aplikován střídavý potenciál. Ve chvíli, kdy ionty vzorku vstupují do měřicí cely detektoru, se zvyšuje schopnost roztoku vést elektrony. Zvýšením proudu se úměrně zvyšuje hodnota vodivosti, anebo závislost vodivosti na koncentraci analytu je lineární. Díky tomu se IC jeví jako vhodná metoda pro rychlé stanovení aniontů anebo kationtů ve směsi [21, 24].

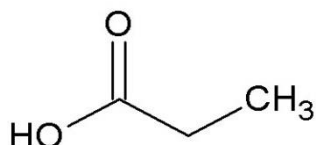
### 3. CHARAKTERIZACE POUŽITÝCH SUROVIN

Tato kapitola podrobně se zabývá vybranými aktivními látkami, které byly použity v rámci realizovaných difúzních experimentů. Aby bylo možné připravit účinnou kombinaci aktivních látek, je nutné se seznámit s fyzikálními a chemickými vlastnostmi zvolených surovin a jejich běžným způsobem použití. Níže uvedené charakteristiky použitých látek se proto zaměřují především na vlastnosti, díky kterým jsou žádané v kosmetickém nebo farmaceutickém odvětví.

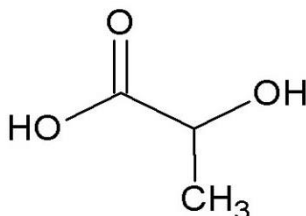
#### 3.1. Alfa-hydroxykyseliny

Alfa-hydroxykyseliny (AHA) byly v kosmetice dlouhou dobu využívány především jako stabilizátory pH, ale v současné době se stále častěji využívány také k redukci pigmentace a poškození pokožky v důsledku působení ultrafialového záření anebo zmírnění projevu stárnutí kůže. Na konci 20. století byly provedeny experimenty dokazující, že tyto kyseliny již při nízkých koncentracích snižují soudržnost korneocytů v *epidermu* [27]. Na základě těchto výsledků byly provedeny další experimenty, během kterých bylo prokázáno, že alfa-hydroxykyseliny vyvolávají odlupování odumřelých buněk z povrchu kůže díky snížení adheze mezi buňkami v horních vrstvách *epidermu*. Tento jev je též znám jako exfoliace. Stimuluje se tak růst nových buněk pokožky, což má za následek omlazenou a svěžejší pleť. Zároveň alfa-hydroxykyseliny vykazují antimikrobiální vlastnosti v závislosti na pH konečného produktu [28,29]. Vzhledem ke všem výše uvedeným vlastnostem byly pro experimenty vybrány tři nejběžnější alfa-hydroxykyseliny: kyselina glykolová, mléčná a jablečná, jejichž struktury jsou uvedené na Obr. 8. Z chemického hlediska se jedná o látky, které obsahují jak alkoholovou, tak zároveň i karboxylovou funkční skupinu.

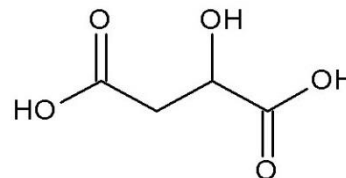
**Kyselina glykolová**



**Kyselina mléčná**



**Kyselina jablečná**



Obr. 8. Zástupci alfa-hydroxykyselin studované v experimentální části této diplomové práce [30]

##### 3.1.1. Kyselina glykolová

Co se týče fyzikálních vlastností, kyselina glykolová je malá organická molekula bez zápachu a barvy. V čistém stavu za normálních podmínek tvoří hygroskopickou krystalickou pevnou látku, která je velmi dobře rozpustná ve vodě. Vykazuje dobrou stabilitu při normálních podmínkách skladování jak samostatně, tak ve finálních přípravcích. Ve farmaceutickém průmyslu se používá jako přídatná složka na úpravu pH v léčivech. Vzhledem ke své schopnosti pronikat skrz kůži nachází kyselina glykolová uplatnění také v produktech pro péči o pleť, kde plní roli aktivní látky. Jedna z teorií týkající se mechanismu exfoliace popisuje vliv kyseliny glykolové na snížení koncentrace iontů vápníku v *epidermis*, což oslabuje vazebné vlastnosti lipidů a způsobuje narušení buněčných adhezí. V kosmetických prostředcích s hodnotami pH do 2,5 se zcela projevuje keratolytický účinek

kyseliny glykolové. Mezi další užitečné vlastnosti patří schopnost potlačovat produkci melaninu díky inhibici tyrozinázové aktivity. Kyselina glykolová ve vysokých koncentracích (70% roztok a více) může způsobit poranění, typická pro silné kyseliny, jako jsou podráždění kůže a očí. Prozatím neexistují žádné údaje pro hodnocení chronické dermální toxicity a karcinogenosti kyseliny glykolové. Dostupné klinické studie potvrzují bezpečnost topické aplikaci výše uvedené látky při nízkých koncentracích [31].

### 3.1.2. Kyselina mléčná

Kyselina mléčná, kterou lze z fyzikálního hlediska charakterizovat jako ve vodě dobře rozpustnou bezbarvou krystalickou látku, rozšiřuje řadu nejjednodušších hydroxykyselin. Nejběžnější způsob přípravy mléčné kyseliny je kvašení cukrů, díky čemuž se její hlavní využití nachází v potravinářském průmyslu. Vzhledem ke svým antiseptickým vlastnostem je hojně používána ve volně prodejných přípravcích pro péči o pleť stejně jako i v profesionálních peelinzích a krémech. Mezi další výhody lze zařadit schopnost v určitém koncentračním rozmezí hydratovat suchou pokožku. V rámci klinických studií bylo zjištěno, že při pravidelném použití má kyselina mléčná tendenci stimulovat obnovu kolagenu a přispívat tím k zlepšení regenerace pokožky. Dále se také podílí na řešení problémů spojených s hyperpigmentací a prvními příznaky stárnutí pleti. Ve farmaceutickém průmyslu se používá pro lokální léčbu *ekzému*, *dermatitidy* a *seborei*. Přestože kyselina mléčná je méně agresivní než kyselina glykolová, její použití může mít podobné vedlejší účinky. Některé studie naznačily, že po aplikaci kosmetického přípravku s kyselinou mléčnou trpěli někteří jedinci zvýšenou citlivostí pokožky na sluneční záření a to i týden po aplikaci. Z pohledu toxicity je kyselina mléčná běžnou složkou lidského těla a některých potravin, proto ji lze za toxickou považovat jen v případě vysoce koncentrovaných roztoků, v nichž je pH menší než 1. V bakteriálních testech taktéž nebyly pozorovány žádné důkazy mutagenity [11, 32, 33].

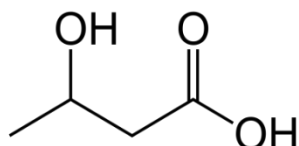
### 3.1.3. Kyselina jablečná

Kyselinou jablečnou lze charakterizovat jako opticky aktivní bezbarvou krystalickou vysoce vodorozpustnou látku, která se vyskytuje v D- a L- stereoizomerických formách. Hodnota specifické optické rotace ve vodných roztocích silně závisí na koncentraci a teplotě. Kyselina jablečná a její deriváty jsou běžně používanými průmyslovými chemikáliemi a jsou úzce spojeny s každodenním životem ve formě potravinářských přísad, kosmetických výrobků, komponentů biologicky rozložitelných polymerů a léčiv [34]. Ve farmaceutických formulacích se tato látka používá jako okyselující, antioxidační, aromatické, pufrovací a chelatační činidlo. Například, L-enantiomer má příchut' jablek a používá se jako ochucovadlo k maskování hořkých chutí. Zároveň lze kyselinu jablečnou použít také jako alternativu kyseliny citronové v šumivých prášcích, ústních vodách a tabletách na čištění zubů. Kromě toho díky svým chelatačním a antioxidačním vlastnostem může být použita ke zpomalení oxidačního procesu rostlinných olejů. Terapeutický efekt byl pozorován u lokálního použití kyseliny jablečné v kombinaci s kyselinou benzoovou a kyselinou salicylovou k léčbě popálenin a ran. Táto látka je klasifikovaná jako netoxická a bezpečná pro použití v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [34, 35].

### 3.2. Beta-hydroxykyseliny

Strukturní rozdíl mezi alfa-hydroxykyselinami a beta-hydroxykyselinami představuje umístění hydroxylové skupiny, díky čemuž molekula nabývá jiných vlastností a je například schopná se rozpouštět v tucích nebo olejích. Důsledkem toho jsou tyto látky schopné pronikat do pórů pokožky, která obsahuje kožní maz a napomáhat odstraňovat odumřelé kožní buňky, které se uvnitř póru mohou hromadit. Vzhledem k této vlastnosti jsou beta-hydroxykyseliny používány především v přípravcích pro problematickou a mastnou pleť se sklony k akné. Běžně se jako zástupce beta-hydroxykyselin v kosmetických přípravcích využívá pouze kyselina salicylová, jejíž transdermální transport byl prozkoumán v bakalářské práci, na kterou tato diplomová práce navazuje [36]. V této práci byla experimentálně potvrzena schopnost kyseliny salicylové procházet kožní membránou. Na základě dosažených výsledků bylo předpokládáno, že i jiná beta-hydroxykyselina může mít podobné penetrační vlastnosti. Ověření této hypotézy představuje jeden z dílčích cílů této diplomové práce.

#### 3.2.1. 3-hydroxybutyrová kyselina



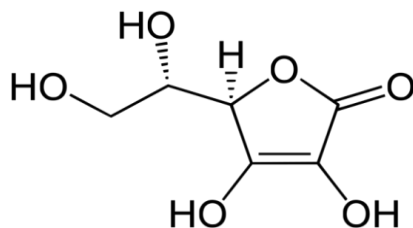
Obr. 9. Struktura 3HB kyseliny [37]

Ve vědeckém světě 3-hydroxybutyrová kyselina, respektive její polymerní forma poly(3-hydroxybutyrová) kyselina, dále (PHB), je často diskutována v rámci problematiky biodegradabilních plastů a jejich zpracování. PHB je jedním z nejatraktivnějších biopolymerních plastů, protože kombinuje užité vlastnosti analogické k petrochemickým plastům (např. polyolefinům) se schopností biodegradace. Zároveň je jeho výroba možná z obnovitelných zdrojů pomocí mikrobiálních biotechnologických procesů, což dělá jeho použití ekologicky atraktivním. Kyselina 3-hydroxybutyrová byla do této diplomové práce vybrána jako další zástupce beta-hydroxykyselin. Jedná se o sloučeninu patřící mezi ketolátky s poměrně malou velikostí molekuly. Je lidskému tělu vlastní a zvýšení hladiny 3HB kyseliny lze stanovovat v krvi při ketóze. U člověka se tato kyselina syntetizuje v játrech z acetyl-CoA a může být využívána mozky jako náhradní zdroj energie, pokud je hladina glukózy v krvi příliš nízká [42, 43]. V této diplomové práci je nastolena otázka, zda má tato látka zároveň potenciál procházet pokožkou případně podporovat transdermální transport jiných aktivních látek. Toto zjištění by mohlo být přínosným poznatkem týkající se dalších potenciálních aplikací 3HB kyseliny.

### 3.3. Vitaminy rozpustné ve vodě

Vitaminy jsou chemické sloučeniny nezbytné pro správné fungování lidského těla a vnitřních procesů, jejichž deficit vyvolává různá onemocnění. Doporučený příjem vitaminů závisí na věku, pohlaví a může se výrazně lišit v průběhu těhotenství či léčby. Při *hypo-* nebo *avitaminóze* nelze všechny vitaminy rychle a v dostatečném množství doplnit do krevního oběhu z přírodních zdrojů. Injektáž vitaminů je často spojena s bolestivostí v místě aplikace. Topické podání vitaminů by mohlo vyřešit tento problém s potenciálem rozšíření následného použití pro jakoukoliv věkovou kategorii. Mohlo by pomoci se vyhnout efektu „prvního průchodu játry“ a zachovat transportovanou molekulu biodostupnou po delší dobu a ve větší míře. Většina vitaminů obecně aktivuje proces obnovy pokožky, vlasů a nehtů, protože se podílejí na metabolismu tuků, sacharidů a bílkovin. Díky těmto vlastnostem jsou vitaminy zajímavými surovinami i pro kosmetický průmysl.

### 3.3.1. Vitamin C – Kyselina askorbová



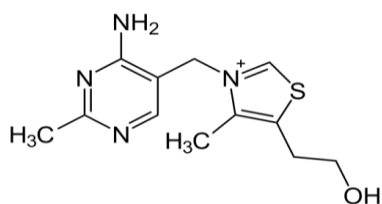
Obr. 10. Struktura kyseliny askorbové [38]

Vitamin C neboli kyselina askorbová je antioxidant dobře rozpustný ve vodě, který je široce používán v různých kosmetických přípravcích. V kůži hraje důležitou roli především při prevenci stárnutí kůže, výskytu vrásek a stimuluje tvorbu nových buněk a kolagenových vláken. Pomáhá chránit pokožku před škodlivými účinky reaktivních forem kyslíku a zabraňuje poškození kůže v důsledku expozice ultrafialovým paprskům. Zároveň má vitamin C schopnost snižovat už vzniklou hyperpigmentaci pomocí inhibice enzymu tyrozinázy.

Mimo to se v lidském organismu podílí na celé řadě biochemických procesů, např. na biosyntéze a síťování kolagenu a také na metabolismu steroidů a aminokyselin [44, 45].

Mezi hlavní funkce vitaminu C v kosmetice patří konzervace kosmetického přípravku, antioxidační účinky vedoucí k neutralizaci volných radikálů. Příkladem jeho antioxidačních účinků je také schopnost redukovat oxidovanou formu vitaminu E. Kombinace těchto dvou vitaminů může být několikrát účinnější díky tomu, že vitamin C je schopen vracet tokoferol do aktivní formy, čímž umožňuje znovu využívat jeho antioxidační vlastnosti. Další pozitivní efekty kyseliny askorbové představuje její keratolytický účinek ve vysoké koncentraci, schopnost bránit pokožku před hyperpigmentací a stimulovat tvorbu kolagenu. Přípravky, které jsou používány na zesvětlení pokožky, mohou obsahovat do 20 % vitaminu C a jejich pH se nachází v extrémně kyselém rozmezí (pH 2,0 až 3,0). Podobné kosmetické přípravky řazené mezi profesionální kosmetiku a mohou ji používat výhradně dermatologové. Největším problémem výroby kosmetických prostředků s vitaminem C je výrazná chemická nestabilita tohoto vitaminu. Mezi faktory, které ovlivňují stabilitu a urychlují degradaci vitaminu C, patří zásadité pH, vysoká teplota, přítomnost kyslíku anebo kovových iontů. Aby se udržela stabilita vitaminu C v kosmetickém přípravku, mělo by pH produktu se pohybovat v hodnotách pod 3,5 [45, 46].

### 3.3.2. Vitamin B1 – Tiamin

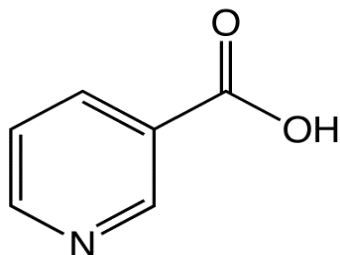


Obr. 11. Struktura tiaminu [39]

Tiamin hraje důležitou roli koenzymu v metabolismu sacharidů. Denní potřeba vitaminu B1 se nachází v rozmezí 1 až 1,2 mg, ale například během těhotenství se může denní dávka mírně zvyšovat. Lidský organizmus nedokáže tiamin syntetizovat *de novo*, a proto musí ho získávat z externích zdrojů. Nejčastějším zdrojem jsou obiloviny a pšeničné klíčky, dále se nachází např. v ovesných vločkách a kvasinkách. V těle člověka

je obvykle zásoba tiaminu, která je schopná udržovat metabolickou potřebu po dobu přibližně dvou týdnů. Tato zásoba může být vyčerpána dlouhodobějším špatným příjmem z potravy nebo prodělaným onemocněním. Ve vodných roztocích je tiamin inaktivován teplem. Produkty jeho rozkladu dodávají jídlu charakteristický masitý zápach. Co se týče fyzikálních vlastností, je to bezbarvá krystalická látka, snadno rozpustná ve vodě, ale nerozpustná v alkoholu. Existuje také v tučích rozpustný analog vitaminu B1, který se nazývá benfotiamin. Vodní roztok tiaminu má specifickou vůni kvůli přítomnosti síry v molekule. V kosmetických přípravcích se používá ve formě soli a často v kombinaci s jinými vitaminy skupiny B [47, 48].

### 3.3.3. Vitamin B3 – Niacin



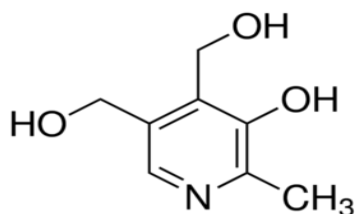
Obr. 12. Struktura niacinu [40]

Vitamin B3 existuje ve dvou formách: jako kyselina nikotinová a nikotinamid. Nachází se v nezpracovaných potravinách a podílí se na biochemických redoxních reakcích. Niacin se často podává orálně za účelem snižování cholesterolu v plazmě, nízkohustotních lipoproteinů a triglyceridů, které jsou spojovány se zdravotními riziky. Kyselina nikotinová pomáhá zvyšovat hladinu lipoproteinů s vysokou hustotou, které mají pozitivní efekt při léčbě pacientů s vysokým cholesterolem v krvi. Niacin je také známý

svou specifickou vlastností při vyšších aplikačních dávkách způsobovat *vazodilataci*. Má schopnost rozšiřovat kapiláry pod kůží, což umožňuje lepší prokrvování, a kůže se stává červenou a svědivou. Tento dočasný efekt se nazývá „niacin flush“, a přestože je nepříjemný, není škodlivý ani dlouhodobý, a ve většině případů tento efekt po hodině odezní a po dalším používání se přestane projevovat. Vázodilatační vlastnosti niacinu jsou často využívány v přípravcích určených ke snižování tlaku. Farmakokinetický profil niacinu užívaného orálně je nepravidelný kvůli nelineárnímu vztahu mezi dávkou niacinu a následnou biodostupností léčiva kvůli metabolismu v játrech. Transdermální podání tohoto vitaminu by výrazně zjednodušilo terapii i takto rizikových onemocnění [49, 50].

Niacinamid (též známý jako nikotinamid) je klíčovou strukturní složkou důležitých koenzymů podílejících se na přenosu vodíku. Mezi ně patří dvě klíčové kódové hydrogenázy: nikotinamidadeninukleotid (NAD) a nikotinamid adeninukleotid fosfát (NADP). Lokální aplikace niacinamidu má stabilizační účinek na funkci epidermální bariéry jako například snížení transepidermální ztráty vody. Niacinamid podporuje syntézu proteinů (např. keratinu), má stimulační účinek na syntézu ceramidů, urychluje diferenciaci keratinocytů a zvyšuje intracelulární hladiny NADP. Lokální aplikace niacinamidu zlepšuje strukturu povrchu stárnoucí pokožky, vyhlazuje vrásky a inhibuje fotokarcinogenezi. Díky prokazatelně prospěšným účinkům se jeví niacinamid jako vhodná složka kosmetických přípravků například pro použití při poruchách funkce epidermální bariéry, pro stárnoucí kůži, pro odstranění pigmentových skvrn nebo pro použití na kůži náchylnou k akné [1, 49].

### 3.3.4. Vitamin B6 – Pyridoxin



Obr. 13. Struktura pyridoxinu [41]

Pyridoxin se často přidává do kompozice produktů pro péči o pokožku, vlasy a do zubních past, a to nejčastěji ve formě rostlinných výtažků. Má nízkou světelnou stabilitu a produkty rozkladu mohou způsobit podráždění kůže. Je schopen proniknout přes horní vrstvy pokožky. Může být použit k léčbě dehydratace kůže, akné, popálenin, způsobených slunečním zářením, jako profylaktické ošetření při svědění

v případě zánětů. Nedostatek pyridoxinu v organismu vede k různým formám dermatitidy, otoku, vypadávání vlasů a křehkosti nehtů. Vitamin B6 mohou zastupovat také pyridoxal s aldehydovou funkční skupinou a pyridoxamin s aminomethylovou skupinou díky tomu, že tyto tři sloučeniny mají stejnou vitaminovou aktivitu a mohou se navzájem transformovat. Typickými zdroji tohoto vitaminu jsou kvasnicový extrakt, mléko, semena a ořechy. V přípravcích na péči o pleť se používá hlavně pyridoxin hydrochlorid [51].



## 4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Vzhledem k nastaveným cílům diplomové práce, mezi které patří návrh a realizace série experimentů s vybranými aktivními látkami, je nutné konfrontovat obecné teoretické předpoklady shrnuté v úvodní části práce s praktickými zkušenostmi a konkrétními experimentálními poznatky zjištěnými v rámci studia aktuální odborné literatury na dané téma. Je zcela běžné, že praktické zkušenosti jsou často v rozporu s teoretickými předpoklady (např. s předpoklady pozitivního efektu aktivních látek u konkrétní kosmetické nebo farmaceutické aplikační formy). Tato kapitola proto předkládá aktuální literární rešerši zaměřenou na experimentální studium transdermálního transportu aktivních látek, která byla použita jako inspirace a teoretické východisko při návrhu praktické experimentální náplně této diplomové práce.

### 4.1. Studium mechanismu působení alfa-hydroxykyselin na kůži

Přestože používání přírodních alfa-hydroxykyselin má dlouholetou tradici, stále se celá řada klinických výzkumů zabývá problematikou jejich transdermálního transportu a mechanismu jejich účinku. Kosmetické přípravky obsahující glykolovou nebo mléčnou kyselinu jsou hojně používaným nechirurgickým prostředkem určeným k regeneraci a omlazení stárnoucí pokožky. Bylo mnohokrát naznačováno, že tyto kyseliny mohou se podílet na zlepšení stavu problematické pokožky, díky svým exfoliačním vlastnostem a schopnosti přispívat k urychlení regeneraci buněk kůže. Různé kosmetické přípravky s koncentrací hydroxykyselin do 20 % jsou volně dostupné v lékárnách a obchodech a jsou vhodné pro každodenní použití. Avšak mechanismus působení kyselin stále není dobře prozkoumán a znám.

Podrobnému studiu mechanismu působení kyseliny glykolové na kůži se věnoval *Moon Sang Eun* a jeho kolektiv, který se zaměřil na účinek kyseliny glykolové na metabolismus kolagenu v souvislosti s procesem tvoření vrásek u myši, v důsledku působení UV záření [52]. Myši byly vystaveny UVB paprskům po dobu deseti týdnů a poté byly topicky ošetřeny 15% kyselinou glykolovou po dobu dalších deseti týdnů. U myši ošetřené kyselinou glykolovou se významně snížil počet vrásek, zvýšila se tloušťka kůže v pozorované regenerační zóně a zvýšilo se množství syntetizovaného kolagenu ve srovnání se skupinou myši ošetřené jen masť na hydrofilní bázi.

Cílem studie skupiny pod vedením *Bertina C.* bylo posoudit o účinnost kombinace retinolu, laktózy a kyseliny glykolové při lokální aplikaci na pokožku, poškozenou slunečním zářením [53]. Byla provedena dvojité slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná klinická studie, do které bylo zařazeno 40 dobrovolnic ve věku 35 až 50 let. Krém obsahující 0,1% retinol, 5% laktózu a 4% kyselinu glykolovou s hodnotou pH 6,4 byl aplikován na jednu stranu obličeje a placebo krém na druhou stranu, a to dvakrát denně po dobu 12 týdnů. Repliky z oblasti ošetřené kůže byly odebrány za použití silikonového kaučuku a byly analyzovány pomocí videokamery s vysokým rozlišením. Pro vyhodnocení mikroreliefu byla provedena *biopsie* z obou stran obličeje každého dobrovolníka a poté získané vzorky kůže byly vyšetřeny pomocí optické mikroskopie. Jak klinické hodnocení, tak objektivní instrumentální měření odhalila, že na části obličeje léčené krémem s aktivní směsí na konci studie významně klesl celkový počet vrásek ve srovnání se stranou léčenou placebo krémem.

*Wang Chun Min* a jeho vědecká skupina se rozhodli zhodnotit účinnost a bezpečnost peelingových přípravků s obsahem kyseliny glykolové [54]. Pro provedení experimentu bylo vybráno 40 dobrovolníků se středně těžkou až těžkou formou akné, kteří byli rozděleni do dvou skupin podle stupně mastnoty pokožky. Jedna skupina byla ošetřena čtyřikrát peelingem s kyselinou glykolovou o koncentraci 35 %, druhá o koncentraci 50 %. Zároveň během studie dobrovolníci také používali produkty pro domácí péči s obsahem 15% glykolové kyseliny. Zlepšení stavu pokožky s akné a jinými kožními problémy byly klinicky posouzeny lékařem i subjektivně samotným pacientem. Bylo zaznamenáno významné zlepšení *komedonů, papul a pustul*. Textura kůže každého kandidáta byla rychle obnovena. Ke zjevnému zlepšení jizev po akné byla nutná důsledná a opakovaná léčba kyselinou glykolovou, při které se zároveň zmenšily póry. Většina dobrovolníků měla mnohem jasnější a světlejší pleť, vedlejší účinky se vyvinuly pouze u nízkého počtu testovaných pacientů.

Cílem studie *Abelsa Christopha* bylo prozkoumat emulzi typu olej ve vodě obsahující 10% kyselinu glykolovou s výsledným pH v hodnotě 4, jako monoterapii pro pleť s akné, s ohledem na klinickou účinnost a snášenlivost po dobu 90 dnů [55]. Do této dvojité slepé, placebem kontrolované, randomizované studie bylo zahrnuto 120 pacientů trpících mírným akné ve věku od 12 do 53 let. Krém byl aplikován jednou denně. Během provedení experimentu nebyly použity žádné další léčivé přípravky. Pokožka s akné se významně zlepšila po uplynutí 90 dnů. Již po 45 dnech byl stanoven statisticky významný rozdíl mezi skupinou, která používala emulzi s kyselinou glykolovou, oproti placebo-skupině. Subjektivní hodnocení lékařů a pacientů ohledně klinické účinnosti a snášenlivosti bylo taktéž pozitivní.

*Okuda M.* ve své studii hodnotil potenciál *in vitro* pronikání kyseliny mléčné a kyseliny jablečné do kůže ze smyvateľných produktů pro osobní péči v porovnání s referenčním přípravkem s obsahem 10% glykolové kyseliny (pH 3,5) [56]. Šampon, kondicionér a pleťové mléko obohacené radioaktivně značenou alfa-hydroxykyselinou byly rovnoměrně aplikované na rozmraženou kožní membránu, která byla odebrána od zesnulých dárců. Experiment byl proveden pomocí vertikálních difúzních cell. Doba působení smyvateľných produktů byla do 3 min. Epidermální penetrace kyseliny jablečné a kyseliny mléčné z šamponu a kondicionéru byla zanedbatelná, více než 99 % se odstraní oplachováním, stejně tak zanedbatelná část zbývala ve *stratum corneum*. Referenční vzorek byl nanesen na kůži po dobu 24 hodin a penetrace kyseliny glykolové byla značně vyšší. Bylo potvrzeno, že dermální penetrace kyselin do lidské kůže je závislá na pH, na koncentraci, a především na aplikační době. Alfa-hydroxykyseliny v šamponech a kondicionérech jsou téměř zcela smyvateľné z pokožky během několikaminutového oplachování.

#### **4.2. Aktuální souhrn studií orientovaných na kyselinu 3-hydroxybutyrovou**

V současné době nejsou autorce práce známe žádné studie s konkrétním zaměřením na kosmetickou, resp. farmaceutickou aplikaci kyseliny 3-hydroxybutyrové jako aktivní látky. Většina publikovaných prací je zaměřena na 3HB kyselinu jako součást polymerních matic, přičemž transdermální transport těchto materiálů se studuje především z hlediska jejich využití v nosičových systémech pro cílenou distribuci léčiv.

Jako příklad může sloužit studie *Eke G.*, jejímž cílem bylo vyvinout nosiči léčiv na bázi PHBV (kopolymer poly(3hydroxybutyrát-co-3hydroxyvalerát) a zároveň prostudovat penetraci těchto částic do, resp. přes kůži [57]. Mikročástice a nanočástice PHBV kulového tvaru

byly připraveny o/w emulzní metodou a obarveny fluorescenčním barvivem Nile Red. Pomocí odstředění byly připraveny frakce s částicemi různých velikostí. Topografie částic byla studována pomocí SEM, průměr velikosti částic a její distribuce byly stanoveny použitím analyzátoru velikosti částic. Test životaschopnosti buněk (MTT) byl proveden za použití fibroblastické buněčné linie a penetrace částic do buňky byly studovány na modelu myši kůže. Reakce pokožky byla hodnocena histologicky a množství PHBV v kůži bylo stanoveno plynovou chromatografií s MS detektorem. Studie *in vitro* ukázaly, že buňky měly normální růstový trend, MTT nevykazoval žádnou toxicitu částic. Bylo stanoveno, že částice PHBV o velikosti 166 nm a 426 nm prostoupily buněčnou membránou, a histologické testy neodhalily žádné nepříznivé účinky. S ohledem na tyto údaje je možné posoudit, že mikročástice PHBV s malou velikostí mají potenciál a mohou sloužit jako lokální transdermální nosiče aktivních látek.

Podařilo se najít jednu studii [58], která byla provedena v roce 2019, zaměřenou na biomedicínské aplikace. *Ma Linlin* a její vědecká skupina se zabývala ověřením antibakteriálních a protiplísňových vlastností u PHB oligomeru. Oligomery PHB (E-PHB) byly získány extrakcí z biologického práškového PHB a byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Byly provedeny antimikrobiální testy proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* a plísni *Candida albicans* s použitím PHB oligomeru s nízkým stupněm polymerizace (8–15) a PHB prášku s vysokým polymerizačním stupněm (10 000–20 000). Bylo stanoveno, že prášek PHB nevykazoval žádný baktericidní účinek, ale oligomery prokázaly vynikající antimikrobiální účinek. Po 18 hodinách inkubace se počet bakteriálních kolonií ošetřených PHB oligomerem se snížil na nulu. Bylo prokázáno, že stupeň polymerace je důležitým faktorem ovlivňujícím antibakteriální vlastnosti PHB, a že snížení stupně polymerizace zvyšuje antibakteriální vlastnosti PHB. Fyziologická toxicita nebyla prokázána a získané výsledky naznačují, že PHB oligomer je slibným kandidátem pro využití v biomedicínském odvětví.

### 4.3. Současná studia zaměřená na topické aplikace niacinu

Jak už bylo uvedeno v předchozí kapitole, niacin představuje vysoce účinné léčivo, které hraje důležitou roli v regulaci lipidů a je za tímto účelem široce klinicky využíván. Avšak i přes úspěšné formulace je perorální podávání tablet obsahující niacin stále spojeno s nepříjemnými vedlejšími účinky: jaterní toxicitou, začervenáním pokožky, návaly horka apod. Ve snaze snížit tyto nepříznivé účinky byly studovány alternativní způsoby dodání niacinu, mezi něž patří i řízené uvolňování, případně i metabolická změna aktivní látky na léčivo uvnitř těla. Transdermální podání niacinu vypadá slibně, a proto může být řešením ke snížení vedlejších účinků a k udržení stálých terapeutických hladin aktivní látky v krvi po delší dobu [59].

Cílem studie popsané v referenci [60] bylo vyvinout optimální formulaci a následně vybrat vhodný prostředek pro transdermální dodávání vysoce lipofilních proléčiv kyseliny nikotinové. Jako experimentální aktivní látky byly použity dodecylnikotinát a myristylnikotinát, určené k podávání kyseliny nikotinové přes kůži bez vedlejších účinků, jako je vazodilatace. Navržená formulace byla založena na mikroemulzním systému s přidavkem látky zvyšující penetraci. Mikroemulzní systém byl složen z isopropylmyristátu (IPM), vody a směsi Labrasolu a Peceolu 4:1 (W/W). Mikroemulzní formulace s různými poměry složek byly charakterizovány stanovením vodivosti, pH, velikosti částic, viskozity a indexu lomu. Podle analýzy velikosti částic, konduktivity a viskozity byly vytvořeny mikroemulzní formulace typu olej ve vodě. Transdermální permeabilita kyseliny nikotinové a jejich proléčiv

byla studovaná *in vitro* za použití Franzových difúzních cell a biologické membrány z myší kůže. Koncentrace kyseliny nikotinové byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Vybrané formulace se zdály jako slibné pro vývoj transdermálního systému dodávání kyseliny nikotinové, avšak dodecylnikotinát vykazoval lepší výsledky a mohl by být využitý v systémech pro řízené uvolňování niacinu s příjemným bonusem ve formě zvýšení stability léčiva a usnadnění výroby ve větším měřítku.

*Jacobson Elaine* ve své studii demonstruje, jak modifikace niacinu s mastnými alkoholy umožňuje vitaminu proniknout přes kůži kontrolovaným způsobem [61]. Estery kyseliny nikotinové byly připraveny zpracováním chloridu nikotinylu s triethylaminem (TEA), dimethylaminopyridinem (DMAP) a různými alkoholy pod inertní atmosférou (dusík). Pro experiment byly použity samice myší bez srsti. Každý den bylo na záda myší nanášeno 200 mg přípravku. Následně zvířata byla usmrcena pentobarbitalem před odběrem vzorků kůže. Ventrální vzorky kůže byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ukázalo se, že estery kyseliny nikotinové s hodnotami  $\log P$  (*lipofilita*) mezi 6,0 až 8,0 jsou výhodnými sloučeninami pro transdermální dodání niacinu.

Methylnikotinát (MN) může vyvolávat lokální kožní erytém (přechodné zarudnutí, začervenání či vyrážku pleti) a proto může být použit u lokálních provokačních testů zaměřených na hodnocení mikrocirkulace a životaschopnosti kůže. Cílem studie publikované v [62] bylo ověřit účinky zvyšujících se dávek MN, najít koncentraci, která poskytuje nejvíce reprodukovatelný účinek. Mikrovaskulární odezvy na topicky aplikovaný MN v různých koncentracích byly měřeny u 12 subjektů pomocí laserové interferometrie s využitím kontrastu speklí (LSCI). Účinky MN byly měřeny na čtyřech různých místech těla, které jsou podrobně popsány uvedené studii. Při koncentraci aktivní látky 5 mmol/l, 10 mmol/l a 20 mmol/l byla reakce na MN nejvíce reprodukovatelná a vedla k plató odezvy v průběhu 20 minut po aplikaci. Rozdíly v *perfuzi* při aplikaci na čtyři různá místa nebyly nikterak významné.

Další ze studií se věnovala posouzení účinnosti a bezpečnosti aplikaci laserového pulzu o vlnové délce 595 nm po předchozí topické aplikaci niacinového krému [63]. Bylo zhodnoceno celkem 25 korejských pacientů s erytémem obličeje, kteří byli po nanášení niacinového krému na nemocnou část kůže třikrát ošetřeni laserovým pulzem. Výsledky u 12 z 25 pacientů prokázaly výrazné klinické zlepšení přítomného erytému obličeje. Jen u dvou pacientů nedošlo k žádnému zlepšení. Bylo zjištěno, že reakce pokožky na niacinový krém byla výrazně snížena u 64 % pacientů po aplikaci laserového pulzu. U většiny pacientů byl zaznamenán minimální pooperační otok obličeje, který obvykle samovolně ustoupil do 2 dnů.

#### 4.4. Přehled studií zaměřených na transdermální podání tiaminu

Další vědecká skupina realizovala studii, jejímž cílem bylo zhodnotit efektivitu transdermálního dodání benfotiaminu (BFT) jako potenciálního způsobu podání modifikovaného tiaminu pro léčbu diabetické periferní neuropatie [64]. Perorální podání benfotiaminu (BFT) bylo posouzeno za nadějně na základě výsledků studie, při níž bylo morčatům aplikováno na pokožku 10 mg BFT. Hladiny tiaminu, thiaminmonofosfátu, thiaminu difosfátu, benzoylthiaminu a BFT byly měřeny v krvi, kůži a svalech v různých časech během 24 hodin. Po uplynutí jednoho dne byla hladina tiaminu zvýšena 10krát v krvi, více než 7krát v kůži a téměř 4krát ve svalech ve srovnání s neléčenými zvířaty. Toto silné zvýšení hladin tiaminu v tkáni a hladin metabolických derivátů tiaminu stanovených v krvi

a lokálních tkáních po jedné dávce naznačuje, že lokálně aplikovaný BFT je potenciálně úspěšným a výhodným způsobem dodávání aktivní látky pro léčbu diabetické periferní neuropatie.

Hydrochlorid tiaminu byl navržen jako přírodní, bezpečná a účinná alternativa chemickým repelentům. Bylo nutné vyhodnotit minimální požadovanou dávku, která by byla dostatečná k provedení lokálního odpuzování hmyzu na lidské kůži. Účelem práce [65] bylo stanovit křivku závislosti účinku na dávce, z níž následně byla vypočítána efektivní dávka (ED). Na předloktí dospělých dobrovolníků byla aplikována řada zvyšujících se koncentrací hydrochloridu thiaminu a následně byl spočítán počet kousnutí, podle kterých byla stanovena procenta odpudivosti. Následně byla vypočítána minimální účinná dávka, která odpovídá 344 mg tiaminu. Jak navrhuji autoři práce, toto zjištění by mělo být ještě podpořeno budoucími studiemi, ve kterých by bylo třeba také navrhnout správnou formulaci thiaminu hydrochloridu v příslušných dávkách.

Transdermální transport disulfidu tiaminu (TDS) byl studován *in vitro* ze směsi s propylenglykolem přes kožní membránu z krysí kůže v práci [66]. Rovněž byl studován vliv použití nasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, jako jsou kyselina stearová, kyselina myristová a kyselina laurová na rychlost transportu aktivní látky. Rychlost difuze TDS skrz kůži ze směsi s propylenglykolem byla stanovena na 2,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ . Tok aktivní látky byl zvýšen 31krát při použití kyseliny laurové a 1,4krát v kombinaci s kyselinou myristovou. Ve směsi s kyselinou stearovou transport TDS byl potlačen na 80 % své původní hodnoty. Absorpci TDS nebylo možné vysvětlit pronikáním přes připravenou membránu, ale nejspíše interakcí mezi TDS a mastnými kyselinami, které mohly systémem ovlivnit. Výsledky ukazují možnost vývoje transdermálního systému pro podávání tiaminu.

#### 4.5. Kyselina askorbová a její využití v kosmetickém odvětví

Antioxidanty chrání pokožku před reaktivními formami kyslíku, které jsou fotochemicky generovány ultrafialovým světlem a mají za následek karcinogenní a fotografické změny v kůži. Cílem studie pod vedením *Sheldone Pinelle* bylo definovat vhodnou formulaci pro topické podání kyseliny askorbové, která by mohla doplňovat přirozený antioxidační rezervoár pokožky [67]. Vitamin C a jeho deriváty byly aplikovány na kůži prasat pro simulaci transdermálního transportu a následně byla změřena hladina aktivní látky v kůži. Bylo stanoveno, že kyselina askorbová musí být formulována při hladinách pH nižších než 3,5, aby byla schopna vstoupit do kůže. Optimální koncentrace pro maximální percutánní absorpci byla stanovena 20 %. Ukázalo se, že kůže byla nasycena po uplynutí třech dnů a čas vymizení aktivní látky z tkáně činil ještě dalších osm dní. Deriváty kyseliny askorbové, včetně fosforečnanu horečnatého, askorbyl-6-palmitátu a kyseliny dehydroaskorbové, nezvyšovaly hladinu kyseliny askorbové v kůži. Bylo stanoveno, že topické podávání kyseliny askorbové do kůže je kriticky závislé na charakteristikách formulace, jako je pH a koncentrace.

Relativně vysoká permeabilita vitamínu C byla experimentálně potvrzena také v průběhu jiného experimentu [68], jehož autoři vysvětlují vysokou propustnost pro vitamin C specifickým proteinovým složením horní vrstvy *epidermu*. Nejprve byly zkoumány permeační vlastnosti vitamínu C přes kůži za použití připravených kožních membrán z kůže myší. Pomocí tohoto modelu byly stanoveny fyzikálně-chemické vlastnosti vitamínu C, jako je schopnost difundovat a rozpustnost horní vrstvě *epidermis* a *dermis*, čímž byla potvrzena vysoká míra propustnosti vitamínu C. Metoda diferenciální skenovací kalorimetrie

byla použita ke zkoumání účinku vitamínu C na vrstvu *stratum corneum*. Bylo zjištěno, že vitamin C rychle proniká kůží, a to i nehledě na jeho nízkou lipofilnost. DSC profil vykazoval čtyři velmi výrazné přechody, které byly spojeny s interakcí vitamínu C s proteiny přítomnými v kůži. Vyšší pozorovaná permeační rychlost vitamínu C mohla být způsobena jeho příznivým účinkem na hydratační kapacitu kůže a schopnosti interagovat s proteiny ve vrstvě *stratum corneum*.

Vitamin C je také známý svojí metabolickou aktivitou v biosyntetické dráze kolagenu. Ve studii [69] byly zároveň prokázány protektivní vlastnosti vůči slunečnímu záření u topicky aplikovaného vitamínu C, což tuto molekulu charakterizuje jako potenciálního kandidáta pro prevenci a léčbu stárnoucí kůže. V rámci další klinické studie byl topicky aplikován krém obsahující 5 % vitamínu C na zdravé dobrovolníky s příznaky stárnutí pokožky na ruce a krku, aby se mohla vyhodnotit účinnost a bezpečnost podobné léčby. V průběhu 6 měsíců byla provedena dvojitě slepá, randomizovaná studie, která porovnávala účinek krému obsahující vitamín C s referenčním vzorkem. Experiment zahrnoval hodnocení na začátku výzkumu, po 3 a po 6 měsících každodenní léčby. Hodnocení bylo provedeno lékařem a porovnáno se subjektivním hodnocením dobrovolníků. Parametry reliéfu kůže byly stanoveny na replikách silikonového kaučuku prováděných ve stejných časových intervalech. Na konci experimentální studie byla provedena kožní biopsie a získané vzorky byly vyšetřeny pomocí imunohistochemických metod a elektronové mikroskopie. Klinické vyšetření provedené dermatologem i sebehodnocení dobrovolníků odhalilo významné zlepšení pokožky, která byla ošetřena vitamínem C, ve srovnání s kontrolním vzorkem. Bylo prokázáno velmi významné zvýšení hustoty kožního mikroreliefu a snížení hlubokých rýh. Byly získány také ultrastrukturální důkazy o zvýšení elasticity tkáně, které potvrdily příznivé výsledky klinických a kožních vyšetření. Lokální aplikace 5% krému s obsahem vitamínu C vypadá jako účinná a bezbolestná léčba, která může přivést k zjevnému zlepšení stárnoucí kůže a vyvolat změny její struktury.

Účelem studie bylo zjistit, zda kombinace vitamínů C a E přispívá k ochraně před UV zářením a porovnat získané výsledky s ekvivalentním experimentem při topické aplikaci přípravků s obsahem vitamínu C nebo E odděleně [70]. Byl vyvinut stabilní vodný roztok 15% kyseliny L-askorbové a 1% alfa-tokoferolu. Difúzní experiment byl realizován prostřednictvím opakované aplikace přípravku na kůži prasat v průběhu 4 dnů jednou denně. Pokožka byla následně vystavena působení solárního simulátoru s vlnovou délkou 295 nm. V průběhu 5. dne experimentu byl stanoven antioxidační ochranný faktor a posouzena přítomnost erytému a případných spálenin. Kombinace 15% L-askorbové kyseliny a 1% alfa-tokoferolu poskytla významnou ochranu proti tvorbě erytému a spálení buněk; protektivní vlastnosti měly také i přípravky s obsahem jen jednoho vitamínu, ale kombinace projevila lepší vlastnosti. Aplikace během čtyř dnů progresivně ochránila pokožku a poskytla čtyřnásobný antioxidační ochranný faktor. Bylo prokázáno, že kombinací vitamínů C a E v jednom přípravku lze získat účinné ochrany proti slunečnímu záření.

#### **4.6. Studia transdermálního transportu pyridoxinu**

V rámci studie [71] byly testována účinnost kosmetických přípravků s nikotinamidem (vitamin B3), pyridoxin tris-hexyldekanoátem (derivátem vitamínu B6) a kyselinou zinečnatou v rámci léčby akné. V průběhu studie byla hodnocena klinická účinnost přípravků, jejich kompatibilita s kůží a senzorické vlastnosti. Připravená formulace byla aplikována dvakrát denně po dobu šesti týdnů na obličej 16 dobrovolníkům. Před ošetřením a po něm byla pokožka hodnocena pomocí biofyzikálních technik. Byl stanoven obsah vody ve *stratum*

*corneum* použitím Corneometru®, transepidermální ztráta vody (TEWL) byla stanovena pomocí Tewametu® a vyhodnocení zánětlivých procesů v pokožce bylo provedeno prostřednictvím videoanalýzy pleti Visioface®. Zánětlivé procesy v pokožce byly po aplikaci formulace sníženy o 60 %. Výsledky ukázaly, že u většiny dobrovolníků byla prokázána redukce akné, zároveň byla potvrzena kompatibilita s kůží a vyvrácena *komedogenita* přípravku. Experimentální formulace nenarušila funkce kožní bariéry, což ukazuje její účinnost při léčbě akné bez nežádoucích účinků. Připravenou kombinaci lze považovat za bezpečnou a účinnou alternativní léčbu pro mírně zánětlivou kůži.

Existuje také patentovaná farmaceutická kompozice pro transdermální podání směsí obsahující doxylamin a pyridoxin, jejich soli nebo aktivní metabolity, které jsou začleněny do transdermálních dodávacích systémů nebo transdermálních náplastí. Vynález nabízí způsob léčby „mořské nemoci“, nevolnosti a zvracení především pro těhotné ženy. Kontinuální transdermální dodávání doxylaminu a pyridoxinu lze dosáhnout aplikací transdermální náplasti na povrch kůže, přičemž výměna náplasti může probíhat v závislosti na intenzitě symptomu minimálně jednou za týden [72].

Biologická dostupnost vitaminů rozpustných v tucích a ve vodě je kritickým problémem pro přípravky určené k omlazení nebo ochraně pokožky. Během 17denního experimentu popsáno v referenci [73] byl prozkoumán účinek citronového esenciálního oleje na zlepšení penetrace alfa-tokoferolu, retinylacetátu, pyridoxinu a kyseliny askorbové. Vybrané aktivní látky byly zakomponované do emulzí o/w a w/o, a jejich transport byl proveden skrz lidský rekonstruovaný *epidermis* SkinEthic při 34 °C. Nalezené koeficienty propustnosti jsou podrobněji popsány v originálním článku. Penetrace pyridoxinu byla 4krát zvýšená v přítomnosti citronového esenciálního oleje. Tímto se potvrdilo, že citronové esenciální oleje mohou být považované za bezpečný a účinný prostředek pro zvýšení penetrace vitaminů ve formulacích určených k topickým aplikacím.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Na základě poznatků z literární rešerše zpracované v předchozí kapitole zaměřené na současný stav řešené problematiky byla navržena experimentální náplň praktické části diplomové práce. Její první část se zabývala posouzením potenciálu využití hydroxykyselin jako samostatných aktivních látek pro kosmetické a farmaceutické aplikace. Cílem bylo experimentálně prozkoumat transdermální transport známých používaných hydroxykyselin, a to v současnosti v těchto odvětvích již využívaných i dosud za tímto účelem netestovaných. Druhá linie experimentální části práce byla následně zaměřena na posouzení vlivu přítomnosti hydroxykyselin na transdermální transport vybraných vodorozpuštěných vitaminů.

### 5.1. Použité chemikálie

Acetonitrile	Sigma–Aldrich; CAS 75–05–8, p.a ≥ 99.8 %
Dihydrogenfosforečnan draselný $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma–Aldrich; CAS 7778–77–0, p.a ≥ 99.0 %
Etanol farmaceutický	BDH Prolabo–VWR International; p.a. 100,0 %
Gelotvorné činidlo Carbomer 934	3V SIGMA s.p.a. Sigma–Aldrich
Chlorid lithný LiCl	Sigma–Aldrich; CAS 7447–41–8, p.a ≥ 99.99 %
Chlorid sodný NaCl	LACH–NER s.r.o.; CAS: 7647–14–5; p.a. 99,5%
Kyselina askorbová	Farmaceutická firma DARNICA (Ukraina)
Kyselina fosforečná $\text{H}_3\text{PO}_4$	Sigma–Aldrich; CAS 7664–38–2 p.a ≥ 85.0 %
Kyselina glykolová	Sigma–Aldrich; CAS 79–14–1, p.a ≥ 98.0 %
Kyselina chloristá $\text{HClO}_4$	Sigma–Aldrich; CAS 7601–90–3, p.a ≥ 80.0 %
Kyselina L-jablečná	Sigma–Aldrich, CAS 97–67–6, p.a ≥ 99.0 %
Kyselina mléčná	Sigma–Aldrich; CAS: 50–21–5; 85 % (w/w)
Lukosan M14 – inertní silikónová pasta	Lučební závody a.s. Kolín
Niacin 1%	Farmaceutická firma DARNICA (Ukraina)
Riboflavin 5%	Farmaceutická firma DARNICA (Ukraina)
Sonogel na ultrazvuk	GelPol USG
Tiamin hydrochlorid 5%	Farmaceutická firma DARNICA (Ukraina)
Ultra čistá voda	Vygenerovaná systémem ELGA PureLab

### 5.2. Použité přístroje

Analytické váhy	SBC 31 SCALTEC
Franzova cela (otvor 20 mm)	Permegear, SES GmbH–Analysesysteme
Chirurgický skalpel	Medin
Injekční stříkačka 5ml	Chirana
Iontový chromatograf	Metrohm 930 Copract IC Flex
Jehly (0,5–40 mm)	Sterican
Jehly (0,8–120 mm)	Sterican
Kapalinový chromatograf	Agilent 1200 HPLC
Lednička	Gorenje
Membránové filtry (50 mm; 0,23 $\mu\text{m}$ )	Pragopor 8; Pragochema
pH metr SevenEasy	METTLER TOLEDO
Umele kožní membrány (Strat M ®)	Merck
UV-VIS spektrometr	Hitachi U3900
Vícemístné magnetické míchadlo	Variomag POLY



### 5.3. Příprava zásobních roztoků

#### **Modelový přijímací roztok pro difúzní experimenty**

Jako přijímací roztok ve Franzových difúzních celách byl z důvodu simulace fyziologických podmínek a zároveň za účelem regulace osmotického tlaku na obou stranách membrány v difúzní aparatuře použit 0,15 mol/dm<sup>3</sup> roztok NaCl. Pro přípravu zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,15 mol/dm<sup>3</sup> bylo rozpuštěno 8,8 g NaCl v 1 dm<sup>3</sup> destilované vody.

#### **Roztoky alfa-hydroxykyselin**

Roztoky alfa-hydroxykyselin byly připraveny vždy o koncentraci 15 % tak, že v odměrné baňce o objemu 100 ml bylo rozpuštěno známé množství (cca 15 g) vybrané kyseliny v deionizované vodě. Roztok byl označen jako *zkoumadlo* s expirací 1 měsíc, uchováván v ledničce. Před každým použitím takto připravený roztok byl vytemperován na laboratorní teplotu a dobře promíchán.

#### **Mobilní fáze pro iontovou chromatografii**

Pro každou analýzu byly vždy připraveny čerstvé roztoky mobilní fáze. Na přípravu 1 dm<sup>3</sup> mobilní fáze o koncentraci 10<sup>-2</sup> mol/dm<sup>3</sup> LiCl bylo použito 0,42 g chloridu lithného o molární hmotnosti 42,39 g/mol. Na přípravu 2 dm<sup>3</sup> mobilní fáze o koncentraci 5·10<sup>-4</sup> mol/dm<sup>3</sup> HClO<sub>4</sub> bylo vždy použito 0,086 ml 70% kyseliny chloristé. Roztok mobilní fáze byl před použitím důkladně promíchán, zfiltrován a odplyněn pomocí ultrazvuku.

#### **Mobilní fáze pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii**

Z důvodu použití gradientové eluce bylo nutné připravit dvě mobilní fáze. Na přípravu mobilní fáze A bylo naváženo 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rozpuštěno v 1 dm<sup>3</sup> ultra čisté vody, a následně upraveno pH na hodnotu 2,5 pomocí fosforečné kyseliny. Doba expirace okyseleného roztoku byla nastavena na 1 týden. Na mobilní fáze B byl použit 100% acetonitril. Každá mobilní fáze byla pořádně promíchána, zfiltrována a odplyněna pomocí ultrazvuku před použitím. Před každým měřením byly připraveny nové mobilní fáze.

### 5.4. Příprava modelových membrán

V rámci difúzních experimentů byly použity tři typy modelových membrán. Modelové porézní syntetické membrány (Pragopore, velikost pórů 0,23 μm) a umělé kožní membrány (Strat M®) byly použity ve formě dodané výrobcem bez jakýchkoliv dodatečných úprav. Na přípravu biologických kožních membrán byly použity prasečí uši díky jejich struktuře, která se dostatečně podobá struktuře kůže člověka [16]. V prvním kroku byly odstraněny přítomné chlupy na vrchní vrstvě kůže pomocí chirurgického skalpelu a následně byla postupně oddělována tuková vrstva tak, aby zůstala jen tenká vrstvička pokožky. Takto vyřezaná kožní membrána byla důkladně opláchnuta destilovanou vodou, osušena a zabalena do hliníkových fólií. Velký důraz byl kladen na vytvoření rovnoměrné tloušťky membrány a její dostatečnou plochu bez jakýchkoliv defektů. Nepoužitá připravená membrána byla uchovávána v mrazáku během jednoho týdne od zamrazení. Po rozmrazení byla kožní membrána vizuálně vyhodnocena na přítomnost možných zdegradovaných oblastí vyřezána dle potřebného tvaru a umístěna mezi donorovou a receptorovou komoru Franzovy cely tak, aby *stratum basale* (spodní část kožní membrány) směřovala k receptorové části cely.



Obr. 14. Příprava modelových kožních membrán

## 5.5. Difúzní experimenty

Transport aktivních látek z připravených formulací skrz modelové membrány byl experimentálně realizován pomocí difúzních experimentů. Bylo rozhodnuto použít difúzní cely ve vertikálním uspořádání, tzv. Franzovy cely. Během jednoho experimentu byly paralelně sestaveny vždy 3 stejných difúzních aparatury. Před použitím difúzních cel byly styčné plochy komor ošetřeny inertní silikonovou pastou na zábrusy za účelem zvýšení přilnavosti, těsnosti a ohraničení plochy působení aktivní látky.

Na receptorovou (spodní) komoru Franzových cel s předem vloženým magnetickým míchadlem byla aplikována silikonová těsnící pasta na zábrus a zatím byla umístěna vybraná membrána. Poté receptorová komora byla spojena s donorovou (horní) komorou. Celá aparatura byla upevněna svorkami pro Franzovy cely. Následně bylo nadávkováno do receptorové komory difúzní cely 20 ml 0,15M roztoku chloridu sodného pomocí dlouhé tenké jehly takovým způsobem, aby pod membránou nevznikla bublina a byla využita celá styčná plocha pro difúzní experiment. Do donorové komory bylo vždy přidáno vybrané množství testované kompozice tak, aby membrána, která oddělovala dvě komory difúzní cely, byla pokryta po celé své ploše.

Takto připravená difúzní aparatura byla umístěna na vícemístné míchadlo a byla uchycena ve svislé poloze pomocí držáku na laboratorní stojan. Rychlost promíchávání byla nastavena na hodnotu 300 RPM. Donorová komora se vzorkem byla obalena pomocí parafilmu, aby nedocházelo k vypařování roztoku nebo nežádoucí kontaminaci. Regulace teploty difúzní cely využita nebyla. Veškeré difúzní experimenty byly provedeny pro každou vybranou látku na syntetické, kožní a Strat M® membráně. Výsledné časové intervaly odběru vzorků na analýzu byly nastaveny na 2 a 4 hodiny za účelem přiblížení experimentů k reálným podmínkám použití kosmetických nebo léčivých přípravků.

## 5.6. UV-VIS spektrofotometrie

Díky schopnosti testovaných vitaminů absorbovat UV záření a zároveň z důvodu robustnosti, rychlosti a jednoduchosti byla metoda UV-VIS spektrofotometrie zařazena mezi použité metody v této diplomové práci. Parametry UV-VIS spektroskopické metody jsou shrnuté v Tabulka 1. Ve vybraných intervalech byly provedeny odběry z receptorové komory difúzní aparatury ručně pomocí stříkačky s dostatečně dlouhou jehlou tak, aby jehla byla ponořena až do vnitřního objemu receptorové komory. Přijímací roztok byl nasán do injekční stříkačky, přičemž velká pozornost byla věnována odebranému množství, aby nebyl překročen objem dávkovací trubice (cca 1,5 ml) a nevznikla nežádoucí bublina v receptorové komoře. Část odebraného vzorku byla dávkována do křemenné mikrokvyety o objemu 1400  $\mu$ l a následně spektrofotometricky změřena. Množství vzorku použitého na UV-VIS analýzu bylo vráceno zpět k původně odebranému vzorku. Následně byl připraven vzorek na iontovou chromatografii. Odebraný objem vzorku byl v difúzní aparatuře nahrazen čerstvým 0,15 M roztokem chloridu sodného, aby byl udržován konstantní objem v receptorové komoře.

Tabulka 1. Parametry nastavení UV-VIS

Typ měření	Wavelength Scan
Data modul	Absorbance
Počáteční vlnová délka	500 nm
Konečná vlnová délka	200 nm
Rychlost skenování	600 nm/min
Krok:	0,50 nm
Přepínání lampy	340 nm

## 5.7. Iontová chromatografie

Získaný vzorek (postup odběru viz kapitola 5.6) byl umístěn do zkumavky, ze které byl poté odebrán přesně 1 ml pomocí dělené skleněné pipety a naředěn vodou 10krát, za účelem zvýšení objemu vzorku potřebného na analýzu pomocí iontové chromatografie. Zbylé množství nenaředěného vzorku odebraného z difúzní aparatury bylo převedeno do vialek pro HPLC analýzu. V případech menšího objemu odebraných vzorků bylo ředění poměrově upravené tak, aby byl získán minimální objem vzorku 6 ml, který byl potřebný na IC analýzu. Parametry iontového chromatografu pro měření obsahu alfa-hydroxykyselin byly nastaveny dle Tabulka 2. Obdržené záznamy byly automaticky integrovány programem MagIC Net a získané výsledky byly použity pro vyhodnocení experimentu.

Tabulka 2. Parametry nastavení IC

Metoda	FCH organické kyseliny
Kolona	Metrosep Organic Acids – 250/7.8
Detektor	Vodivostní
Čas měření	33 min
Průtok	0,6 ml/min
Teplota	30,0 °C
Tlak	5,44 MPa
Nástřik	20 $\mu$ L
Počet nástřiků	1

## 5.8. Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Stanovení koncentrací vybraných aktivních farmaceutických ingrediencí bylo provedeno pomocí i kapalinové chromatografie. Odběry vzorků na chromatografickou analýzu byly provedeny vždy ve stejných časových intervalech (2 a 4 hodiny) souběžně s odběrem vzorků na UV-VIS spektroskopii, resp. na IC analýzu. Množství odebraného vzorku se pohybovalo kolem 0,5 ml, které následně bylo umístěno do vialky s příslušným označením. V případě menšího objemu byly použity inserty pro zmenšování vnitřního objemu vialek. Jednotlivé odebrané vzorky byly uchovávány v ledničce a následně v nich byl chromatograficky stanoven obsah vybraných látek analytickou metodou HPLC. Ze získaných chromatogramů byly odečteny hodnoty ploch píku v odpovídajících retenčních časech. Pro zpracování dat byl použit program Empower, kde integrace byla provedena pomocí nastavené procesní metody, a následné výpočty koncentrací byly provedeny pomocí programu MS Excel.

## 6. OPTIMALIZACE POUŽITÝCH METOD

Mezi cíle diplomové práce byl zaražen návrh, realizace a vyhodnocení sérií experimentů, zaměřených na transdermální transport vybraných aktivních látek. V průběhu realizace předběžných experimentů bylo nalezeno několik praktických problémů, které vyžadovaly hlubší zaměření na problematiku vybraných metod. Z toho důvodu byla experimentální část této práce podrobena rozsáhle optimalizaci. V následující kapitole jsou podrobně popsány konkrétní komplikace při realizaci experimentů a následně navržena řešení jednotlivých problémů. Zároveň jsou zde uvedeny postupy přípravy kalibračních závislostí a proces vytvoření metody na stanovení vodorozpustných vitaminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

### 6.1. Difúzní experimenty

Část diplomové práce, která se zabývá difúzními experimenty, vyžadovala nejvíc času na optimalizaci. Všechny difúzní experimenty byly realizovány ve vertikální difúzní cele, která je běžně využívána pro studium transportu účinných látek z různých lékových forem. Jako přijímací medium v difúzní cele byl zvolen roztok chloridu sodného 0,15 M, a to z důvodu simulace fyziologických podmínek a také díky jeho schopnosti regulovat rovnovážný osmotický tlak na obou stranách membrány. Odběry vzorků přijímacího roztoku s uvolněnými aktivními látkami, které byly dále analyzovány, byly provedeny pomocí dlouhých tenkých jehel, aby bylo možné dosáhnout vnitřního prostoru přijímací komory difúzní cely, kde na rozdíl od odběrového ramene byla koncentrace uvolněné látky distribuována homogenně díky stálému míchání. Samotné odebrání bylo provedeno v maximálním odpovídajícím objemu dávkovací trubice, aby nedošlo k tvorbě bublin v přijímací komoře difúzní cely.

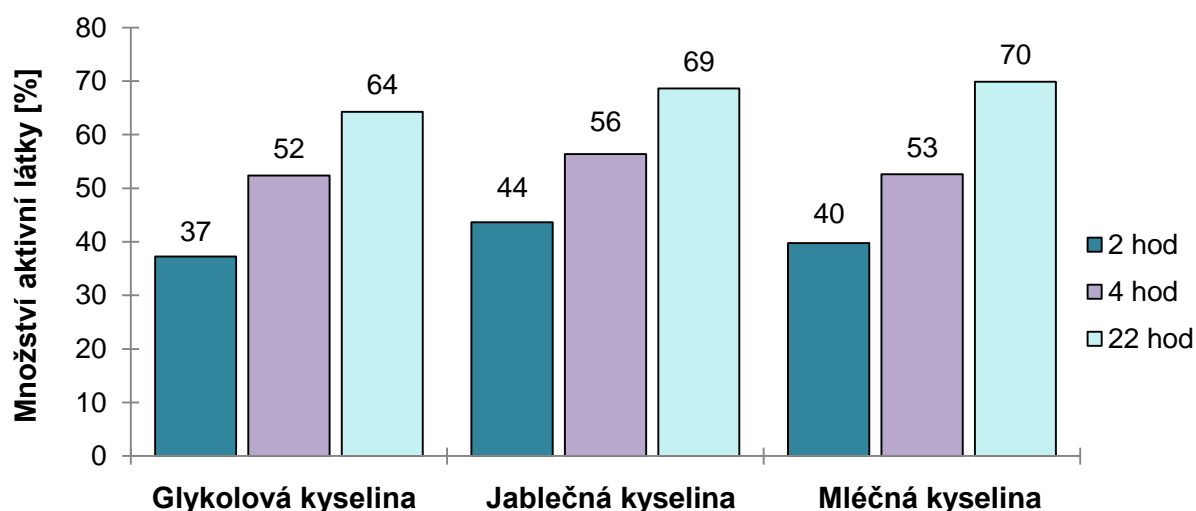
#### 6.1.1. Pilotní experimenty zaměřené na prostup alfa-hydroxykyselin

Difúzní experimenty zaměřené na transport alfa-hydroxykyselin byly nejprve realizovány se zdrojovým roztokem, a to buď samotných individuálních hydroxykyselin, anebo jejich směsí s požadovanou aktivní látkou. Tyto pilotní experimenty byly tedy provedeny v systému „roztok–roztok“ a už v jejich průběhu bylo pozorováno unikání zdrojového roztoku z horní části difúzní cely prostorem kontaktu obou difúzních komor, což se potvrdilo také při vyhodnocení naměřených dat. Celková bilance zůstatku aktivní látky v aparatuře po ukončení experimentu nesouhlasila s původně dodaným do zdrojového roztoku množstvím. Během navazujících experimentů byla věnována větší pozornost izolaci membrány, lepšímu utěsnění styčných ploch obou difúzních komor, ale výsledky bilance celkového objemu roztoků v aparatuře a celkového obsahu aktivní látky po ukončení experimentu stále nebyly relevantní. Zároveň bylo zpozorováno výrazné botnění biologické (kožní) membrány pod vlivem vysoké koncentrace zdrojových roztoků hydroxykyselin, což vedlo k tomu, že byl navržen samostatný experiment zaměřený na botnění kůže (viz kapitola 7.1). Při důkladnějším šetření postupu během dalšího experimentu bylo také zjištěno, že zdrojový roztok z donorové komory unikal přes syntetickou membránu do receptorové komory kvůli podtlaku vznikajícím při příliš rychlém odběru vzorků pomocí injekční stříkačky s dlouhou jehlou.

Na základě výše diskutovaných komplikací pozorovaných u pilotních experimentů byl postup experimentu v systému „roztok–roztok“ upraven a podařilo se úspěšně realizovat experiment, při němž bilance detekované látky po jeho ukončení prakticky odpovídala celkovému

původně dodanému množství. Je třeba zdůraznit, že během tohoto experimentu byla věnována vysoká pozornost izolaci syntetické membrány od okolního prostředí. Zároveň byly ošetřeny povrchy styčných ploch komor dostatečným množstvím silikonové pasty a bylo omezeno odpařování roztoků z komor pomocí parafilmu. Do donorové komory bylo vždy přidáno 5 ml roztoku vybrané hydroxykyseliny. Pro zabránění unikání roztoků z horní komory přes syntetickou membránu v průběhu odběru bylo vždy co nejdříve provedeno nahrazení odebraného množství vzorku čerstvým 0,15M roztokem chloridu sodného.

Výsledky takto optimalizovaného difúzního experimentu v systému „roztok-roztok“ jsou uvedeny na Obr. 15 a Obr. 16. a jsou prezentovány ve formě procentuálního množství prošlých látek vztahované vůči celkovému původně dodanému množství ve formě zdrojového roztoku do difúzního systému. Lze vidět pravidelný a výrazný nárůst koncentrace aktivních látek v čase, z čehož je možné usoudit, že vybrané hydroxykyseliny dobře prostupují jak přes syntetickou, tak i přes kožní membránu.

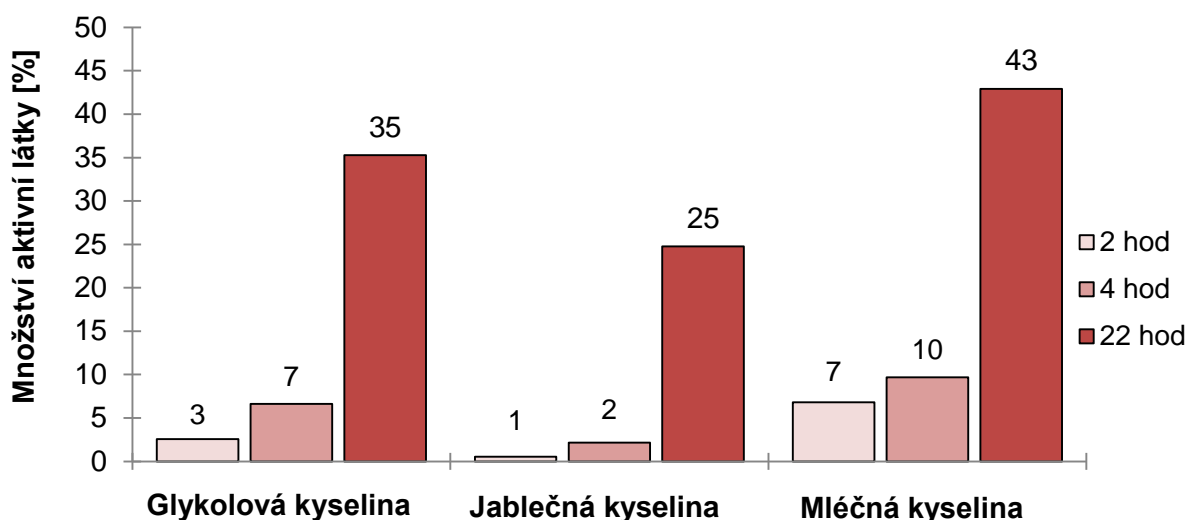


Obr. 15. Relativní množství transportované AHA přes syntetickou membránu v závislosti na čase (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Při vyhodnocení transportu hydroxykyselin přes syntetickou membránu v systému „roztok-roztok“ bylo zřejmé, že rychlost penetrace v závislosti na čase byla pro každou kyselinu přibližně stejná a byly detekovány podobná množství kyselin v přijímacích roztocích. Nejvyšší hodnota byla stanovena u kyseliny mléčné po 22 hodinách experimentu, a to na 70 % látky od původního množství (Obr. 15). Kyselina jablečná vykazovala nejmenší penetrační efektivitu a prostoupila s účinností jen 64 % za stejný časový úsek. Všechny kyseliny po 4 hodinách experimentu uvolnily přes porézní syntetickou membránu více než polovinu svého původního množství ve zdrojovém roztoku.

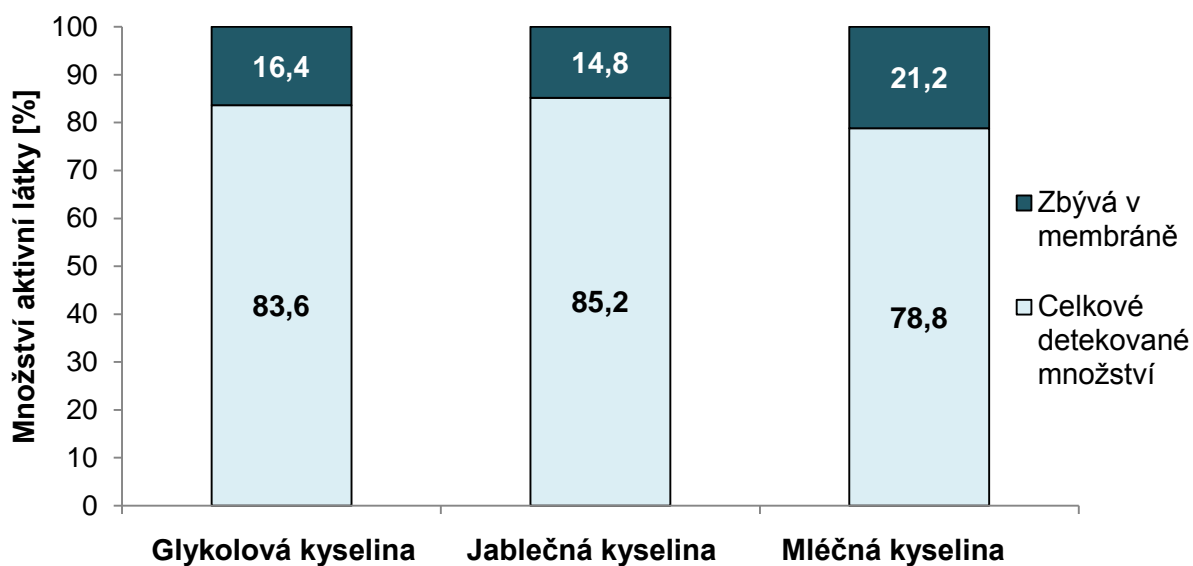
Jak bylo očekáváno, vypočítané hodnoty aktivních látek transportovaných přes kůži byly výrazně nižší v porovnání s porézní syntetickou membránou. Například přes kožní membránu z roztoku s obsahem kyseliny glykolové prošlo 35 % aktivní látky po 22 hodinách experimentu (Obr. 16). Stejného množství bylo dosaženo u syntetické membrány už po 2 hodinách. Nejlépe přes kůži z připraveného roztoku prostupovala kyselina mléčná, která měla ve všech sledovaných časech nejvyšší stanovené hodnoty. Nejhorší penetrační

vlastnosti se projevily u kyseliny jablečné, v jejímž případě se zároveň nejvýrazněji projevovalo výše zmíněné botnění pokožky. Takto získané hodnoty zároveň potvrdily nutnost provedení botnacího experimentu, který je podrobně popsán v kapitole 7.1.



Obr. 16. Relativní množství transportované AHA přes kožní membránu v závislosti na čase (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Při následném porovnání stanoveného množství látky nad a pod membránou po 4 hodinách experimentu a vypočítání celkové bilance se získané relativní celkové obsahy aktivních látek v systému po ukončení roztoku pohybovaly v rozmezí 78 % až 85 % počátečního dodaného množství. V případě kyseliny mléčné činila suma stanovené aktivní látky 78,8 % z celkového množství. Vzhledem k jednoduchosti připraveného systému by to mohlo znamenat, že zbývajících 21,2 % aktivní látky adsorbovala membrána, anebo stále docházelo ke ztrátám aktivní látky z aparatury v průběhu experimentu (viz Obr. 17).



Obr. 17. Poměr AHA-kyseliny pohlcené syntetickou membránou k celkovému detekovanému množství po 4 hodinách difúzního experimentu

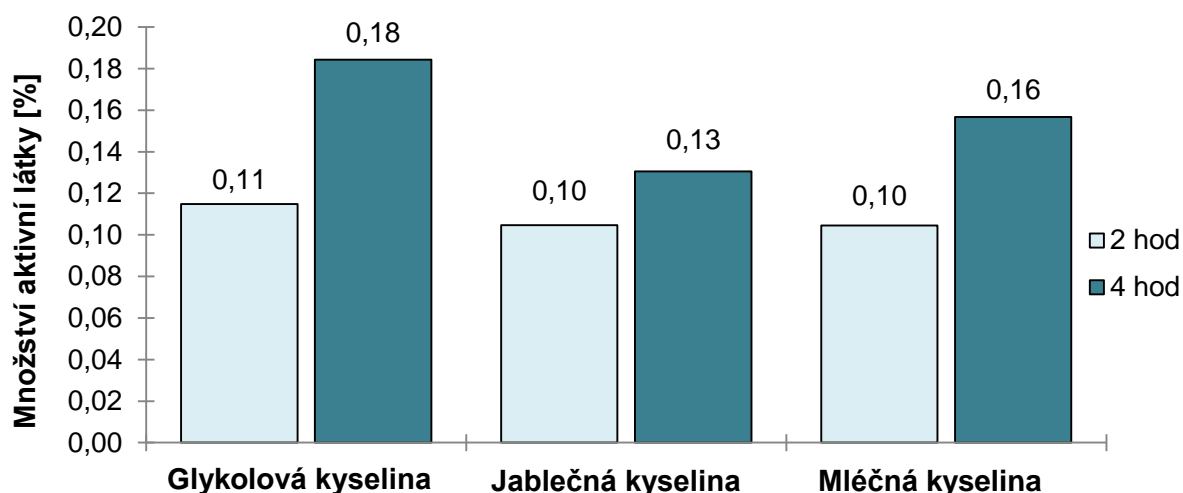
V případě jablečné a glykolové kyseliny byly obdrženy podobné výsledky a nedetekované množství těchto látek činilo 14,8 % a 16,4 % respektive. Vzhledem k chemické struktuře syntetické membrány (regenerovaná celulóza) je možné, že množství AHA, které nebylo po ukončení experimentu detekováno v difúzní aparatuře, lze považovat za poměrně vysoké na to, aby bylo možné ho plně přisoudit sorpci na membránu. To naznačuje, že přes všechna přijatá experimentální opatření neustále docházelo z důvodu netěsností k průniku zdrojového roztoku v průběhu experimentu. Tyto hodnoty ještě jednou potvrdily, že roztoková forma není vhodná pro difúzní experimenty, přináší velké množství komplikací a vedlejších jevů, které lze považovat za obtížně kontrolovatelné. Zároveň roztok z hlediska aplikaci na pokožku není vhodným modelem reálných aplikačních forem, proto bylo rozhodnuto u zdrojové formy difundující látky se namísto roztoku zaměřit na gelovou formu, která by jednak mohla díky své viskozitě omezit unikání směsi z donorové komory a také by lépe modelovala reálné kosmetické formy.

V další řadě optimalizačních experimentů byla proto připravena sada gelů s využitím syntetického polymeru Synthalenu M, který se ukázal jako stabilní a vhodný pro vytváření gelových matric v bakalářské práci, na kterou táto diplomová práce navazuje [36]. Způsob přípravy byl následující: bylo naváženo vždy přibližně 1 g Synthalenu M, který poté byl rozpuštěn pomocí míchačky ve 40 ml deionizované vody. Po 10 minutách míchání byla připravena homogenní gelová struktura, do které se přidalo 5 ml 15% vybrané kyseliny, aby bylo možné porovnávat výsledky s difúzí z roztoků. Po přidavku roztoku AHA došlo k výraznému snížení viskozity z důvodu značného snížení pH. Za účelem obnovení gelové struktury byl proto do směsi následně přidán 20% NaOH, aby se výsledné pH přípravků pohybovalo v rozmezí 5 až 6. S takto připraveným vzorkem byla provedena difúze v systému „gel-roztok“.

Při aplikaci gelů jako zdrojového média bylo nutné dokonale pokrýt celý povrch membrány v difúzní aparatuře tak, aby nevznikaly žádné vzduchové bubliny mezi vzorkem a membránou. Přítomnost vzduchových bublin by zmenšovala efektivní plochu prostupu aktivní látky. Už během tohoto experimentu byla zároveň provedena korekce časových intervalů stanovených na odebrání vzorků. Vzhledem k tomu, že 22 hodiny je příliš dlouhá doba vzhledem ke způsobu použití reálných aplikačních kosmetických nebo farmaceutických přípravků, bylo rozhodnuto ponechat jen odběry ve 2 a 4hodinovém intervalu.

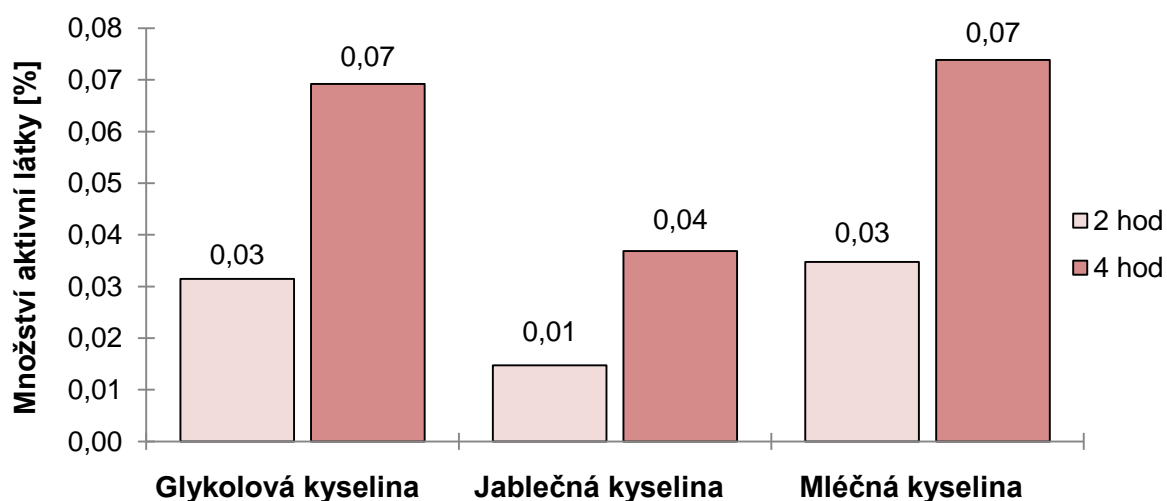
Po vyhodnocení sady experimentů provedených se zdrojovým gelem na bázi Synthalenu M bylo zjištěno, že množství prošlé látky přes membránu bylo výrazně nižší ve srovnání se sérií experimentů „roztok–roztok“. Tento předem očekávaný efekt je možné vysvětlit dobře známým poklesem difúzního koeficientu molekul AHA v gelu způsobeným jednak porézní strukturou gelu spojenou s křivolakou trajektorií difúzního pohybu, jednak s možnou sorpcí aktivní látky na polymerní síti gelu (to je však vzhledem k souhlasnému zápornému náboji na polymerní složce málo pravděpodobné). Z praktického hlediska bylo rovnoměrné nanášení vysoce viskózního gelu značně komplikované a prosup látky mohl být negativně ovlivněn nedokonalým kontaktem s difúzní membránou. Například u kyseliny mléčné, která byla schopna propustit víc než 50 % svého původního množství z roztoku za 4 hodiny experimentu přes syntetickou membránu, byla efektivita penetraci tentokrát za stejný časový úsek menší než 1 % (Obr. 18). Podobný pokles penetrace byl detekován u všech použitých hydroxykyselin. V případě difúze přes kožní membránu byly stanoveny hodnoty aktivních látek v přijímacím mediu ještě nižší. Na rozdíl od difúzí z roztoků, nejvyšší množství stanovené látky činilo 0,07 % původního obsahu v případě kyseliny mléčné (Obr. 19).





Obr. 18. Relativní množství transportované AHA z gelů na bázi Synthalenu M přes syntetickou membránu (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

I přes výrazné snížení rychlosti prostupu AHA a výše zmíněné praktické obtíže spojené s vysokou viskozitou ručně připravených gelů na karbomerové bázi, poskytovala gelová forma při použití v difúzním experimentu také řadu výhod. Je zřejmé, že hydroxykyseliny měly tendenci prostupovat už v krátkém dvouhodinovém intervalu. Bylo očividné, že gelová struktura se chovala stabilně a poskytovala pravidelné narůstání koncentrace aktivní látky v přijímací komoře. Z toho bylo možné posoudit, že přijímací roztok s vhodně nastavenou iontovou silou může zajišťovat stabilní uvolňování aktivních látek nejen z roztoků, ale také z gelů, a potlačit tendenci gelových vzorků nasávat tekutinu z receptorového prostoru difúzní cely. Ovšem ručně vytvořenou gelovou strukturu nebylo možné považovat za úplně dokonalou z důvodu přítomnosti některého množství malých bublin, které teoreticky mohly mít vliv na transport aktivních látek. To vše nasvědčovalo tomu, že gelovou strukturu stále bylo možné brát jako vhodnou pro difúzní experimenty, jen bylo nutné poupravit její složení.

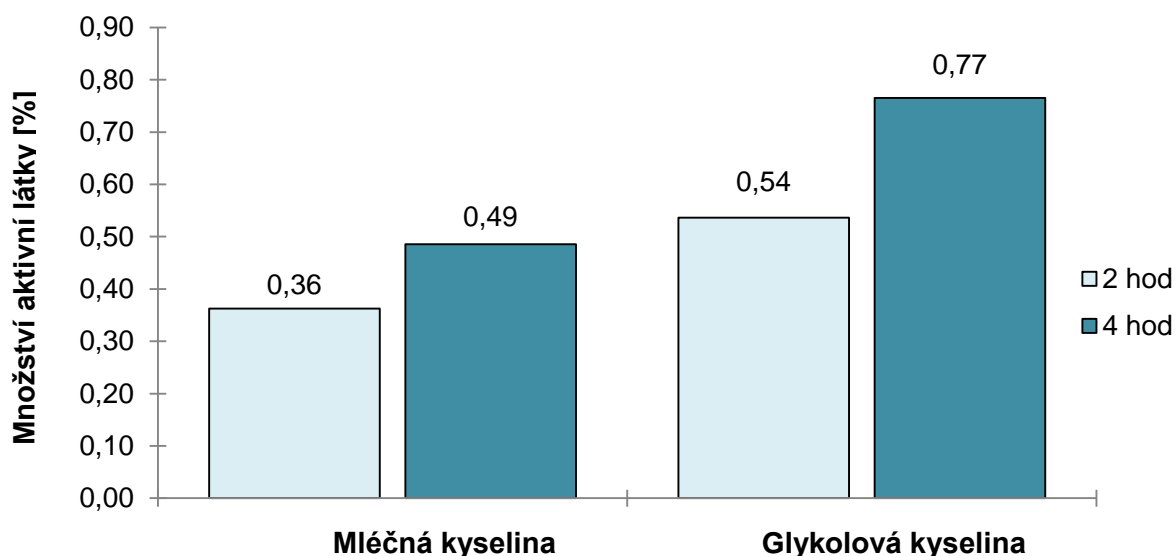


Obr. 19. Relativní množství transportované AHA z gelů na bázi Synthalenu M přes kožní membránu (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Kvůli tomu, že by hledání a optimalizace nového lepšího složení gelu pro vybrané látky bylo časově náročnou záležitostí, bylo rozhodnuto zkusit použít komerčně dostupný gelový základ (konkrétně byl vybrán komerční gel pro ultrazvukové vyšetření GelPol USG). Jeho viskozita je nižší, čímž by se mohly vyřešit komplikace s nanášením gelů na membránu. Zároveň obsah požadovaného syntetického polymeru by měl teoreticky bránit snadnému unikání celého přípravku skrz membránu.

Pro další experiment tak byla připravena řada kompozic na základě komerčních gelů, do kterých znovu bylo vmícháno 5 ml vybrané hydroxykyseliny. Kyselina jablečná pro tento experiment už nebyla použita, a to na základě vyhodnocení výsledků botnacího experimentu (viz kapitola 7.1). Po přidání kyseliny docházelo ke částečnému snížení viskozity, méně výrazné než u připravených gelů na bázi Synthalenu M. pH takto připravených vzorků bylo stanoveno v rozmezí 4 až 5. Nicméně z důvodu zachování stanovených hodnot pH, které se přibližovaly k hodnotám pH kůže, bylo v tomto případě rozhodnuto pH dále neupravovat. Takto připravena směs v průběhu experimentu nejevila tendenci prosakovat skrz membránu při odběru vzorků z receptorové komory při vznikajícím podtlaku, ani unikat netěsnostmi v místech kontaktu difúzních komor.

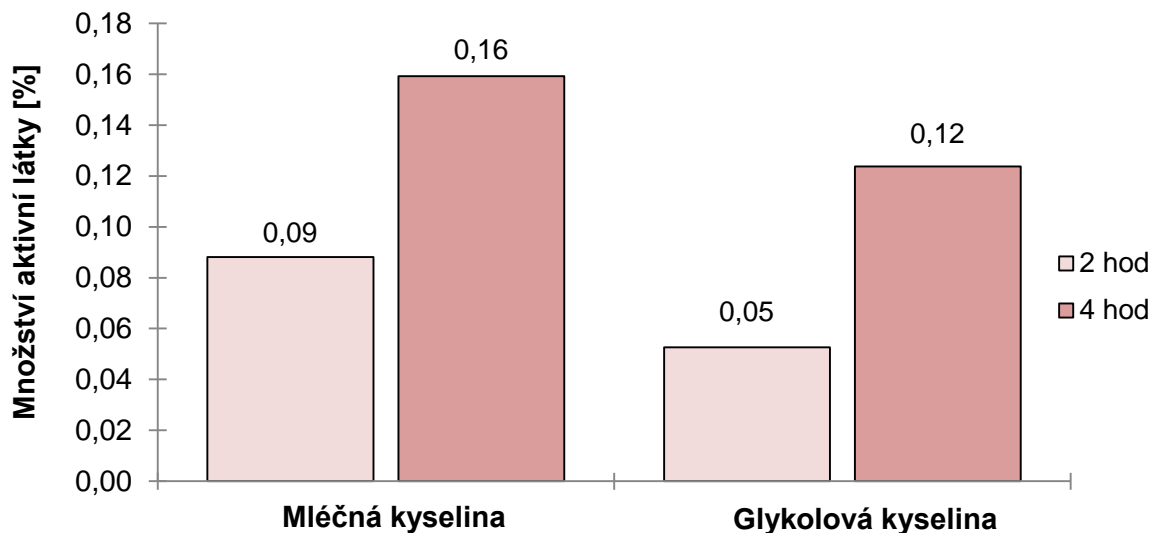
Po vyhodnocení naměřených dat byly znovu vytvořeny grafy závislosti množství aktivních látek na čase. Stejně jako dříve bylo množství prošlé AHA vyjádřeno v procentech vůči původnímu množství. Přestože vypočítané hodnoty se pohybovaly v hodnotách do 1 %, bylo zřejmé, že uvolněné množství kyselin bylo vyšší než v případě použití gelů na bázi Synthalenu M.



Obr. 20. Relativní množství transportované AHA z komerčního gelu přes syntetickou membránu (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Například přes syntetickou membránu z komerčního gelu (Obr. 20) se už po 2 hodinách uvolnilo 0,54 % kyseliny glykolové, což je 5krát vyšší množství než v předcházejícím experimentu. Po 4 hodinách byl obsah kyseliny v přijímacím mediu už 7krát vyšší, na rozdíl od difuze z gelů na bázi Synthalenu M. Dalším pozitivním zjištěním byly hodnoty spočítané při vyhodnocení experimentu, který byl proveden na kožní membráně (Obr. 21). Po 4 hodinách aplikace bylo detekováno v přijímacím roztoku 2krát vyšší množství látky

a zároveň byl zřejmý i pravidelný nárůst koncentrace v čase. Z těchto hodnot vyplývalo, že komerční gel díky své viskozitě umožňoval postupné uvolňování aktivních látek v koncentracích srovnatelných, a v některých případech i vyšších než v systému s použitím Synthalen M gelů. Zajímavým objevem bylo i to, že pod naneseným gelem obsahujícím vysoce koncentrovanou kyseliny kožní membrána neměla tendenci botnat.



Obr. 21. Relativní množství transportované AHA z komerčního gelu přes kožní membránu (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

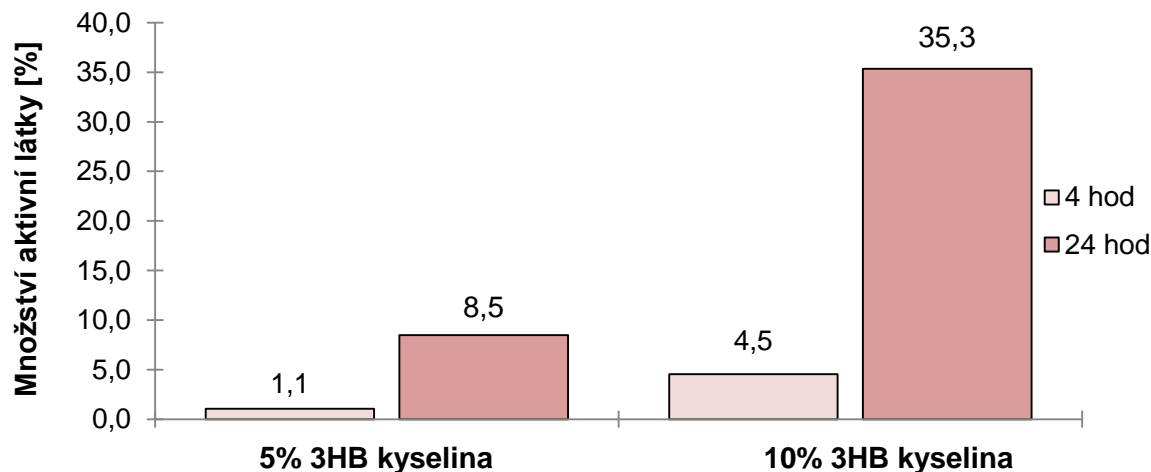
Vzhledem k tomu, že AHA v této diplomové práci nejsou považovány za hlavní aktivní ingredience modelových kosmetických kompozic a měly by spíše reprezentovat pomocné látky pro transport jiných farmaceutických ingrediencí, stanovené hodnoty v rozmezí jednoho procenta lze považovat za přijatelné. Tímto způsobem nastavená metoda byla charakterizovaná jako vhodná a bylo rozhodnuto pro další difúzní experimenty použít komerční dostupný gel pro ultrazvukové vyšetření, do kterého byly vmíchány vybrané farmaceuticky aktivní látky.

### 6.1.2. Hydroxybutyrová kyselina jako zástupce beta-hydroxykyselin

Polyhydroxyalkanoáty jsou v současné době středem zájmů velkého množství výzkumných skupin. Do sérií difúzních experimentů byl zařazen experiment pro ověření potenciálu kyseliny 3-hydroxybutyrové prostupovat přes kožní membrány. Na základě bakalářské práce, kde mezi jinými látkami byla zkoumána také kyselina salicylová, byl vytvořen předpoklad, že 3HB kyselina by mohla mít podobné penetrační vlastnosti díky její příslušnosti do skupiny beta-hydroxykyselin.

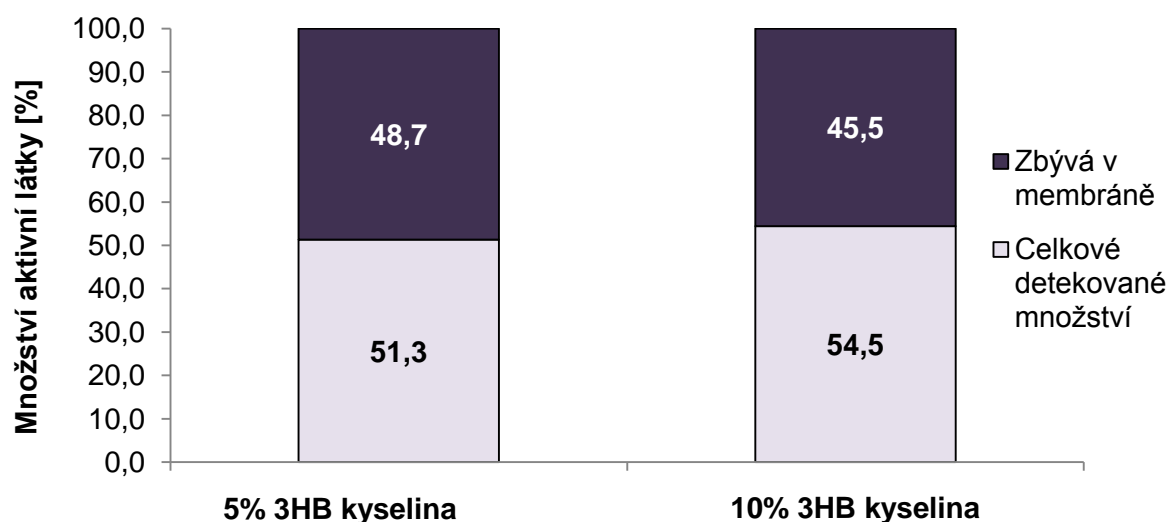
Difúzní experiment byl proveden dle postupu uvedeného v kapitole 5.5 s několika úpravami. Pro první nástřelový experiment časy odběrů vzorků byly nastaveny na 4 a 24 hodiny. Celá aparatura byla připravena pro systém „roztok–roztok“ na základě výsledku pro AHA, aby bylo možné dosáhnout maximálního prostupu. Byly namíchaný 5% a 10% roztoky 3HB kyseliny, které byly následně nadávkovány do donorové komory vždy ve stejném objemu 5 ml pomocí skleněné nedělené pipety. Původní vzorek z donorové komory nebyl analyzován, místo toho byl změřen vzorek z horní komory po 24 hodinách experimentu pro vypočet bilance a ověření případného potenciálu kůže pohlcovat roztok připravené kyseliny. Odebrané vzorky byly změřeny pomocí iontové chromatografie a ze získaných hodnot ploch pík

byly provedeny výpočty koncentrace látky v přijímacím roztoku difúzní cely na základě jednobodové kalibrace s použitím 1% standardu 3-hydroxybutyrové kyseliny. Následně bylo propočítáno procentuální množství látky, která prošla membránou, a byla vytvořena závislost těchto hodnot na čase. Všechny výpočty byly provedeny pomocí programu MS Excel.



Obr. 22. Relativní množství transportované 3HB z roztoku přes kožní membránu (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Nejvyšší množství 3HB kyseliny v přijímacím roztoku bylo stanoveno na 35,3 % původního množství. Tohoto výsledku se podařilo dosáhnout při použití 10% kyseliny a její působení na kožní membránu v průběhu jednoho dne (Obr. 22). Roztok kyseliny 3-hydroxybutyrové o koncentraci 5 % měl celkově výrazně nižší schopnost procházet kožní membránou ve srovnání s AHA. Zajímavým objevem bylo, že množství prošlé látky po uplynutí 24 hodin bylo přibližně 8krát větší než množství látky po 2 hodinách experimentu, přičemž nezáleželo na koncentraci původního roztoku. I přesto, že byl detekován nárůst koncentrací 3HB kyseliny v čase, bylo nutno provést výpočet látkové bilance a ověřit schopnost membrány pohlcovat aktivní látku. Vypočítaný procentuální poměr lze vidět na Obr. 23.



Obr. 23. Poměr 3HB kyseliny pohlcené kožní membránou k celkovému detekovanému množství po 24 hodinách experimentu

Dle získaných hodnot je očividné, že přibližně polovina množství aktivní látky, která byla přítomná v horní komoře, byla pohlcena kožní membránou. I v tomto případě původní koncentrace aktivní látky neměla žádný vliv. Z toho je možné posoudit, že 3-hydroxybutyrová kyselina, nezávisle na její koncentraci, má výraznou tendenci být zadržována a pohlcena kůží, což snižuje množství látky schopné penetrovat. Přestože získané hodnoty penetrovaného množství byly poměrně vysoké, jednalo se o celodenní aplikaci. Množství transportované látky po 4 hodinách experimentu naznačovalo poměrně neefektivní transport už při porovnání s experimentem alfa-hydroxykyselin v systému „roztok–roztok“. Je možné předpokládat, že v případě zakomponování 3HB kyseliny do gelové matrice (kde se snižuje schopnost penetrace víc než o řád), může docházet k razantnímu poklesu schopnosti látky procházet membránou. Možná úprava povrchu kůže by mohla přispět k vyšší rychlosti transportu této látky a následnému snížení časů aplikace. Ovšem kvůli časové náročnosti podobných uprav a časové omezenosti byla 3HB kyselina vyřazena z dalších experimentů v kombinaci s vybranými aktivními látkami. Nicméně vysoká absorpce 3HB kůží představuje zajímavé zjištění, na které by bylo dobré se v budoucích navazujících experimentech zaměřit.

## 6.2. Vývoj metody HPLC na stanovení obsahu vitaminů

Prvním a nezbytným krokem pro stanovení všech použitých vodorozpustných vitaminů bylo vytvoření univerzální metody. Za účelem dosažení optimální separace vybraných látek bylo provedeno několik pokusných měření s použitím různých kolon, odlišných svou délkou a povrchem. Nejlepší separaci vykazovala kolona Synergi Hydro RP od výrobce Phenomenex, jejíž délka činí 250 mm, s velikostí částic 4  $\mu\text{m}$  a pórů 80 Å, na níž se projevovala vyšší afinita aktivních látek k SF kolony. Dalším důležitým úkolem bylo najít vhodné složení mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno několik roztoků s různým pH v rozmezí od 2 do 6, ale k nejučinnější separaci docházelo při použití fosfátového pufru s hodnotou pH 2,5. Způsob přípravy výsledně použité mobilní fáze byl popsán v kap. 5.3. Aby bylo možné získané výsledky považovat za optimální, bylo zároveň nutné stanovit vhodnou vlnovou délku detektoru, při které by docházelo k efektivnější absorpenci. Bylo provedeno měření připravených standardů vodorozpustných vitaminů na HPLC přístroji s PDA detektorem, čímž byly detekovány vlnové délky odpovídající maximální absorpenci, které jsou shrnuty v Tabulka 4. Chromatografická separace probíhala v módu gradientové eluce (viz Tabulka 5). Všechna další měření byla vždy provedena dle takto optimalizované metody.

Tabulka 3. Parametry nastavení HPLC

Metoda	IM_Vitamines
Kolona	Synergi Hydro RP, 80 Å, 250 x 4 mm, 4 $\mu\text{m}$ (Phenomenex)
Detektor	UV, vlnová délka dle příslušné měřené aktivní látky
Čas měření	14 min
Průtok	1 ml/min
Teplota kolony	30,0 °C
Teplota autosampleru	30,0 °C
Nástřik	10 $\mu\text{L}$

Tabulka 4. Vhodné vlnové délky pro detekci vybraných vodorozpustných vitaminů

Vitamin	Vlnová délka [nm]
Tiamin B1	246,1
Askorbová kyselina C	243,8
Niacin B3	261,5
Pyridoxin B6	291,2

Tabulka 5. Nastavení gradientu HPLC

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	95	5
4,5	95	5
8	40	60
12	40	60
12,1	95	5
14	90	5

- **Příprava kalibračních křivek pro vitaminy**

Pro vyhodnocení dat získaných z chromatogramů metodou HPLC bylo také nutné vytvořit kalibrační křivky příslušné vodorozpustným vitaminům. Byla připravena řada standardních roztoků o koncentraci 0,02 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 % a 0,5 %, která následně byla analyzována a vyhodnocena. Z obdržných hodnot byla vytvořena kalibrační závislost ploch píků na koncentraci, která měla lineární charakter (viz Příloha 1–Příloha 4). Na základě získané rovnice lineární regrese byly vypočítány koncentrace detekovaných vodorozpustných vitaminů u všech následujících experimentů.

### 6.3. Iontová chromatografie

Vzhledem k tomu, že metoda na stanovení hydroxykyselin pomocí iontové chromatografie už byla předem připravena, nebylo nutné provádět její vývoj. Bylo zapotřebí vyhodnotit spolehlivost už existující vybrané analytické metody. Vzhledem k tomu, že měření odebraných vzorků bylo provedeno v různých časových intervalech, bylo především nutné ověřit nezávislost výsledků získaných za stejných podmínek měření.

- **Ověření opakovatelnosti**

Před zahájením měření experimentálně získaných vzorků bylo nutné provést ověření opakovatelnosti výsledků analýzy metodou iontové chromatografie. Byla připravena řada roztoků kyselin v destilované vodě o koncentraci 0,001 %, 0,005 %, 0,01 % a 0,05 %. Roztoky byly následně zanalyzovány ve třech opakováních a pomocí statistických funkcí v programu Excel byly vypočítány směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky (RSD) retenčních časů použitých roztoků kyselin. Výsledky jsou uvedené níže, viz Tabulka 6–Tabulka 8.

Je zřejmé, že výsledné RSD retenčních časů jakékoliv kyseliny bylo menší než 5 %, což potvrzuje, že vybraná metoda je správně nastavena, funguje stabilně, je opakovatelná a následně získané hodnoty a výsledky mohou být považovány za relevantní a použitelné.



Tabulka 6. Naměřené parametry pro kyselinu mléčnou pomocí IC

Koncentrace c [%]	1 vzorek R <sub>t</sub> [min]	2 vzorek R <sub>t</sub> [min]	3 vzorek R <sub>t</sub> [min]	Průměr R <sub>t</sub> [min]	Směrodatná odchylka [%]	RSD [%]
0,001	11,443	11,447	11,452	11,447	0,005	0,04
0,005	11,472	11,473	11,482	11,476	0,006	0,05
0,010	11,502	11,502	11,502	11,502	0,000	0,00
0,050	11,647	11,637	11,640	11,641	0,005	0,04

Tabulka 7. Naměřené parametry pro kyselinu glykolovou pomocí IC

Koncentrace c [%]	1 vzorek R <sub>t</sub> [min]	2 vzorek R <sub>t</sub> [min]	3 vzorek R <sub>t</sub> [min]	Průměr R <sub>t</sub> [min]	Směrodatná odchylka [%]	RSD [%]
0,001	11,378	11,393	11,388	11,386	0,008	0,07
0,005	11,423	11,420	11,422	11,422	0,002	0,01
0,010	11,467	11,463	11,465	11,465	0,002	0,02
0,050	11,685	11,678	11,683	11,682	0,004	0,03

Tabulka 8. Naměřené parametry pro kyselinu jablečnou pomocí IC

Koncentrace c [%]	1 vzorek R <sub>t</sub> [min]	2 vzorek R <sub>t</sub> [min]	3 vzorek R <sub>t</sub> [min]	Průměr R <sub>t</sub> [min]	Směrodatná odchylka [%]	RSD [%]
0,001	9,082	9,082	9,083	9,082	0,001	0,01
0,005	9,135	9,137	9,133	9,135	0,002	0,02
0,010	9,177	9,177	9,177	9,177	0,000	0,00
0,050	9,370	9,372	9,385	9,376	0,008	0,09

- **Příprava kalibračních křivek pro hydroxykyseliny pomocí IC**

Vytvoření kalibračních křivek pro vybrané hydroxykyseliny bylo dalším nezbytným krokem pro výpočet jejich přesných koncentrací v odebraných vzorcích. Hodnoty pro sestavení závislosti byly vzaty z chromatogramů pro řadu roztoků, která byla připravená na ověření opakovatelnosti metody. Následně pomocí programu Excel byla vytvořena závislost ploch piku na koncentraci, kde za hodnotu plochy piku byla vzata střední hodnota ploch ze tří nástřiků. Získané kalibrační křivky a jejich rovnice regrese prokázaly, že závislost plochy jakékoliv kyseliny na koncentraci je lineární (viz Příloha 5–Příloha 7).

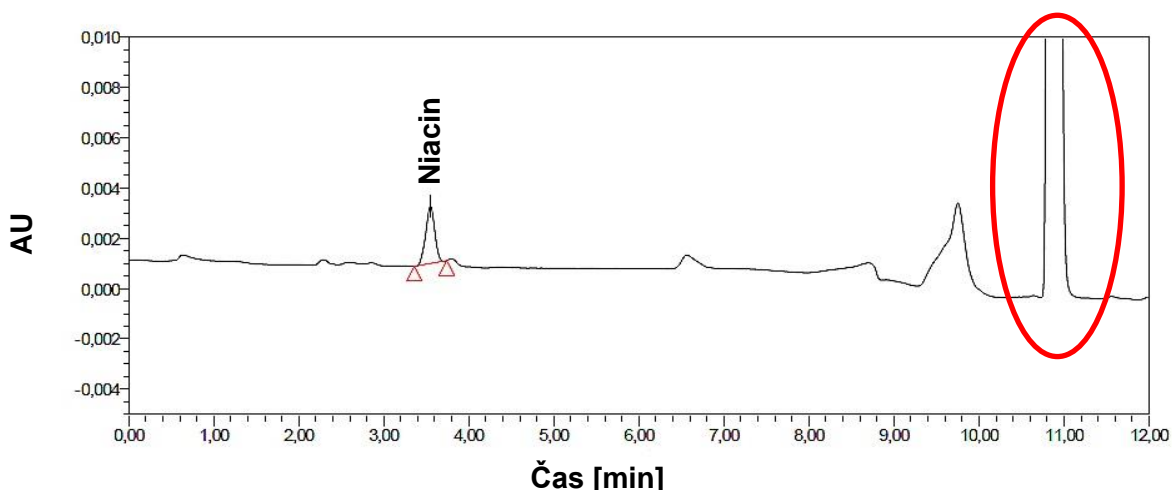
#### 6.4. Využití UV-VIS spektroskopie pro stanovení niacinu

Původní myšlenka použití UV-VIS metody v diplomové práci byla spojena se schopností vybraných vitaminů dobře absorbovat záření. Prvním použitým vitaminem v difúzních experimentech byl niacin, proto optimalizace a nastavení metody bylo provedeno na základě hodnot příslušných tomuto vitaminu. Pro vyhodnocení dat bylo nutné připravit kalibrační řadu. Byla připravena sada roztoků niacinu o koncentraci 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml a 0,05 mg/ml, a následně byla změřena absorpční spektra. Absorpční spektrum niacinu mělo dva výrazné píky, a to při vlnových délkách 213 a 261 nm (viz Příloha 8). Absorbance pro roztok niacinu o koncentraci 0,05 mg/ml přesahovaly oblast platnosti Lambert-Beerová zákonu, proto na výsledném grafu zobrazeny nebyly.

Vzhledem k tomu, že každý difúzní experiment s aktivní látkou byl proveden zároveň s použitím roztoků mléčné, příp. glykolové kyseliny, bylo nutné ověřit, zda AHA bude schopná absorbovat záření za účelem vyloučit případný překryv spekter a s tím spojené zkreslení výsledků. Z tohoto důvodu byla připravena řada roztoků kyseliny glykolové a mléčné o koncentraci 0,01 %, 0,05 % a 0,1 %. Po vyhodnocení výsledků bylo zřejmé, že u těchto kyselin docházelo k absorpci UV části spektra, a to v oblasti vlnových délek do 230 nm. Z takto získaných výsledků vyplynulo, že absorpční pásy niacinu a mléčné nebo glykolové kyseliny se překrývají v rozmezí vlnových délek od 200 do 230 nm. Vzhledem k tomu, že niacin má dva specifické absorpční píky, stále bylo možné ho detekovat ve vlnové délce 261 nm.

Po vyhodnocení byla vytvořena závislost absorbance niacinu na koncentraci připravených roztoků pro vlnovou délku 261 nm, čímž byla získaná kalibrační křivka a rovnice lineární regrese (viz Příloha 9). Všechna vyhodnocení byla provedena pomocí programu Excel. S takto získanou kalibrací UV-VIS metody byl proveden difúzní experiment s gelem obsahujícím niacin o koncentraci 1 %, a odebrané vzorky byly ihned změřeny na UV-VIS spektrofotometru. Avšak získaná spektra vykazovala při vlnové délce 261 nm hodnoty absorbance, které přesahovaly oblast platnosti Lambert-Beerova zákona a nemohly být považovány za relevantní. Toto neočekávané zvýšení absorbance nebylo možné vysvětlit pouze na základě výsledků UV-VIS analýzy. Z toho důvodu byly tytéž vzorky následně podrobeny separaci metodou HPLC, která pro tento jev poskytla vysvětlení.

Na chromatografickém záznamu si lze všimnout výrazného píku v 11. minutě měření (viz. Obr. 24). Jelikož se stejný pík vyskytoval i u vzorků odebraných po difuzi přes syntetickou membránu, bylo vyloučeno, že by se mohlo jednat o produkt degradace kožní membrány.



Obr. 24. Ukázkový chromatografický záznam uvolněného množství niacinu z komerčního gelu přes syntetickou membránu po 4 hodinách experimentu

Vzhledem k tomu, že byl pík detekován ve všech případech, kromě změřeného standardu niacinu, bylo očividné, že jde o jinou neznámou látku, která byla přítomná v odebraném roztoku. Její schopnost absorbovat záření o vlnové délce 261 nm byla výrazně vyšší než u samotného niacinu. Dá se usuzovat, že pozorovaný experimentální artefakt je známkou uvolňování některé z nízkomolekulárních komponent (např. konzervantu)



z komerčního gelu do přijímacího roztoku. Za pomoci HPLC metody tak byly objasněny vysoké absorbance na obdržených záznamech z UV-VIS chromatografu. Spektrofotometrická metoda nebyla v tomto případě schopná poskytnout relevantní kvantitativní stanovení aktivní látky v přijímacím roztoku. Z tohoto důvodu bylo použití UV-VIS chromatografie vyřazeno z použitých experimentálních metod pro stanovení obsahu niacinu i ostatních vitaminů ve vzorcích.

## 6.5. Membrány Strat M ®

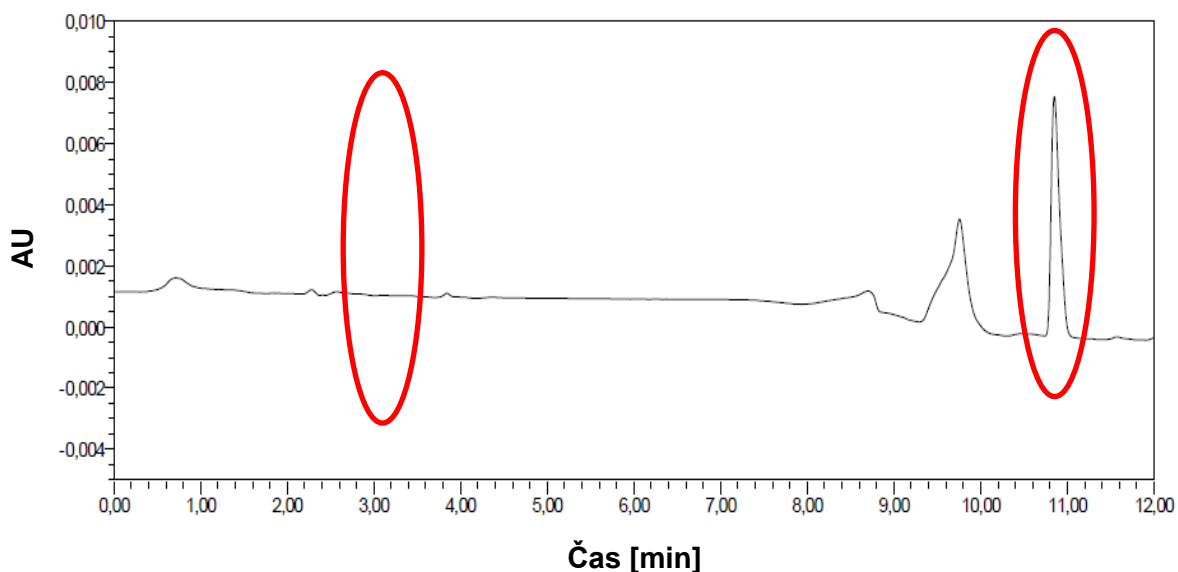
Vzhledem k existujícím legislativním omezením, která jsou spojena s testy na zvířatech, narůstá poptávka převážně od kosmetických a farmaceutických společností po metodách, které by umožňovaly jiný způsob testování. Použití prasečí kůže jakožto biologického modelu lidské kůže při difúzním experimentu zahrnuje řadu nevýhod. Především z pohledu fyziologické variability a odlišnosti lidské kůže od kůže získaných ze zvířat. Je zřejmé, že pokožka se liší vlastnostmi a složením v závislosti na jedinci, jeho věku, pohlaví a místě na těle, ze kterého byl odebrán vzorek. Zároveň způsob získání kožních vzorků pro účely *in vitro* testování lze považovat za nehumánní. Z tohoto důvodu je možnost testování jakýchkoliv přípravků na zvířatech přesně omezena českým zákoníkem. V případě získání vzorku lidské kůže vyžaduje její užití pro *in vitro* experimenty souhlas a povolení od etické komise. Proto byla v rámci definování náplně praktické části diplomové práce navržena vybraná membrána jako zástupce kožních membrán umělého, tj. neživého původu.

Společnost Merck se přizpůsobila poptávce a pro potřeby *in vitro* testování transdermálního transportu vyvinula umělé kožní membrány Strat M ®, které by měly napodobovat lidskou kůži. Membrána je tvořena dvěma vrstvami různých materiálů: horní vrstva je hydrofobní, tvořena polyolefinem; spodní vrstva je z polyethersulfonu, která má převážně hydrofilní vlastnosti [14]. Kombinace těchto dvou polymerních vrstev vytváří porézní strukturu, která je naimpregnována směsí syntetických lipidů, díky čemuž membrána nabývá podobných vlastností jako lidská kůže. Dle informace od dodavatele jsou membrány vhodné pro sledování transportu jakýchkoliv aktivních ingrediencí a veškeré výše zmíněné nedostatky spojené s použitím biologických tradičních modelů kůže by měly eliminovat.

Jeden z řady difúzních experimentů byl na základě toho proveden s použitím umělých kožních Strat M ® membrán, na které byl nanesen 15% roztok kyseliny glykolové a kyseliny mléčné o objemu 5 ml. Vzhledem k dosud neprostudovaným bariérovým vlastnostem těchto membrán vůči testovaným AHA bylo rozhodnuto první odběr vzorků udělat až po 24 hodinách působení aktivních látek. Odebrané vzorky byly zanalyzovány pomocí iontové chromatografie. V případě působení glykolové kyseliny bylo detekováno určité množství aktivní látky v přijímacím roztoku, zatímco v případě kyseliny mléčné nebyl detekován žádný obsah v odebraném vzorku. Po 24 hodinách experimentu v celém objemu dolní komory difúzní cely se nacházelo jen 13 % kyseliny glykolové vzhledem k původnímu množství. V porovnání s biologickou kožní membránou, kde už po 4 hodinách působení stejné látky bylo stanoveno nad 70 % původního množství, schopnost penetrovat přes Strat M ® byla výrazně nižší. Tyto výsledky vedly k závěru, že membrány mohou být propustné srovnatelně s reálnou kůží jen pro určitý druh látek, do kterých hydroxykyseliny nepatří.

Další pokus byl proveden s použitím gelu, který obsahoval 1% roztok niacinu. Vzorky byly odebrány po 2 a 4 hodinách působení aktivní látky a změřeny pomocí kapalinové chromatografie. I tentokrát nebylo detekované žádné množství niacinu. Zajímavým jevem

bylo i to, že předpokládaný konzervant přítomný v komerčním gelu, který dobře difundoval přes biologickou kožní membránu, tentokrát neměl až tak výraznou tendenci procházet skrz Strat M® membránu. Tento fakt byl dokázán na základě velikosti pík v 11. minutě, které lze pozorovat na Obr. 24 a Obr. 25.



Obr. 25. Ukázkový chromatografický záznam uvolněných látek z komerčního gelu přes membránu Strat M® po 4 hodinách experimentu

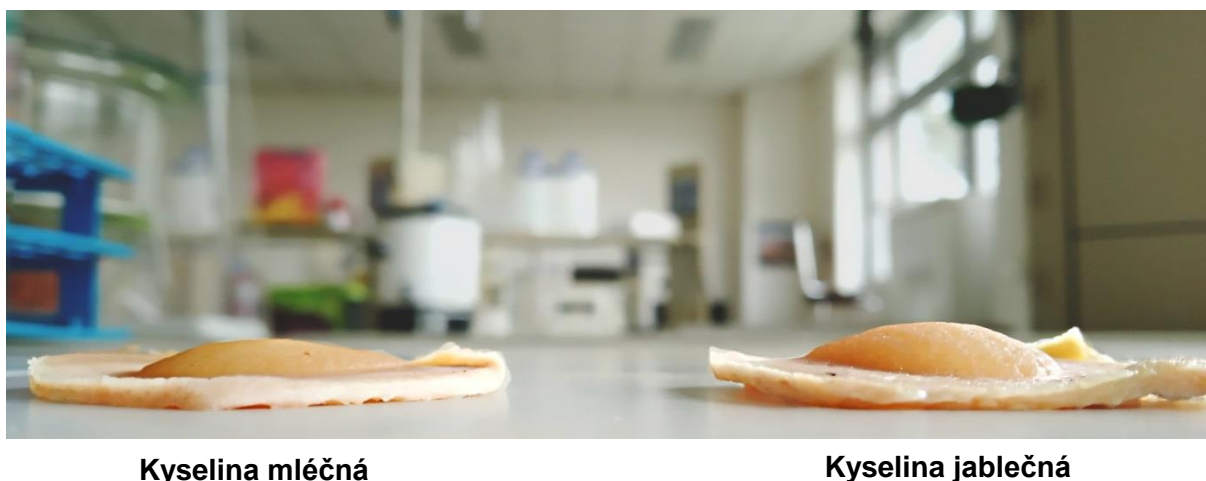
Na webových stránkách výrobce je dostupný seznam chemických látek, které jsou doporučeny pro testování transportu přes Strat M® [14]. Hydroxykyseliny nebo vitaminy nejsou v tomto výčtu uvedeny. Zároveň lze nalézt také grafické zobrazení závislosti transportu vybraných aktivních látek na čase přes membránu Strat M® v porovnání s transportem přes lidskou kůži. Uvedené výsledky se týkají například diklofenaku, acetylsalicylové kyseliny, octocrylenu, nikotinu a kofeinu, a ukazují, že membrána má srovnatelné výsledky s lidskou kůží a vysokou efektivitu penetrace. Na druhou stranu, je při bližším pohledu na výše uvedený výčet patrné, že většina uvedených látek má na rozdíl od testovaných látek v této práci lipofilní charakter. Experimentální data s hydrofilními látkami nalezeny nebyly.

Výsledky uvedeného pilotního experimentu tak naznačují, že hydrofilní látky mají omezenou schopnost prostupovat touto membránou. Možnost využít Strat M® membránu jako model lidské kůže v kombinaci s hydrofilními látkami je nutné ještě podrobněji experimentálně ověřit. Vzhledem k vybrané problematice a zaměření na zkoumání transportu převážně vodorozpustných aktivních látek bylo z dalších zde prezentovaných experimentů použití umělé kožní membrány také vyřazeno.

## 7. VÝSLEDKY A DISKUZE

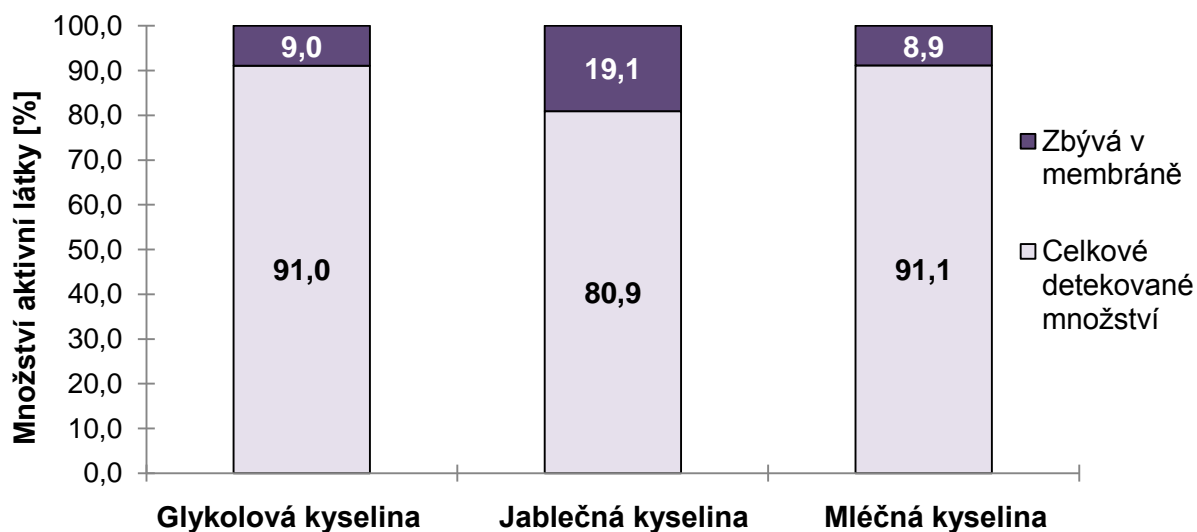
### 7.1. Botnání kůže vlivem hydroxykyselin

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, v průběhu optimalizačních difúzních experimentů v systému „roztok-roztok“ bylo pozorováno botnání kožní membrány pod vlivem vysoké koncentrace vodných roztoků hydroxykyselin (viz Obr. 26). Při vizuálním hodnocení membrán bylo nejvýraznější botnání pozorováno při kontaktu s roztokem kyseliny jablečné.



Obr. 26. Botnání kožní membrány působením kyseliny mléčné a jablečné po 4 hodinách difúzního experimentu

Po vyhodnocení získaných dat na tento jev upozorňovala i látková bilance, kde bylo dle vypočítaných hodnot nejvyšší pohlcené množství aktivní látky v membráně stanoveno u kyseliny jablečné a činilo 19,1 % (Obr. 27). Botnání kožní membrány pod vlivem mléčné a glykolové kyseliny bylo také potvrzeno a jejich hodnoty byly přibližně 9 %. I přesto, že vizuální hodnocení bylo v souladu s látkovou bilancí, bylo rozhodnuto ověřit proces botnání membrány odděleně od difúzních experimentů a přesně stanovit obsah pohlcené kyseliny ručně připravenou kožní membránou.



Obr. 27. Poměr AHA-kyseliny pohlcené kožní membránou k celkovému detekovanému množství po 4 hodinách difúzního experimentu

Pro provedení sorpčního testu byly připraveny 1% roztoky kyseliny mléčné, glykolové a jablečné. Zároveň byla nachystána a vždy zvážena kožní membrána o velikosti 1 x 1 cm. Takto připravená membrána byla ponořena do 5 ml roztoku vybrané kyseliny, zbylých 5 ml roztoku bylo uchováno pro stanovení přesné výchozí koncentrace před zahájením experimentu. Po uplynutí 4 hodin byly membrány vyňaty z roztoků, osušeny, vizuálně ohodnoceny a znovu zváženy. Pro každou membránu byl vypočítán relativní přírůstek hmotnosti dle rovnice 3, který lze definovat jako hmotnost roztoku pohlceného kožní membránou [74].

$$Q = \frac{m_{\tau} - m_0}{m_0} \quad (3)$$

kde:  $m_{\tau}$  – hmotnost [g] botnající kůže v čase  $t$  [hod] od počátku experimentu,  
 $m_0$  – počáteční hmotnost kůže [g],  
 $Q$  – relativní přírůstek hmotnosti.

U každé z použitých membrán byly pozorovány výrazné projevy botnání. Vypočítané hodnoty naznačovaly, že největší přírůstek hmotností byl u vzorku kůže, jež byl ponořený do roztoku kyseliny jablečné (viz Tabulka 9). Tento jev byl potvrzen také vizuálním vyhodnocením vzorku biologických membrán.

*Tabulka 9. Hmotnosti biologických membrán v průběhu botnacího experimentu*

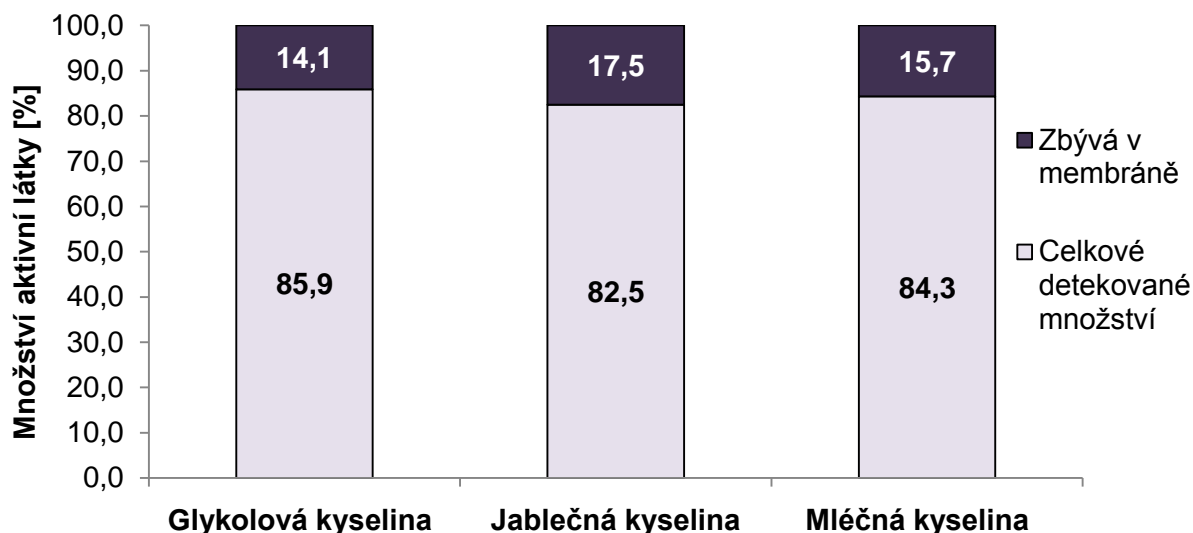
	<b>m kůže před experimentem [g]</b>	<b>m kůže po experimentu [g]</b>	<b><math>\Delta m</math> kůže [g]</b>	<b>Relativní přírůstek hmotnosti Q</b>
<b>Glykolová kyselina</b>	0,7570	1,8219	1,0649	1,41
<b>Jablečná kyselina</b>	0,6079	1,7116	1,1037	1,82
<b>Mléčná kyselina</b>	0,6068	1,5596	0,9528	1,57

Na proces pohlcení roztoku membránou se lze dívat z více uhlů pohledu. Vzhledem k tomu, že vzorek kůže byl ponořen do roztoku kyseliny obsahující samotnou kyselinu a vodu, může dojít k sorpci média dvěma různými způsoby. Membrána může mít tendenci nasávat určité množství celého roztoku. V tomto případě nebude docházet ke změně koncentrace původního roztoku, ale pouze ke změně jeho celkového objemu. V jiném případě membrána může mít větší afinitu jen k jedné složce připraveného roztoku. Pokud dojde k nasátí čisté vody (jako při osmóze), zvýší se koncentrace rozpuštěné látky v zbylém roztoku; pokud kůže preferenčně vytáhne AHA – bude docházet k poklesu množství aktivní látky.

Pro stanovení způsobu sorpce, byla použita množství roztoků zbylá po experimentu a uschované vzorky počátečního roztoku na přípravu vzorků pro iontovou chromatografii (viz kapitola 5.7). Vypočet pohlceného množství kyseliny byl proveden na základě získaných ploch píků pro příslušné roztoky hydroxykyselin před a po 4 hodinách experimentu. Pro lepší znázornění výsledků byly znovu vytvořené sloupcové diagramy pomocí programu Excel, které jsou uvedeny níže (viz Obr. 28).

Bylo stanoveno, že v každém roztoku, do kterého byla ponořena membrána, vždy zbývalo více než 80 % původní koncentrace. Nejvíce zůstalo v roztoku kyseliny glykolové a její množství bylo stanoveno na 85,9 % původního množství.

Vyšší schopnosti membrán botnat v porovnání s difúzním experimentem lze vysvětlit tím, že roztok kyseliny v průběhu tohoto experimentu působil na jejich větší plochu. V porovnání s ostatními hodnotami lze říct, že biologická kožní membrána pohlcovала glykolovou kyselinu nejméně ze všech kyselin. Největší pohlcování kyseliny bylo stanoveno znovu v roztoku kyseliny jablečné a vypočítaná hodnota pohlceného roztoku činila 17,5 % původního množství.



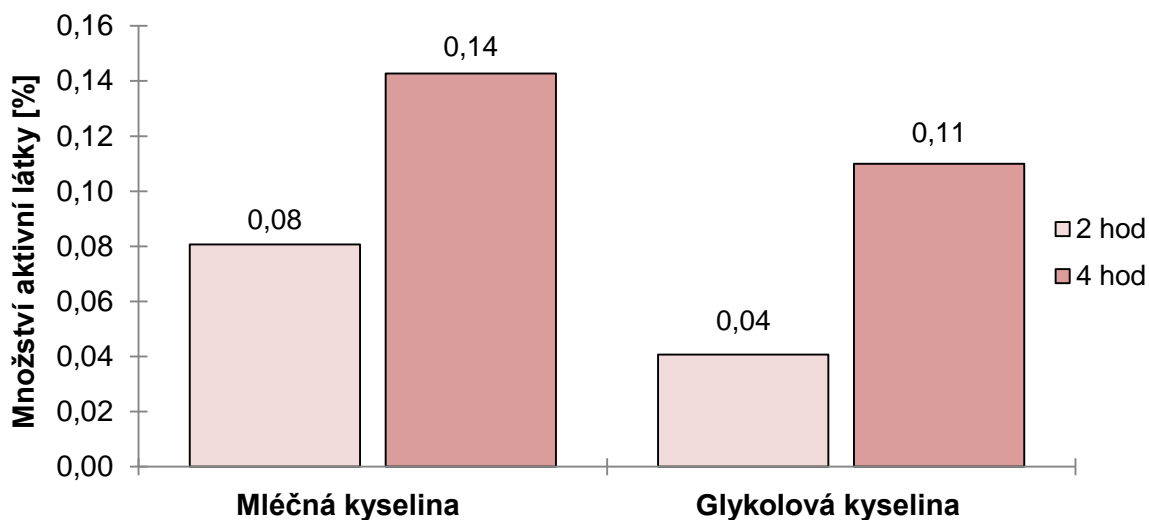
Obr. 28. Poměr AHA-kyseliny pohlcené kožní membránou k celkovému detekovanému množství po 4 hodinách sorpčního experimentu

Tento experiment ještě jednou potvrdil zpozorované změny v membráně po delším působení roztoku kyseliny jablečné. Vypočítané přírůstky hmotností a poté stanovené poklesy koncentrací aktivních látek pomocí iontové chromatografie ve všech roztocích potvrzují, že kožní membrána má vyšší afinitu k alfa-hydroxykyselinám a vytahuje je z připravených roztoků. Kvůli tomu kyselina jablečná byla vyřazena z experimentálně používaných látek. Kožní membrána měla nejmenší tendenci pohlcovat roztok kyseliny glykolové, z čehož lze soudit o vyšší pravděpodobnost úspěšného použití této kyseliny jako pomocné látky pro transport jiných aktivních ingrediencí.

## 7.2. Vliv přítomnosti vitaminů na transport hydroxykyselin

Všechny připravené gely obsahovaly vždy 2 testované aktivní ingredience, tj. hydroxykyselinu a vodorozpustný vitamin, které se mohou ve svých transportních vlastnostech vzájemně ovlivňovat. Předmětem zájmu diplomové práce byl tudíž nejen transport vitaminů a ovlivnění jejich rychlosti přítomností AHA, ale zároveň i opačný efekt: ovlivnění transportu hydroxykyselin z důvodu obsahu vitaminu v systému.

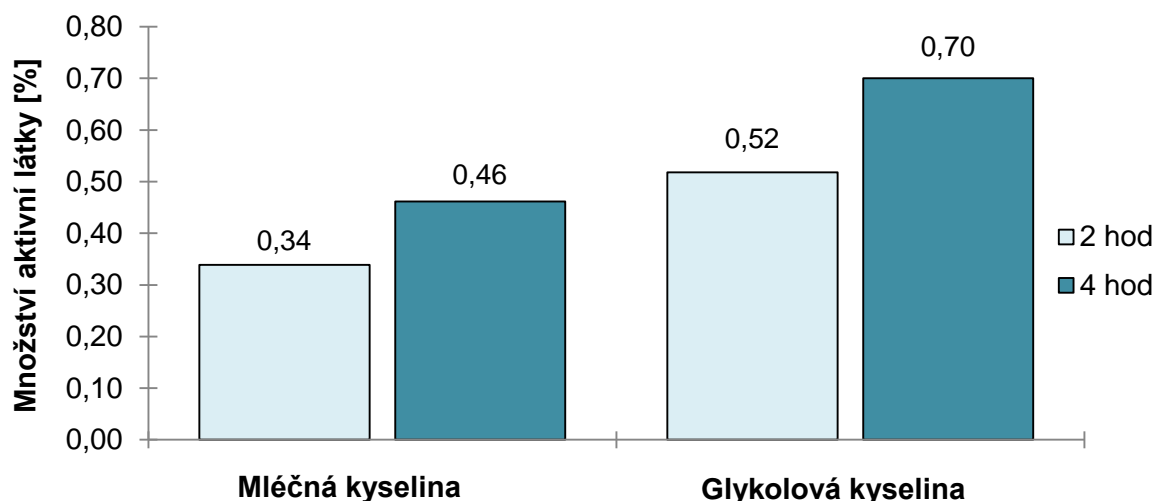
Pro ověření toho, že komerční gel bude schopen uvolňovat AHA i po přidání vitaminu do směsi, byl proveden difúzní experiment s využitím gelu, který obsahoval 1% roztok niacinu a 1 ml 15% hydroxykyseliny. Odebrané vzorky byly analyzovány na obsah vitaminu pomocí HPLC (viz kapitola 7.3.1), jejich zbylé množství bylo použito na přípravu vzorků pro IC na stanovení obsahu AHA. Množství přidané hydroxykyseliny bylo sníženo v porovnání s optimalizovanou metodou, a to z důvodu použití látek, které ještě nebyly prozkoumané v podobné kombinaci. Bylo rozhodnuto začínat s použitím nižších koncentrací pro omezení případných nežádoucích reakcí ve směsi. Zároveň, v případě obdržení přijatelných výsledků, nižší efektivní koncentrace látek by znamenaly nižší cenu výsledného produktu v perspektivě. Všechny získané hodnoty příslušných ploch píků byly propočítány pomocí kalibračních křivek a vztaženy na původní obsah kyseliny. Následně byla připravena závislost množství aktivní látky v procentech, jež prostoupila membránou, na čase experimentu (viz Obr. 29).



Obr. 29. Relativní množství transportovaných hydroxykyselin v kombinaci s niacinem přes kožní membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Při porovnání Obr. 21 a Obr. 29 je patrné, že přidaný niacin do gelů neměl tendenci výrazně ovlivňovat transport hydroxykyselin. V případě kožní membrány, stejně tak i syntetické membrány (Obr. 30), bylo možné pozorovat narůst koncentrace kyselin v čase. Kvůli vyšším bariérovým vlastnostem kožní membrány hodnoty prošlé látky byly vždy nižší v porovnání se syntetickou membránou. Zajímavým postřehem bylo, že přes kožní membránu vyšších hodnot penetrace dosahovala kyselina mléčná, zatímco přes syntetickou membránu kyselina glykolová. Vypočítaná procentuální množství byla hodně blízká hodnotám, které byly získány po vyhodnocení difuze z komerčního gelu, který obsahoval jen hydroxykyseliny (viz Obr. 21).

Lze všimnout nepatného poklesu množství transportované látky v porovnání s optimalizačním experimentem. Teoreticky mohl být tento jev způsobený přidáním niacinem do systému a jeho interakcí s hydroxykyselinami. Studium vzájemného působení kyselin a vitaminů v jedné aktivní farmaceutické kombinaci by mohl být přínosným k rozšíření existujících poznatků v této problematice.



Obr. 30. Relativní množství transportovaných hydroxykyselin v kombinaci s niacinem přes syntetickou membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Vzhledem k tomu, že získané hodnoty odpovídaly hodnotám v průběhu optimalizace, lze transport hydroxykyselin z gelů považovat za nezávislý na přítomnosti vitaminu v roztoku. Z důvodu omezené kapacity IC a nutnosti optimalizovat počet vzorků pro analýzu, další obsahy kyselin po difuzi z gelů s jinými vodorozpustnými vitaminy změřené nebyly.



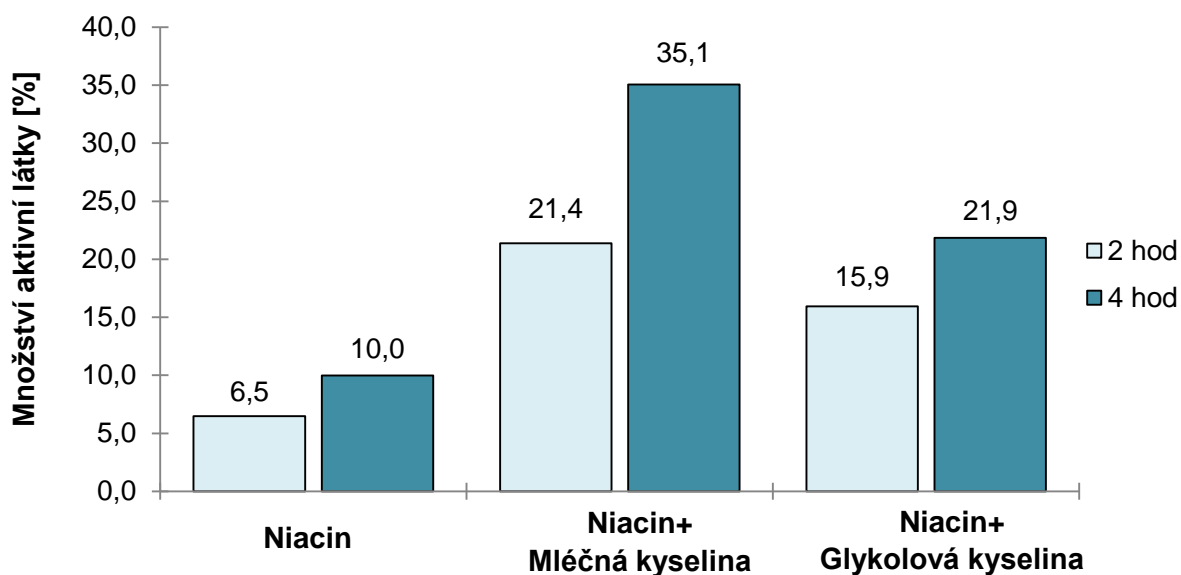
### 7.3. Vliv přítomnosti hydroxykyselin na transport vitaminů

Hlavním účelem všech provedených difúzních experimentů bylo prozkoumat vliv přítomnosti hydroxykyselin na transport vybraných vodorozpustných vitaminů. Za účelem umožnění porovnání výsledků bylo vždy zachováno množství přidané kyseliny do připravených gelů s obsahem vitaminů. Zdrojové roztoky použitých vitaminů byly změřeny v průběhu vývoje HPLC metody, čímž byla potvrzena jejich čistota, kterou zaručoval dodavatel. Žádný z vybraných vitaminů neobsahoval jiné přidané pomocné látky nebo nečistoty v roztoku.

#### 7.3.1. Niacin

Pro simulaci transdermálního transportu byly připraveny gelové vzorky s obsahem roztoku niacinu 0,01 % (m/m) s využitím zdrojového roztoku, který dle informací uvedených v příbalovém letáku obsahoval 10 mg/ml aktivní látky. Připravený roztok byl vmíchaný do komerčního gelu, poté byla přidaná mléčná nebo glykolová kyselina

Difúzní experiment byl proveden s použitím porézních syntetických a biologických kožních membrán dle kapitoly 5.5. Odebrané vzorky přijímacího roztoku z Franzových difúzních cel byly změřeny HPLC metodou. Na základě kalibrační křivky byla vypočítána množství aktivní látky v celém objemu přijímacího roztoku difúzní cely. Zároveň byl zanalyzován i připravený gel pro možnost výpočtu poměru prošlé látky vzhledem k původnímu množství. Všechny výpočty byly provedené pomocí programu MS Excel.



Obr. 31. Relativní množství transportovaného 0,01% niacinu přes syntetickou membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

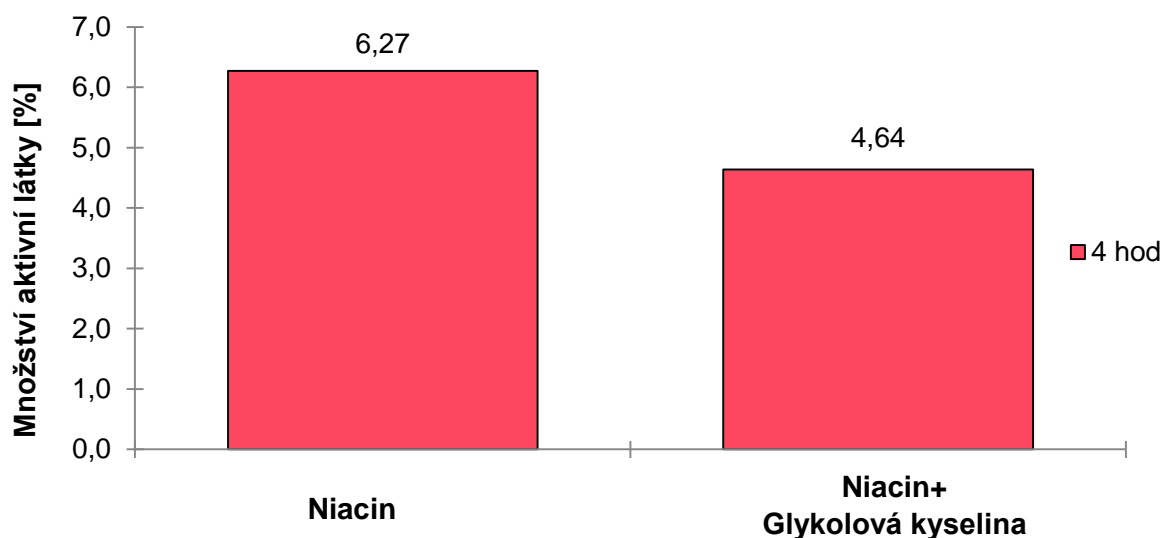
Na Obr. 31 jsou zobrazeny výsledky získané po vyhodnocení chromatografických záznamů. Bylo zjištěno, že niacin bez přidané alfa-hydroxykyseliny byl schopen procházet syntetickou membránou bezproblémově, a to i při poměrně nízké použité koncentraci. Přitom byl detekován výrazný nárůst aktivní látky v čase, což znamenalo, že membrána připraveným gelem byla pokryta rovnoměrně. Vypočítané hodnoty potvrzovaly schopnost komerčního gelu uvolňovat do něho vmíchané ingredience. Přidaná kyselina mléčná výrazně podporovala transport niacinu přes syntetickou membránu. Uvolněné množství niacinu po 4 hodinách experimentu ve zmíněné kombinaci bylo stanoveno na 35,1 % původního množství.



Z gelu s niacinem v tandemu s glykolovou kyselinou prošlo o něco méně látky a vypočítané hodnoty činily 21,9 %. Při porovnání s gelem obsahujícím jen čistý niacin syntetickou membránou prošlo za stejný čas cca 2krát větší množství vitamínu za přítomnosti kyseliny glykolové a 3krát větší množství v kombinaci s kyselinou mléčnou. Na základě těchto výsledků bylo předpokládáno, že obě hydroxykyseliny by mohly podporovat průchod niacinu také v případě kožní membrány.

Avšak ve vzorcích, které byly odebrané po difuzi přes kožní membránu, nebylo stanoveno detekovatelné množství niacinu ani po uplynutí 4 hodin experimentu. Tento jev může být způsoben především poměrně nízkou původní koncentrací niacinu v gelu, která v kombinaci s hydrofilním charakterem vitamínu není schopna překonat bariérové vlastnosti kůže. Z tohoto důvodů bylo rozhodnuto zvýšit koncentraci roztoku niacinu v gelech na 1 %. Vzhledem k tomu, že pomocí syntetické membrány byl ověřen potenciální prostup aktivní látky, bylo navrženo nadále pokračovat v experimentu s niacinem jen s použitím kožní membrány.

Ani po zvýšení koncentrace niacinu gelu na 1 %, nebyl po dvou hodinách difuze přes kožní membránu v odebraných vzorcích detekován žádný vitamin. Po 4 hodinách experimentu už bylo možné pomocí HPLC analýzy detekovat množství niacinu, ale jen ve dvou případech: z gelu bez AHA a gelu s obsahem kyseliny glykolové. Výsledky s naměřenými hodnotami jsou uvedeny v na Obr. 32.

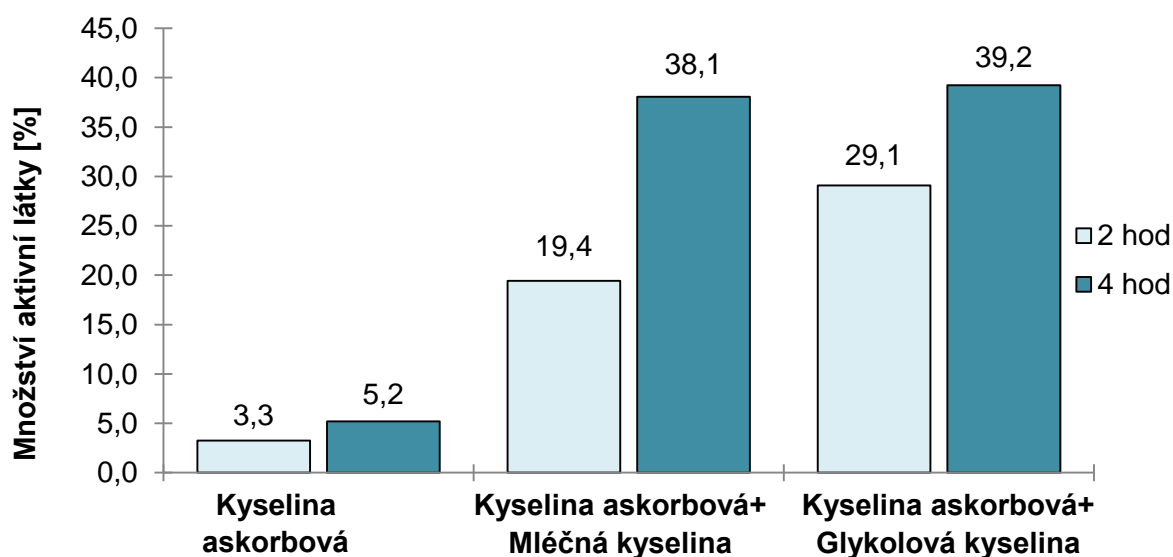


Obr. 32. Relativní množství transportovaného 1% niacinu přes kožní membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Z výše uvedených hodnot je zřejmé, že 4 hodiny jsou minimální potřebný čas pro transdermální transport niacinu z 1% roztoků přes kožní membránu. V případě difuze z gelu obsahujícího pouze niacin bylo jeho množství v celém objemu přijímací komory vypočítáno na 0,31 mg. Při původním obsahu 5 mg aktivní látky ve zdrojovém gelu činila efektivita prostupu přibližně 6 %. Vliv přítomnosti hydroxykyselin byl v tomto případě zcela jiný ve srovnání s difuzí přes syntetickou porézní membránu. V případě kožní membrány se hydroxykyseliny projeví jako retardéry prostupu niacinu kůží. Zatímco v kombinaci s kyselinou mléčnou nebyl ani po 4 hodinách difúzního experimentu detekován niacin v přijímacím roztoku. V tandemu s kyselinou glykolovou kleslo množství penetrovaného niacinu do přijímacího roztoku přibližně o čtvrtinu.

### 7.3.2. Vitamin C

Další difúzní experiment byl proveden s použitím vitaminu C. Byl připraven 1% roztok kyseliny askorbové, a vmíchán v objemu 2 ml do komerčního gelu. Jak je vidět na Obr. 33, transport vitaminu C přes syntetickou membránu ve všech variantách vykazoval vysokou efektivitu přestupu. Například v kombinaci s kyselinou glykolovou v celém objemu přijímacího roztoku difúzní cely bylo detekováno 3,92 mg látky z celkově dodaných 10 mg. Účinnost transportu v této kombinaci byla stanovena na 39 % a tato směs se projevila jako nejúčinnější ze všech. Samotný vitamin C neměl tak velkou tendenci procházet přes syntetickou membránu a po 4 hodinách experimentu bylo přeneseno jenom 5 % vitaminu C z původního množství.

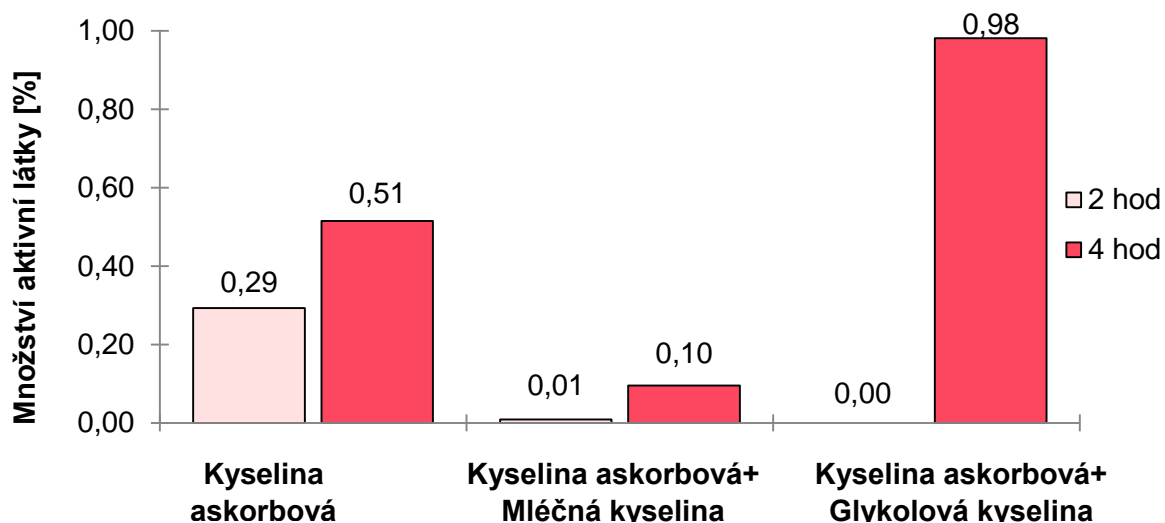


Obr. 33. Relativní množství transportovaného 1% vitaminu C přes syntetickou membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Na základě pozitivních výsledků týkajících se transportu vitaminu C přes syntetickou membránu byl proveden další difúzní experiment s použitím prasečí kůže. Jak i bylo očekáváno, množství detekované látky v přijímacím roztoku bylo výrazně nižší. Po 2 hodinách difuze množství aktivní látky bylo na hranici meze detekce. Toto mohlo být způsobeno horšími propouštěcími vlastnostmi kožní membrány, její komplexní strukturou a schopností interagovat s aktivními látkami. Z tohoto důvodu tento čas může být posouzen za nedostatečný pro pasivní transport vitaminu C v nízkých původních koncentracích přes kůži.

Po 4 hodinách experimentu už byla stanovena množství aktivních látek, ze kterých je možné vyvodit tendenci látky prostupovat kožní membránou a její ovlivnění v důsledku přítomnosti AHA. Detekované množství v celém objemu dolní komory Franzovy cely se pohybovalo v rozmezí do 1 % od původního množství, ale i přesto lze všimnout, že kyselina glykolová znovu přispívala transportu vitaminu C. Z gelu obsahujícího kyselinu glykolovou, prostoupilo přibližně dvakrát vyšší množství přes kožní membránu než z gelu jen se samotným vitaminem (Obr. 34). Při porovnání těchto výsledků s experimentem s niacinem, kde obě kyseliny zpomalovaly transport aktivní látky, lze říct, že jako málo efektivní

kombinace se projevila jen směs kyseliny askorbové s kyselinou mléčnou. Po 4 hodinách experimentu procentuální množství vitamínu C bylo stanoveno jen na 0,1 %.



Obr. 34. Relativní množství transportovaného 1% vitamínu C přes kožní membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

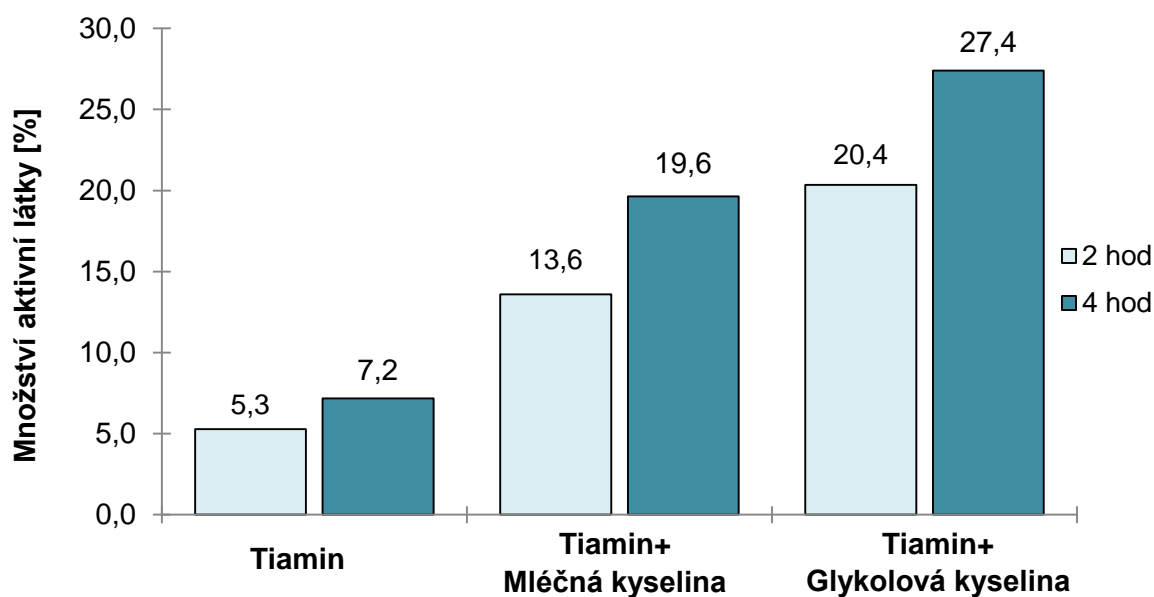
Dle těchto výsledků bylo možné shrnout, že transport kyseliny askorbové byl efektivnější ze směsi obsahující kyselinu glykolovou. Kyselina mléčná výrazně zpomalovala transport vitamínu C přes kůži. Důvod tak značného poklesu penetračních schopností není znám a budoucí studium této problematiky by mohl objasnit tento efekt.

### 7.3.3. Tiamin

Vzhledem k tomu, že transdermální transport nemodifikovaného tiaminu nebyl ještě prozkoumán, bylo rozhodnuto provést experiment s použitím syntetické membrány pro primární vyhodnocení potenciálu tiaminu pro transdermální transport. Vzhledem k nejistým vstupním datům, byla vypočítaná množství látek po vyhodnocení chromatografických záznamů z HPLC dosti překvapující.

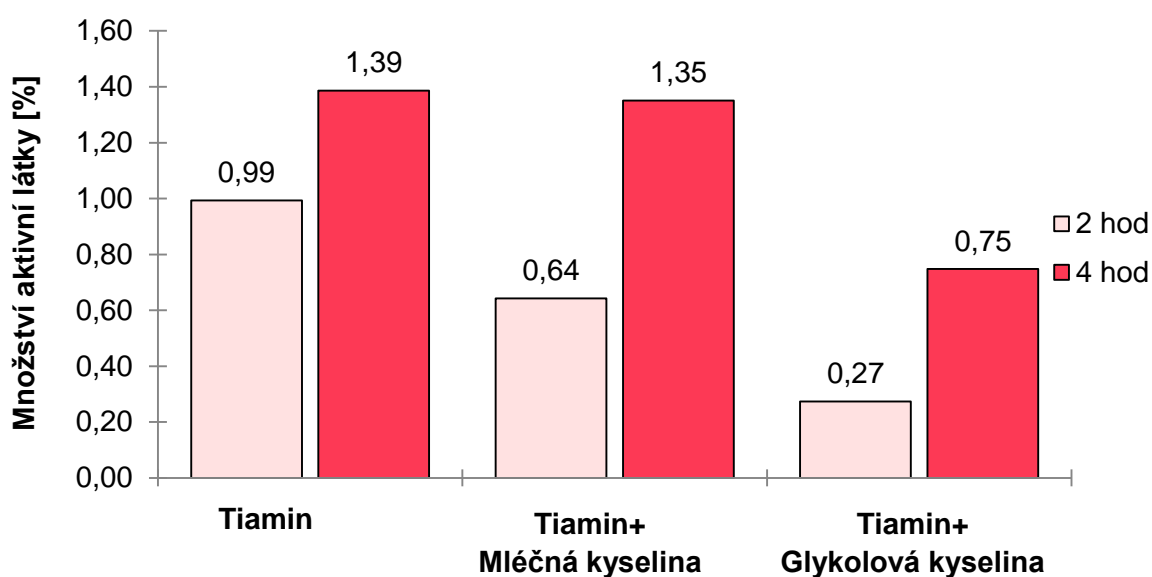
Z níže uvedeného Obr. 35 lze pozorovat pravidelný nárůst aktivní látky v čase. Gel aplikovaný na membránu gel obsahoval 10 mg aktivní látky. Už po 2 hodinách experimentu množství tiaminu v celém objemu přijímacího roztoku přesahovala 5 % celkového množství. Bylo zřejmé, že samostatně má tiamin nižší schopnost penetrovat než v kombinaci s AHA. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při použití směsi tiaminu s glykolovou kyselinou, přičemž množství provedené látky přes membránu po 4 hodinách experimentu bylo stanoveno na 27,4 % původního množství. V kombinaci s kyselinou mléčnou do přijímacího roztoku prošlo o něco méně látky a to 19,6 % původního obsahu. V porovnání s gelem obsahujícím jen tiamin lze říct, že efektivita penetrace byla zvýšena minimálně 2krát v důsledku přidání hydroxykyseliny.

Ukázalo se, že i přes kožní membránu měl tiamin tendenci prostupovat bez problémů. Už po dvou hodinách působení aktivní látky na kůži bylo možné ho detekovat pomocí HPLC metody. Například z gelu bez AHA prostoupilo 1,4 % látky původního množství, což je víc, než bylo detekováno u vitamínu C po 4 hodinách experimentu přes kožní membránu, přestože je kyselina askorbová známou a hodně používanou ingrediencí v kosmetickém odvětví.



Obr. 35. Relativní množství transportovaného 1% tiaminu přes syntetickou membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Co se týče efektu přidání hydroxykyselin, dle výsledků uvedených na Obr. 36 lze říct, že AHA nepatrně inhibují transdermální transport tiaminu. V případě použití kyseliny glykolové lze pozorovat výrazné zpomalování difuze během prvních dvou hodin. Stejný efekt má i kyselina mléčná, ale v menším rozsahu. Po 4 hodinách experimentu z původního gelu s obsahem kyseliny glykolové bylo množství vitamínu B1 v přijímacím roztoku srovnatelné s množstvím detekovaným v roztoku odebraném po působení gelu s čistým tiaminem. Z gelů obsahujících kyselinu mléčnou jako pomocnou látku bylo detekováno stejné množství vitamínu jako u gelů jen se samotným tiaminem. Z toho lze posoudit, že i přesto, že kyselina mléčná během prvních hodin brzdí transport aktivní látky, po delší době působení nemá na penetraci výrazný vliv.



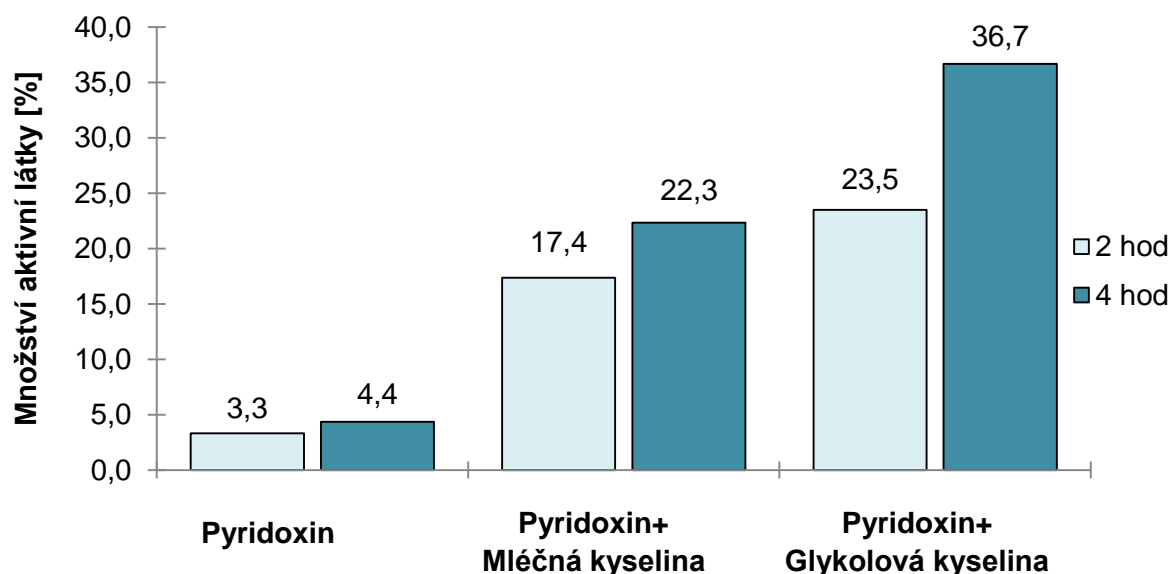
Obr. 36. Relativní množství transportovaného 1% tiaminu přes kožní membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Celkově se prokázalo, že transdermální transport tiaminu má velký potenciál. I nevysoká použitá koncentrace vitamínu měla tendenci se postupně uvolňovat, v poměrně krátkých časových intervalech. Možné navýšení doby experimentů nebo úprava složení by mohla pomoci dosáhnout ještě účinnější penetrace a přinést možnost vytvoření nového kosmetického nebo farmaceutického přípravku. Jediným problémem by mohla být docela silná specifická vůně roztoku tiaminu kvůli přítomnosti síry v jeho struktuře. Případný zhotovený přípravek by měl mít výraznou aromatickou kompozici za účelem maskování této vůně, nebo by byla nutná modifikace struktury tiaminu a opakované ověření penetračních vlastností.

#### 7.3.4. Pyridoxin

Posledním v řadě použitých aktivních látek byl pyridoxin. Stejně jako u tiaminu bylo docela složité najít vědecké články s popisem transdermálního transportu vitamínu B<sub>6</sub>, proto bylo rozhodnuto samostatně ověřit jeho schopnost penetrovat nejprve přes syntetické membrány.

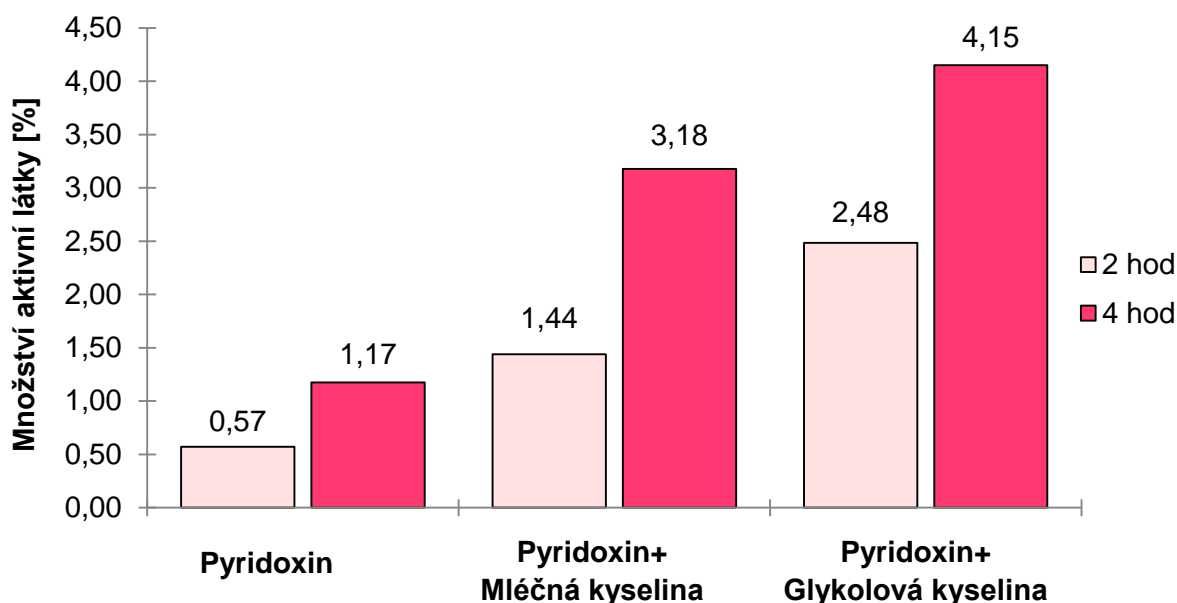
Jako i u jiných vitaminů skupiny B, byl znovu detekovat nárůst koncentrace vitamínu v čase, což už po několikáté potvrdilo schopnost komerčního gelu bezproblémově uvolňovat aktivní látky (Obr. 37). Velice překvapujícím objevem bylo poměrně velké množství prostoupené látky v porovnání se všemi předcházejícími experimenty. Například z gelu s obsahem pyridoxinu a kyseliny glykolové po 4 hodinách experimentu prostoupilo membránou 36,7 % látky. Je to nejvyšší dosažená hodnota mezi všemi provedenými experimenty přes syntetické membrány. Kyselina mléčná v tomto případě měla menší účinnost, ale i přesto bylo množství transportované látky stanoveno na 22,3 %, což je minimálně pětkrát víc než z gelu obsahující samotný pyridoxin. Z těchto výsledků bylo možné posoudit, že hydroxykyseliny výrazně zvyšují schopnost pyridoxinu procházet skrz membránu, a proto byl neprodleně proveden difúzní experiment i s použitím kožní membrány.



Obr. 37. Relativní množství transportovaného 1% pyridoxinu přes syntetickou membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Složení použitých gelů bylo zachováno a připravený gel vždy obsahoval 10 mg aktivní látky. Na základě takto realizovaných experimentů bylo potvrzeno, že pyridoxin je schopen prostupovat také kožní membránou. Stanovené množství bylo nejen srovnatelné, ale dokonce výrazně vyšší než u běžně používaných vitaminů v kosmetickém odvětví.

Na Obr. 38 lze pozorovat podobnou tendenci pyridoxinu prostupovat, jak bylo pozorováno u syntetické membrány. Samotný vitamin prostupuje o hodně méně než v kombinaci s AHA, ale i přesto je detekované množství vyšší než například u vitaminu C za stejný čas. Zajímavým objevem tohoto experimentu lze nazvat kombinaci pyridoxinu s kyselinou glykolovou. Je zřejmé, že stanovená koncentrace v přijímacím roztoku byla už po 2 hodinách experimentu minimálně 4krát vyšší než u gelu, který obsahoval čistý pyridoxin.



Obr. 38. Relativní množství transportovaného 1% pyridoxinu přes kožní membránu z gelů (vyjádřeno v % původního látkového množství dodaného ve zdrojovém roztoku)

Po 4 hodinách experimentu množství transdermálně transportované látky bylo stanoveno na 0,41 mg, což činilo 4,15 % původního množství. Tento výsledek lze považovat za jeden z nejvyšších za stejný časový úsek mezi všemi provedenými pokusy v experimentální části. Kyselina mléčná, jako i dříve, měla menší vliv na účinnost transportu. Avšak stanovená hodnota v 3,2 % původního obsahu po 4 hodinách působení aktivní látky může být zařazena mezi nejlepší dosažené hodnoty v průběhu celé diplomové práce.

Kombinace kyseliny glykolové s pyridoxinem má velký potenciál a vypadá jako nadějná formulace pro transdermální podání tohoto vitaminu. Mezi všemi studovanými vodorozpustnými vitaminy se pyridoxin projevil nejlépe skrz jeho schopnost překonávat bariérové vlastnosti kožní membrány. Při případném navýšení času působení této směsi nebo úpravě poměru použitých látek ve složení formulaci by bylo možné dosáhnout ještě lepších výsledků.

## ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala experimentálním studiem transdermálního transportu hydroxykyselin a jejich kombinací s vitaminy rozpustnými ve vodě pro ověření potenciálního využití v kosmetickém a farmaceutickém odvětví. Cílem bylo na základě literární rešerše provést výběr hydroxykyselin a aktivních farmaceutických ingrediencí, navrhnout modelový systém a vhodnou metodiku pro studium penetrace aktivních látek a s jejím využitím prozkoumat jejich vzájemný vliv na rychlost difuze přes modelové membrány.

Jako zástupci alfa-hydroxykyselin byly použity kyselina mléčná a kyselina glykolová, s nimiž se lze často setkat v komerčně dostupných kosmetických nebo farmaceutických přípravcích. Kyselina jablečná byla přidána pro rozšíření experimentální řady na základě její neprozkoumaných vlastností pro topické aplikace. Představitelem beta-hydroxykyselin byla 3-hydroxybutyrová kyselina v návaznosti na předchozí bakalářskou práci, v níž byla zkoumána kyselina salicylová, jež vykazovala tendenci prostupovat kožní membránou. Tyto čtyři hydroxykyseliny byly v první části experimentu samostatně prozkoumány z hlediska jejich schopnosti procházet membránami. Následně byly do experimentální části práce zařazeny jako další aktivní látky vodorozpustné vitaminy. Byly vytvořeny kompozice, ve kterých byly vybrané vitaminy aplikovány samostatně nebo v kombinaci s hydroxykyselinami.

Pro studium transdermálního transportu aktivních látek byly vybrány syntetické, biologické kožní a umělé kožní membrány Strat M®. Membrány Strat M® nenaplnily očekávání. Po provedení několika experimentů bylo zjištěno, že žádná z použitých aktivních látek nebyla schopna touto membránou v aplikačně relevantním čase procházet a nebylo možné detekovat prakticky zadně množství. Tato skutečnost vedla k předpokladu, že daný typ membrán je primárně vhodný spíše pro lipofilní sloučeniny. Tuto hypotézu by bylo vhodné ověřit další experimentální studií. Kůže pro přípravu modelových biologických membrán byla izolována z prasečích uší, protože prasečí kůže se z hlediska anatomie dostatečně podobá lidské kůži. Membrány byly připraveny ručně pomocí chirurgického skalpelu. Kvalita, homogenita a jednotnost tloušťky takových membrán byla výrazně ovlivněna ručním nařezáváním.

Mezi analytické metody pro určení aktivních látek byla použita iontová chromatografie pro zjištění množství hydroxykyselin a kapalinová chromatografie pro detekci a kvantitativní stanovení vitaminů. Difúzní experimenty byly realizovány prostřednictvím vertikálních Franzových difúzních cel. Experimentální část práce zahrnovala rozsáhlou přípravnou a optimalizační fázi, v průběhu které byly vytvořeny metody stanovení pro každou aktivní látku. Dále byla ověřena opakovatelnost iontové chromatografie za účelem kontroly správnosti a použitelnosti generovaných výsledků. Byla vytvořena HPLC metoda na stanovení vodorozpustných vitaminů. Navržená metodika difúzních experimentů byla podrobena značné optimalizaci kvůli velkému množství praktických komplikací, jako například obtížné utěsnění aparatury v případě roztokové zdrojové kompozice. Finální metodika proto zahrnovala aplikaci testovaných kompozic v gelové formě vytvořené s využitím komerčního gelového základu doplněného o testované aktivní látky.

Ze získaných výsledků pomocí iontové chromatografie bylo stanoveno, že kyselina mléčná, glykolová a jablečná dobře prostupují skrz syntetické i kožní membrány. Při vizuálním hodnocení bylo zpozorováno botnění kožní membrány pod vlivem vysoce koncentrovaných

roztoků hydroxykyselin. Po provedení sorpčního experimentu byla potvrzena schopnost kožní membrány botnat a přitom preferenčně absorbovat hydroxykyseliny do svého objemu. Tento jev se nejintenzivněji projevoval v případě kyseliny jablečné, kvůli čemuž byla tato látka vyřazena ze seznamu dále studovaných aktivních látek. Co se týče 3HB kyseliny jako zástupce beta-hydroxykyselin, její schopnost penetrovat z roztoku byla stanovena jako poměrně nízká ve srovnání s AHA, a to mimo jiné také proto, že membrána pohlcovala víc než polovinu aktivní látky v porovnání s původním množstvím. Vzhledem k ceně a zkoumaným vysokým koncentracím může být její potenciální použití v kosmetických přípravcích z ekonomického hlediska nevýhodné. I přesto lze považovat tento experiment za přínosný vzhledem k rozšíření existujících poznatků týkajících se 3-hydroxybutyrové kyseliny. Do dalších experimentů za účelem ověření vlivu hydroxykyselin na transport jiných aktivních látek byly použity jen mléčná a glykolová kyselina.

Uvolňování vodorozpuštěných vitaminů bylo testováno prostřednictvím stejné difúzní techniky. K realizaci experimentů byl vybrán niacin a kyselina askorbová, které jsou běžně používanými ingrediencemi v komerčně dostupných přípravcích. Současně byl do experimentální řady přidán tiamin a pyridoxin jako látky poměrně málo prostudované, co se týče jejich transdermálního transportu. Bylo prokázáno, že každý z těchto vitaminů prostupuje z gelových matric jak srze porézní syntetickou, tak i skrze modelovou kožní membránu. Minimální čas potřebný pro efektivní penetraci vitaminů byl stanoven na 4 hodiny. Byl ověřen a diskutován vliv hydroxykyselin na penetraci vitaminů z gelů. Jak bylo předpokládáno, kožní membrána tvořila efektivní biologickou bariéru, proto byl transport hydrofilních aktivních látek poměrně výrazně potlačen. Z procentuálního vyjádření množství prostoupených aktivních látek bylo stanoveno, že nejvyšší efektivita prostupu byla v případě kožní membrány zaznamenána u pyridoxinu.

Dále bylo zjištěno, že kyselina glykolová v kombinaci s pyridoxinem výrazně podporuje jeho transdermální transport. Z těchto výsledků lze tvrdit, že pyridoxin má zajímavý potenciál pro případné budoucí topické aplikace. Podobně také tiamin disponoval zajímavými transdermálními penetračními schopnostmi, proto se další výzkum jeví slibně.

Celkově lze shrnout, že provedená studie může být považována za přínosnou v rámci řešené problematiky týkající se transdermálního transportu vitaminů a hydroxykyselin. Byly získány originální a zajímavé poznatky týkající se transportních vlastností individuálních aktivních látek, respektive jejich kombinací. Během této práce bylo posbíráno velké množství prvotních poznatků, na něž lze navázat v rámci dalšího komplexnějšího experimentálního studia.



## POUŽITÁ LITERATURA

1. MICHALUN, M. Varinia a Joseph C. DINARDO. *Milady skin care and cosmetic ingredients dictionary*. Fourth edition. Clifton Park, NJ: Cengage Learning, [2015]. ISBN 978–1285060798.
2. САМЦОВ, А.В. а В.В. БАРБИНОВ. *Дерматовенерология: Учебник для медицинских вузов*. 1. Санкт–Петербург: СпецЛит, 2008. ISBN 978–5–299–00365–9.
3. *Fliart: Human Epidermal Layers* [online]. Shvpl.info, 2017 [cit. 2019–11–26]. Dostupné z: <https://www.shvpl.info/imagehgkL-human-epidermaL-layers.htm>
4. *TinaMead: advanced skin therapy* [online]. Tinamead [cit. 2019–11–26]. Dostupné z: <http://www.tinamead.com/category/skin-health/>
5. KOLARSICK, Paul A. J., Maria Ann KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2011, 3(4), 203–213 [cit. 2019–12–01]. DoI: 10.1097/JDN.0b013e3182274a98. ISSN 1945–760X. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=01412499–201107000–00003>
6. *Farmakologie pro klinika: Základní mechanismy transportu léčiv v organismu*. UK v Praze: Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016, 26(5).
7. A. WISE, James, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Jody E. Johnson, Oksana Korol a Mark Womble. *Anatomy & Physiology*. 1. Rice University: OpenStax College, 2013. ISBN 978–1938168130.
8. CHEKMAN, Ivan S. a Pavel V. SIMONOV. Structure and Function of Biological Membranes: The Impact of Nanoparticles. *International Journal of Physiology and Pathophysiology* [online]. 2012, 3(2), 187–208 [cit. 2019–12–03]. DoI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v3.i2.80. ISSN 2155–014X. Dostupné z: [http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1\\_551b155962667b02\\_6f6725a36a5353bd.html](http://www.dl.begellhouse.com/journals/6ec4ba27650016b1_551b155962667b02_6f6725a36a5353bd.html)
9. БЫКОВ, В.Л. *Цитология и общая гистология: Функциональная морфология клеток и тканей человека*. 1. Москва: Сотис, 2002. ISBN 5–85503–080–6.
10. KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. *Biofyzikální chemie*. Praha: Academia, 2000. ISBN 80–200–0791–1.
11. FIŠAR, Zdeněk. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. 2., přeprac. A dopl. Vyd. Praha: Grada, 2009. Psyché (Grada). ISBN 9788024727370.
12. NOVÁK, Josef. *Příklady a úlohy z fyzikální chemie*. 2. Přeprac. Vyd. Praha: Vysoká škola chemicko–technologická, 2000. ISBN 978–80–7080–394–3.
13. PERMEGEAR. *Permegear* [online]. Hellertown: PermeGear, 2019 [cit. 2019–11–23]. Dostupné z: <https://permegear.com/franz-cells/>
14. MERCK. *Merckmillipore* [online]. Darmstadt, Germany: Merck, 2019 [cit. 2019–11–23]. Dostupné z: [https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM\\_NF-C112892?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Findustries%2Fcosmetics-and-personal-care%2Fstrat-m-transdermal-diffusion-membrane.html#overview](https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Findustries%2Fcosmetics-and-personal-care%2Fstrat-m-transdermal-diffusion-membrane.html#overview)

15. Membránový filtr Pragopor z nitrátu celulózy. *VERKON: společnost pro Vaši laboratoř* [online]. Praha: VERKON, 2020 [cit. 2020–02–19]. Dostupné z: <https://www.verkon.cz/membranovy-filtr-pragopor-z-nitratu-celulozy-kruhove-vyseky/>
16. *Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro*. Česko: Ústav hygieny a preventivního lékařství, Univerzita Karlova v Praze, 2009, **103**(7). ISSN 0009-2770; 1213-7103 (elektronická verze).
17. Spectrophotometry Applications and Fundamentals: UV/VIS Spectrophotometry Fundamentals Guide. *Mt.com* [online]. Mettler Toledo [cit. 2019–12–11]. Dostupné z: <https://www.mt.com/us/en/home/library/guides/laboratory-division/1/uvvis-spectrophotometry-guide-applications-fundamentals.html>
18. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. A dopl. Vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80–86369–07–2.
19. PERKAMPUS, Heinz–Helmut. *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Berlin: Springer, 1992. Springer laboratory. ISBN 978–3–642–77479–9.
20. NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80–7184–365–2.
21. A Practical Guide to Ion Chromatography a Practical Guide to Ion Chromatography. *A Practical Guide to Ion Chromatography a Practical Guide to Ion Chromatography*. 2. Sweden: SeQuant AB, 2007, s. 26. ISBN 978–91–631–8056–9.
22. WEISS, Joachim. *Handbook of Ion Chromatography* [online]. 1. Weinheim, Germany: Wiley–VCH Verlag GmbH & Co., 2016 [cit. 2020–02–11]. DoI: 10.1002/9783527651610. ISBN 9783527651610. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527651610>
23. TIMERBAEV, A.R. a G.K. BONN. Complexation ion 66ngl.66logy6666phy —an overview of developments and trends in trace metal analysis. *Journal of Chromatography a* [online]. 1993, **640**(1–2), 195–206 [cit. 2020–02–11]. DoI: 10.1016/0021–9673(93)80182–8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967393801828>
24. BALDRIANOVÁ, Lucie a Peter BARATH. IONTOVÁ CHROMATOGRAFIE na PROFESIONÁLNÍ ÚROVNI. *CHEMAGAZÍN*. 2011, **XXI**(6), 10–11.
25. *Waters: The science of what's possible* [online]. Prague: WATERS, 2020 [cit. 2020–02–15]. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_CZ](https://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ)
26. *Laboratory Info: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications* [online]. Nepal: LaboratoryInfo.com, 2020 [cit. 2020–02–15]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
27. VAN SCOTT, Eugene J. a Ruey J. YU. Hyperkeratinization, 66ngl.66logy66 cohesion, and alpha hydroxy acids. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 1984, **11**(5), 867–879 [cit. 2020–02–15]. DoI: 10.1016/S0190–9622(84)80466–1. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962284804661>

28. TUNG, Rebecca C., Wilma F. BERGFELD, Allison T. VIDIMOS a Berna K. REMZI. Hydroxy Acid. Based Cosmetic Procedures. *American Journal of Clinical Dermatology* [online]. 2000, 1(2), 81–88 [cit. 2020–02–15]. DoI: 10.2165/00128071–200001020–00002. ISSN 1175–0561. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00128071–200001020–00002>
29. WANG, Xiao. A theory for the mechanism of action of the  $\alpha$ -hydroxy acids applied to the skin. *Medical Hypotheses* [online]. 1999, 53(5), 380–382 [cit. 2020–02–15]. DoI: 10.1054/mehy.1998.0788. ISSN 03069877. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987798907885>
30. TANG, Sheau-Chung a Jen-Hung YANG. Dual Effects of Alpha-Hydroxy Acids on the Skin. *Molecules* [online]. 2018, 23(4), 1-12 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.3390/molecules23040863. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/863>
31. *Glycolic Acid: Pharmacy Compounding Advisory Committee Meeting* [online]. USA: FDA, 2016 [cit. 2020–02–15]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/101373/download>
32. KAIDBEY, Kays, Betsy SUTHERLAND, Paula BENNETT, Wayne G. WAMER, Curtis BARTON, Donna DENNIS a Andrija KORNHAUSER. Topical glycolic acid enhances photodamage by ultraviolet light. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* [online]. 2003, 19(1), 21–27 [cit. 2020–02–15]. DoI: 10.1034/j.1600–0781.2003.00013.x. ISSN 0905–4383. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600–0781.2003.00013.x>
33. *TOXICITY PROFILE FOR LACTIC ACID* [online]. Wallington: Bibra 67ngl.67logy advice & consulting, 2014 [cit. 2020–02–15]. Dostupné z: <https://www.bibra-information.co.uk/downloads/toxicity-profile-for-lactic-acid-1990/>
34. *Новые химические технологии: АНАЛИТИЧЕСКИЙ ПОРТАЛ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ* [online]. Москва: Newchemistry.ru, 2006 [cit. 2020–02–16]. Dostupné z: [http://newchemistry.ru/letter.php?n\\_id=6177](http://newchemistry.ru/letter.php?n_id=6177)
35. BRITAIN, Harry G. Malic Acid. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* [online]. 1. New Jersey: Elsevier, 2001, 2001, s. 153–195 [cit. 2020–02–16]. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. DoI: 10.1016/S1075–6280(01)28005–7. ISBN 9780122608285. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075628001280057>
36. VOLHINA, A. Uvolňování aktivních ingrediencí z gelových matric. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..
37. *MERCK: Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Merck, 2020 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/166898?lang=en&region=CZ>
38. *MERCK: Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Merck, 2020 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/ascorbicacid176125081711?lang=en&region=CZ>
39. *MERCK: Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Merck, 2020 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/t4625?lang=en&region=CZ>

40. MERCK: *Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Merck, 2020 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/niacinnicotinicacid123115967611?lang=en&region=CZ>
41. MERCK: *Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Merck, 2020 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/pyridoxinehydrochloride205645856011?lang=en&region=CZ>
42. TOKIWA, Y a C UGWU. Biotechnological production of PAK–3–hydroxybutyric acid monomer. *Journal of Biotechnology* [online]. 2007, **132**(3), 264–272 [cit. 2020–02–16]. DoI: 10.1016/j.jbiotec.2007.03.015. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165607002672>
43. PRISCO, Francesco, Antonio PICARDI, Dario IAFUSCO, et al. Blood ketone bodies in patients with recent–onset type 1 diabetes (a multicenter study). *Pediatric Diabetes* [online]. 2006, **7**(4), 223–228 [cit. 2020–02–16]. DoI: 10.1111/j.1399–5448.2006.00187.x. ISSN 1399–543X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399–5448.2006.00187.x>
44. VASILJEVIĆ, Dragana, Nataša RADONJIĆ a Gordana VULETA. Vitamins in cosmetic products: Current opinions and practice. *Arhiv za farmaciju* [online]. 2017, **67**(6), 248–264 [cit. 2020–02–10]. DoI: 10.5937/arhfarm1704248V. ISSN 0004–1963. Dostupné z: <http://scindeks.ceon.rs/Article.aspx?artid=0004–19631704248V>
45. Dr. Hans Lautenschläger. *DermaVIDUALS: Vitamins in cosmetics*. *Www.dermaVIDUALS.com* [online]. Leichlingen: Copyright Kosmetik Konzept KOKO GmbH & Co., 2011 [cit. 2020–02–10]. Dostupné z: <https://www.dermaVIDUALS.com/english/publications/special-actives/vitamins-in-cosmetics.html>
46. TRAIKOVICH, Steven S. Use of Topical Ascorbic Acid and Its Effects on Photodamaged Skin Topography. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* [online]. 1999, **125**(10) [cit. 2020–02–16]. DoI: 10.1001/archotol.125.10.1091. ISSN 0886–4470. Dostupné z: <http://archotol.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archotol.125.10.1091>
47. *Drugs During Pregnancy and Lactation* [online]. 3rd Edition. Europe: Elsevier, 2015 [cit. 2020–02–16]. DoI: 10.1016/C2011–0–09100–7. ISBN 9780124080782. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780124080782/drugs-during-pregnancy-and-lactation>
48. CROOK, Martin A. Methods for assessment of Thiamine (Vitamin B1). *Laboratory Assessment of Vitamin Status* [online]. 8th ed. United Kingdom: Elsevier, 2019, 2019, s. 149–164 [cit. 2020–02–16]. DoI: 10.1016/B978–0–12–813050–6.00006–1. ISBN 9780128130506. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128130506000061>
49. HORNA, Aleš. *Konference Vitaminy 2001: sborník konference*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80–7194–380–0.
50. Niacin: Fact Sheet for Health Professionals. *National Institutes of Health: office of dietary supplements* [online]. USA: U.S Department of Health and Human Services, 2019 [cit. 2020–02–23]. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Niacin-HealthProfessional/>

51. ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИД: в косметике, его свойства и применение [online]. Cosmobase, 2020 [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: [https://cosmobase.ru/handbook/show/PYRIDOXINE\\_HCL](https://cosmobase.ru/handbook/show/PYRIDOXINE_HCL)
52. MOON, Sang Eun, Suk Beom PARK, Hee Tae AHN a Jai Il YOUN. The Effect of Glycolic Acid on Photoaged Albino Hairless Mouse Skin. *Dermatologic Surgery* [online]. 1999, **25**(3), 179–182 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1046/j.1524-4725.1999.08129.x. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00042728-199903000-00006>
53. BERTIN, C., H. ZUNINO, M. LANCTIN, G.N. STAMATAS, E. CAMEL, C. ROBERT a N. ISSACHAR. Combined retinoL-lactose-glycolic acid effects on photoaged skin: a double-blind placebo-controlled study. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2008, **30**(3), 175–182 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1111/j.1468-2494.2008.00441.x. ISSN 0142-5463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2008.00441.x>
54. WANG, CHUN-MIN, CHUNG-LI HUANG, CHIEN-TING SINDY HU a HENG-LEONG CHAN. The Effect of Glycolic Acid on the Treatment of Acne in Asian Skin. *Dermatologic Surgery* [online]. 1997, **23**(1), 23–29 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1111/j.1524-4725.1997.tb00003.x. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00042728-199701000-00003>
55. ABELS, Christoph, Alexandra KASZUBA, Iwonna MICHALAK, Dieter WERDIER, Ulrich KNIE a Andrzej KASZUBA. A 10% glycolic acid containing oil-in-water emulsion improves mild acne: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2011, **10**(3), 202–209 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1111/j.1473-2165.2011.00572.x. ISSN 14732130. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1473-2165.2011.00572.x>
56. OKUDA, M., D.A. DoNAHUE, L.E. KAUFMAN, et al. Negligible penetration of incidental amounts of alpha-hydroxy acid from rinse-off personal care products in human skin using an in vitro static diffusion cell model. *Toxicology in vitro* [online]. 2011, **25**(8), 2041–2047 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1016/j.tiv.2011.08.005. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233311002189>
57. EKE, G., A. M. KUZMINA, A. V. GOREVA, E. I. SHISHATSKAYA, N. HASIRCI a V. HASIRCI. In vitro and transdermal penetration of PHBV micro/nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2014, **25**(6), 1471–1481 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1007/s10856-014-5169-5. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-014-5169-5>
58. MA, Linlin, Ziheng ZHANG, Jun LI, Xingxing YANG, Bin FEI, Polly H. M. LEUNG a Xiaoming TAO. A New Antimicrobial Agent: Poly (3-hydroxybutyric acid) Oligomer. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2019, **19**(5), 12 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1002/mabi.201800432. ISSN 1616-5187. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mabi.201800432>
59. COOPER, Dustin L., Derek E. MURRELL, David S. ROANE a Sam HARIRFOROOSH. Effects of formulation design on niacin therapeutics: mechanism of action, metabolism, and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **490**(1–2), 55–64 [cit. 2019-11-24]. DoI: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.024. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315004433>

60. TASHTOUSH, Bassam M., Amina N. BENNAMANI a Bashar M. AL-TAANI. Preparation and characterization of microemulsion formulations of nicotinic acid and its prodrugs for transdermal delivery. *Pharmaceutical Development and Technology* [online]. 2013, **18**(4), 834–843 [cit. 2019–11–24]. DoI: 10.3109/10837450.2012.727003. ISSN 1083–7450. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10837450.2012.727003>
61. JACOBSON, Elaine L, Myron Jacobson, Hyuntae Kim, Moonsun Kim a Jaber G. Qasem. *Topical Formulations for the Transdermal Delivery of Niacin and Methods of Treating Hyperlipidemia*. US6677361. Uděleno 13.01.2014
62. ELAWA, Sherif, Robin MIRDELL, Erik TESSELAAR a Simon FARNEBO. The microvascular response in the skin to topical application of methyl nicotinate: Effect of concentration and variation between skin sites. *Microvascular Research* [online]. 2019, **124**, 54–60 [cit. 2019–11–24]. DoI: 10.1016/j.mvr.2019.03.002. ISSN 00262862. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026286218302656>
63. LEE, S.J., M.R. ROH, S.H. LEE, W.S. CHUNG, J.E. LEE, S.H. OH a S.B. CHO. Topical niacin cream–assisted 595–nm pulsed–dye laser treatment for facial flushing: retrospective analysis of 25 Korean patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2012, **26**(1), 54–58 [cit. 2019–11–24]. DoI: 10.1111/j.1468–3083.2011.04006.x. ISSN 09269959. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468–3083.2011.04006.x>
64. ZHU, Zhen, Gyula VARADI a Stephen G. CARTER. Pharmacokinetics of the transdermal delivery of benfotiamine. *Acta Diabetologica* [online]. 2016, **53**(2), 317–322 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1007/s00592–015–0776–2. ISSN 0940–5429. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00592–015–0776–2>
65. BADAWI, Alia, Mai EL HALAWANY a Randa LATIF. A Pilot Clinical Study on Thiamine Hydrochloride as a New Mosquito Repellent: Determination of the Minimum Effective Dose on Human Skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2020, **43**(2), 284–288 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1248/bpb.b19–00538. ISSN 0918–6158. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/43/2/43\\_b19–00538/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/43/2/43_b19–00538/article)
66. KOMATA, Yasuko, Miho INAOKA, Akiko KANEKO a Tadao FUJIE. In vitro Percutaneous Absorption of Thiamine Disulfide from a Mixture of Propylene Glycol and Fatty Acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1992, **81**(8), 744–746 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1002/jps.2600810804. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915489063>
67. PINNELL, Sheldon R., Huanshu YANG, Mostafa OMAR, Nancy Monteiro RIVIERE, Holly V. DEBUYS, Linda C. WALKER, Yaohui WANG a Mark LEVINE. Topical L-Ascorbic Acid: Percutaneous Absorption Studies. *Dermatologic Surgery* [online]. 2001, **27**(2), 137–142 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1046/j.1524–4725.2001.00264.x. ISSN 1076–0512. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524–4725.2001.00264.x>
68. LEE, Ae–Ri Cho a Kakuji TOJO. Characterization of Skin Permeation of Vitamin C: Theoretical Analysis of Penetration Profiles and Differential Scanning Calorimetry Study. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* [online]. 1998, **46**(1), 174–177 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1248/cpb.46.174. ISSN 0009–2363. Dostupné z: <http://joi.jlc.ist.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/46.174?from=CrossRef>

69. HUMBERT, Philippe G., Marek HAFTEK, Pierre CREIDI, et al. Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. Placebo. *Experimental Dermatology* [online]. 2003, **12**(3), 237–244 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1034/j.1600–0625.2003.00008.x. ISSN 0906–6705. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600–0625.2003.00008.x>
70. LIN, Jing–Yi, M. Angelica SELIM, Christopher R. SHEA, James M. GRICHNIK, Mostafa M. OMAR, Nancy A. MONTEIRO–RIVIERE a Sheldon R. PINNELL. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2003, **48**(6), 866–874 [cit. 2020–02–13]. DoI: 10.1067/mjd.2003.425. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203007813>
71. ANDRADE, J. P., T. A. L. WAGEMAKER, D. G. MERCURIO a P. M. B. G. MAIA CAMPOS. Benefits of a dermocosmetic formulation with vitamins B3 and a B6 derivative combined with zinc–PCA for mild inflammatory acne and acne–prone skin. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research* [online]. 2018, **15**(2), 214–223 [cit. 2020–02–23]. DoI: 10.19277/BBR.15.2.188. ISSN 2182–2379. Dostupné z: <http://www.alies.pt/BBR%20Editions/VoL-15-2-2018/art8.pdf>
72. *TRANSDERMAL AND/OR TOPICAL DELIVERY SYSTEMS COMPOSED OF DOXYLAMINE SUCCINATE AND PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE IN COMBINATION, OR ALONE*. USA. 2014031958 A1. Uděleno 02/23/2017. Zapsáno 08/04/2016.
73. VALGIMIGLI, L., S. GABBANINI, E. BERLINI, E. LUCCHI, C. BELTRAMINI a Y. L. BERTARELLI. Lemon (Citrus limon, Burm.f.) essential oil enhances the trans–epidermal release of lipid– (A, E) and water– (B6, C) soluble vitamins from topical emulsions in reconstructed human epidermis. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2012, **34**(4), 347–356 [cit. 2020–02–23]. DoI: 10.1111/j.1468–2494.2012.00725.x. ISSN 01425463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468–2494.2012.00725.x>
74. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Co je co v povrchové a koloidní chemii [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005 [cit. 2020–03–27]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/ebook.help.htm](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/ebook.help.htm).

**POUŽITÉ ZKRATKY**

<b>ADP</b>	Adenozindifosfát
<b>Ach</b>	Acetylcholin
<b>ATP</b>	Adenozintrifosfát
<b>cAMP</b>	Cyklický adenozinmonofosfát
<b>DSC</b>	z angl. Differential scanning calorimetry
<b>ELCD</b>	z angl. Electrolytic Conductivity Detector
<b>FDA</b>	z angl. Food and Drug Administration
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IC</b>	z angl. Ion chromatography
<b>LSCI</b>	z angl. Laser speckle contrast imaging
<b>MF</b>	Mobilní fáze
<b>o/w</b>	Emulze olej ve vodě
<b>OECD</b>	z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development
<b>PDA</b>	Detektor s diodovým polem
<b>PHBV</b>	Poly(3-hydroxybutyrát-3-hydroxyvalerát)
<b>PKA</b>	Proteinkinaza typu A
<b>RSD</b>	Relativní směrodatná odchylka
<b>S-DVB</b>	z angl. Styrene-divinylbenzene copolymer
<b>SEM</b>	z angl. Scanning electron microscope
<b>TDS</b>	z angl. Thiamine Disulfid
<b>UV-VIS</b>	z angl. Ultraviolet–visible spectrophotometry
<b>w/o</b>	Emulze voda v oleje



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Parametry nastavení UV-VIS	35
Tabulka 2. Parametry nastavení IC	35
Tabulka 3. Parametry nastavení HPLC	45
Tabulka 4. Vhodné vlnové délky pro detekci vybraných vodorozpustných vitaminů	46
Tabulka 5. Nastavení gradientu HPLC	46
Tabulka 6. Naměřené parametry pro kyselinu mléčnou pomocí IC	47
Tabulka 7. Naměřené parametry pro kyselinu glykolovou pomocí IC	47
Tabulka 8. Naměřené parametry pro kyselinu jablečnou pomocí IC	47
Tabulka 9. Hmotnosti biologických membrán v průběhu botnacího experimentu	52

## SEZNAM TERMÍNŮ

**Avitaminóza** – chorobný stav vyvolaný naprostým nedostatkem určitého vitamínu.

**Biopsie** – je odběr vzorku tkáně (bioptického vzorku) z živého organismu k morfologickému vyšetření.

**Dermatitida** – společný termín pro všechny zánětlivá onemocnění kůže.

**Desmosoma** – typ buněčného spoje, pro nějž je charakteristická přítomnost tzv. intermediárních filament.

**Ekzém** – chronické, recidivující, svědivé kožní onemocnění, projevující se zánětem, suchostí či zarudnutím na povrchu kůže.

**Eleidin** – bílkovina v buňkách vrstvy stratum lucidum, přechod mezi keratohyalinem a měkkým keratinem rohové vrstvy.

**Glykoproteiny** – jsou bílkoviny s navázanými sacharidy na své struktuře.

**Glykosaminoglykany** – dlouhé nevětvené polysacharidy tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami, v nichž je vždy jedním členem uronová kyselina a druhým glukosamin, většinou částečně esterifikované kyselinou sírovou. Tvoří velkou část mezibuněčné hmoty v pojivové tkáni.

**Hypovitaminóza** – chorobný stav způsobený částečným nedostatkem určitého vitamínu

**Intermediární filament** – komponent cytoskeletu tvořený bílkovinnými vlákny o průměru 10 až 15 nm, poskytuje především mechanickou pevnost.

**Keratinocyty** – buňky pokožky epidermu produkující keratin, hlavní pokožková buňka; představuje až 95 % všech buněk v lidské pokožce.

**Keratohyalin** – bezbarvý průsvitný protein, který se vyskytuje v epidermu v granulární vrstvě.

**Komedony** – typ cysty, která je vytvořena, když vlasový folikul blokován rohovatějícím epitelem smíchaným s kožním tukem při hyperkeratóze.

**Lamelární granule** (tež Odlandová tělíčka) – jsou malé ovoidní nebo tyčinkovité struktury tvořené na povrchu ceramidy a uvnitř převážně mastnými kyselinami, cholesterolem.

**Lipofilita** – tendence nepolárních látek interagovat s nepolárními lipidy, resp. rozpouštět se v lipidech (tucích). Vlastností biologicky aktivních látek, významně se podílí na transportu látky z místa podání na místo účinku a na interakci s makromolekulou v místě účinku.

**Lysozomy** – kulovité organely s enzymy, jsou místem intracelulárního trávení a obměny buněčných komponent.

**Papula** – morfologický prvek kožních vyrážek stoupající nad úroveň kůže. V některých případech může být transformován na vezikuly, pustuly, plaky a kombinován s dalšími změnami na kůži.

**Parakeratóza** – nebo hyperkeratóza, nedokonalé rohovění a ztlustění stratum corneum z důvodu produkce abnormálního množství keratinu.

**Perfuze** – průtok krve (event. jiné tekutiny) tkání, orgánem (např. krve játry, ledvinami, plícemi).

**Psoriáza** – kožní neinfekční onemocnění s poruchou keratinizace povrchových vrstev především kůže, avšak může postihovat též nehty a klouby.

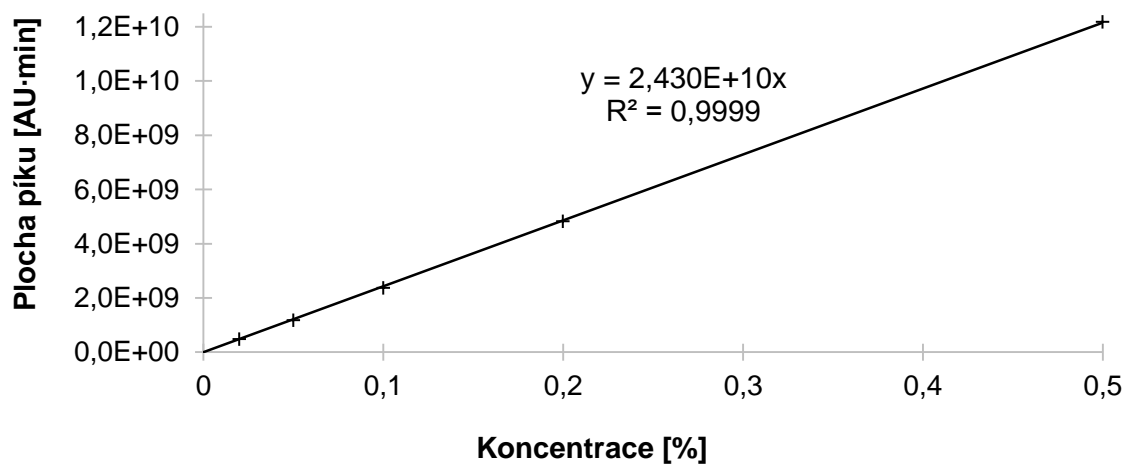
**Pustula** – drobný kožní pupínek, který je vyplněn hnisem.

**Seborea** – ekzematická onemocnění, projevuje mastnými, lupovitými a zánětlivými oblastmi kůže, zejména na obličeji a hlavě.

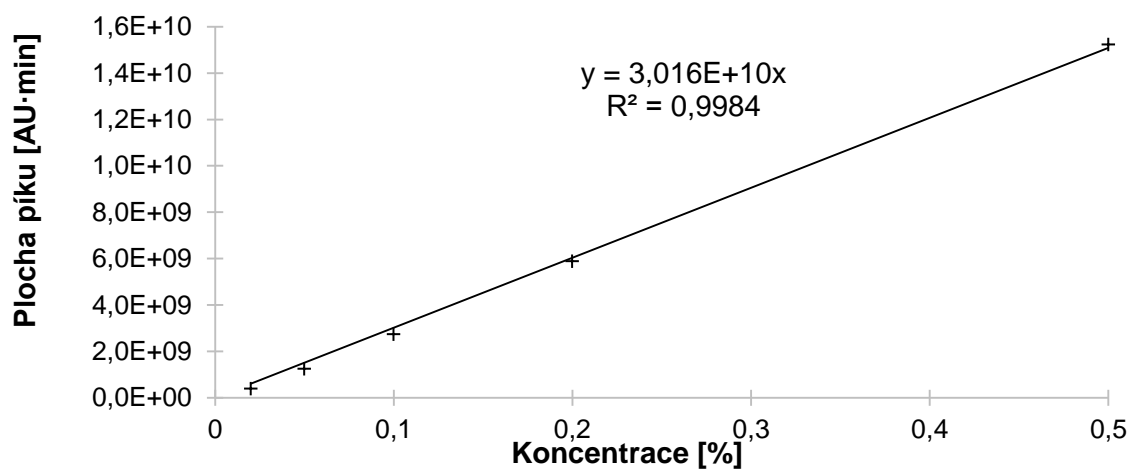
**Vazodilatace** – relaxace hladkých svalů buněk v cévních stěnách, vedoucí k rozšíření cév.

**Zkoumadlo** – chemikálie a jejich roztoky používané ke zkoušení léčiv a pomocných látek.

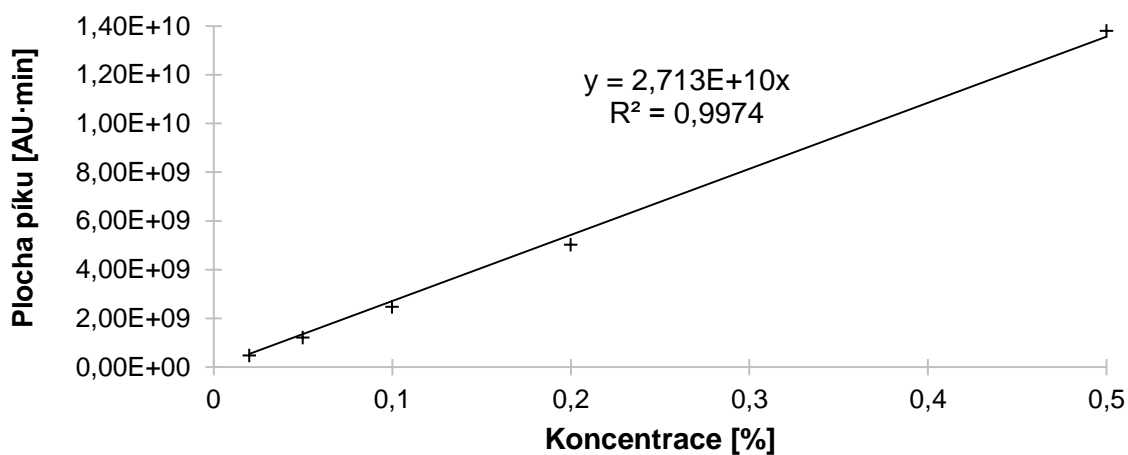
## PŘÍLOHY



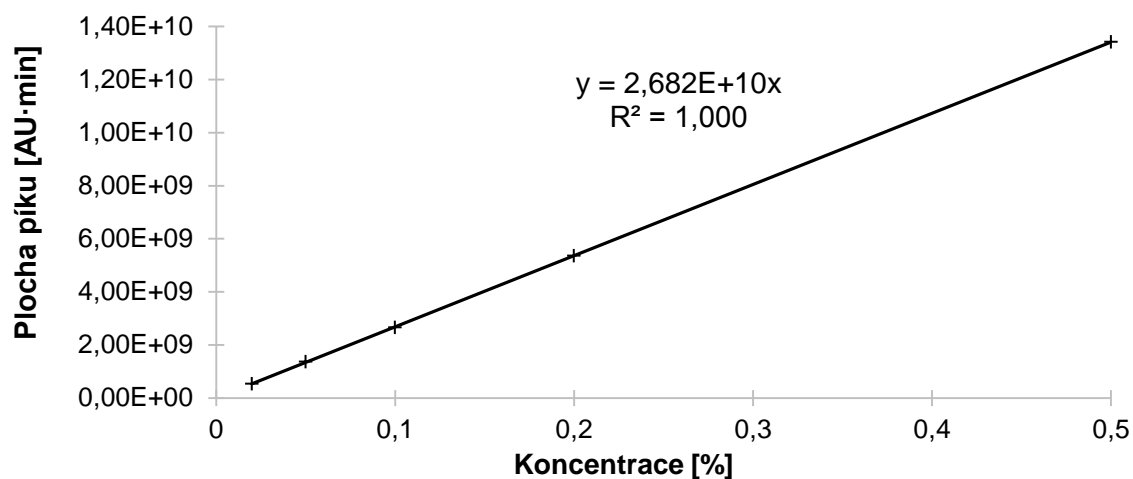
Příloha 1. Lineární závislost plochy píku na koncentraci niacinu



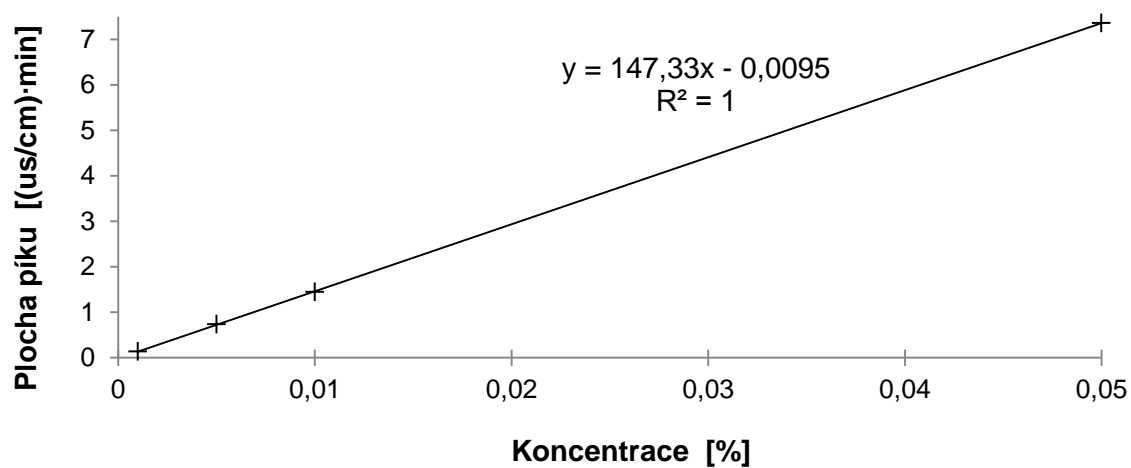
Příloha 2. Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny askorbové



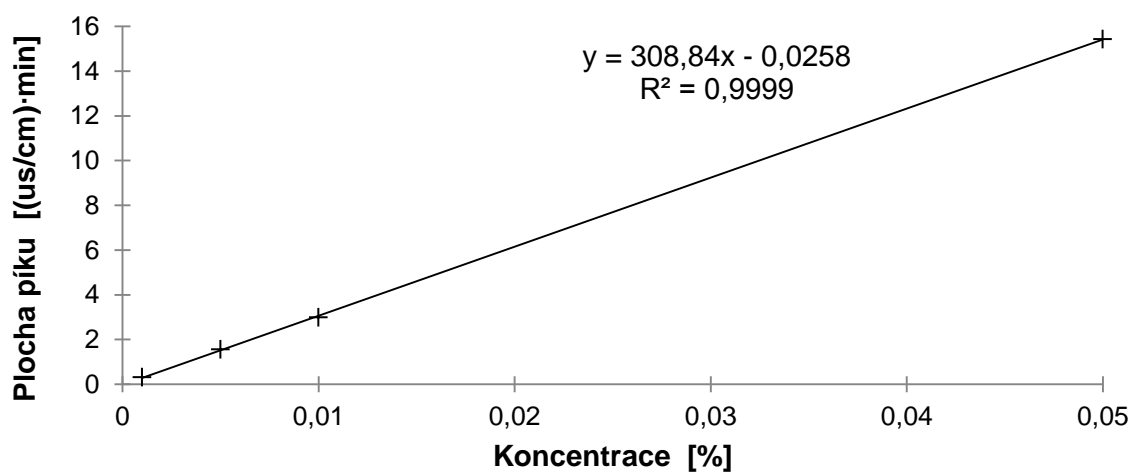
Příloha 3. Lineární závislost plochy píku na koncentraci tiaminu



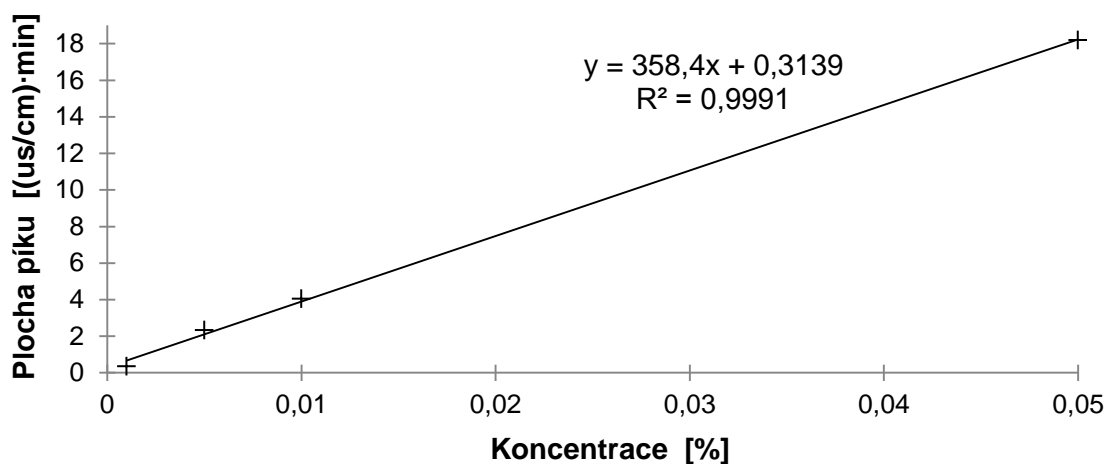
Příloha 4. Lineární závislost plochy píku na koncentraci pyridoxinu



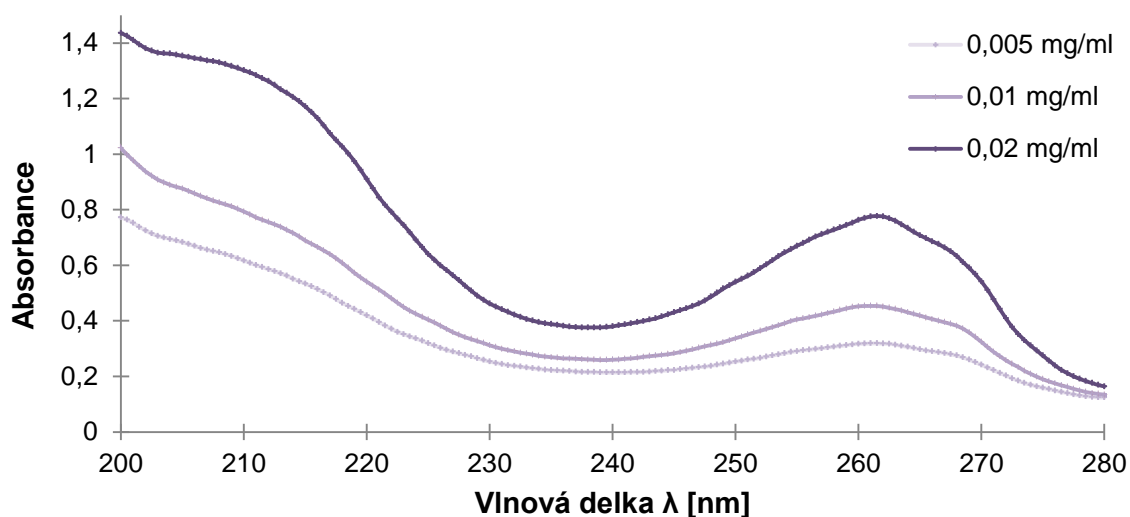
Příloha 5. Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny mléčné pomocí IC



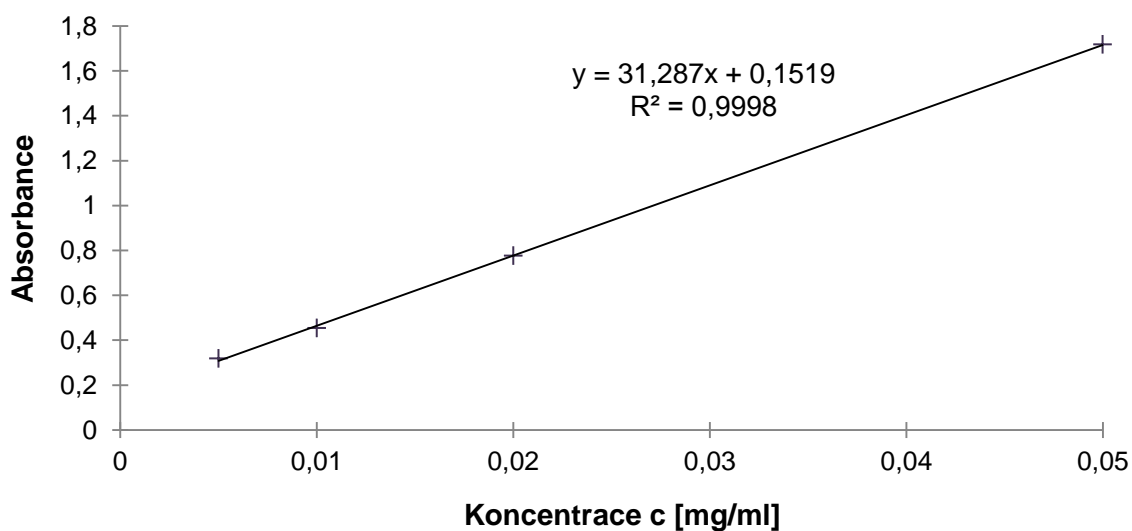
Příloha 6. Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny glykolové pomocí IC



Příloha 7. Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jablečné pomocí IC



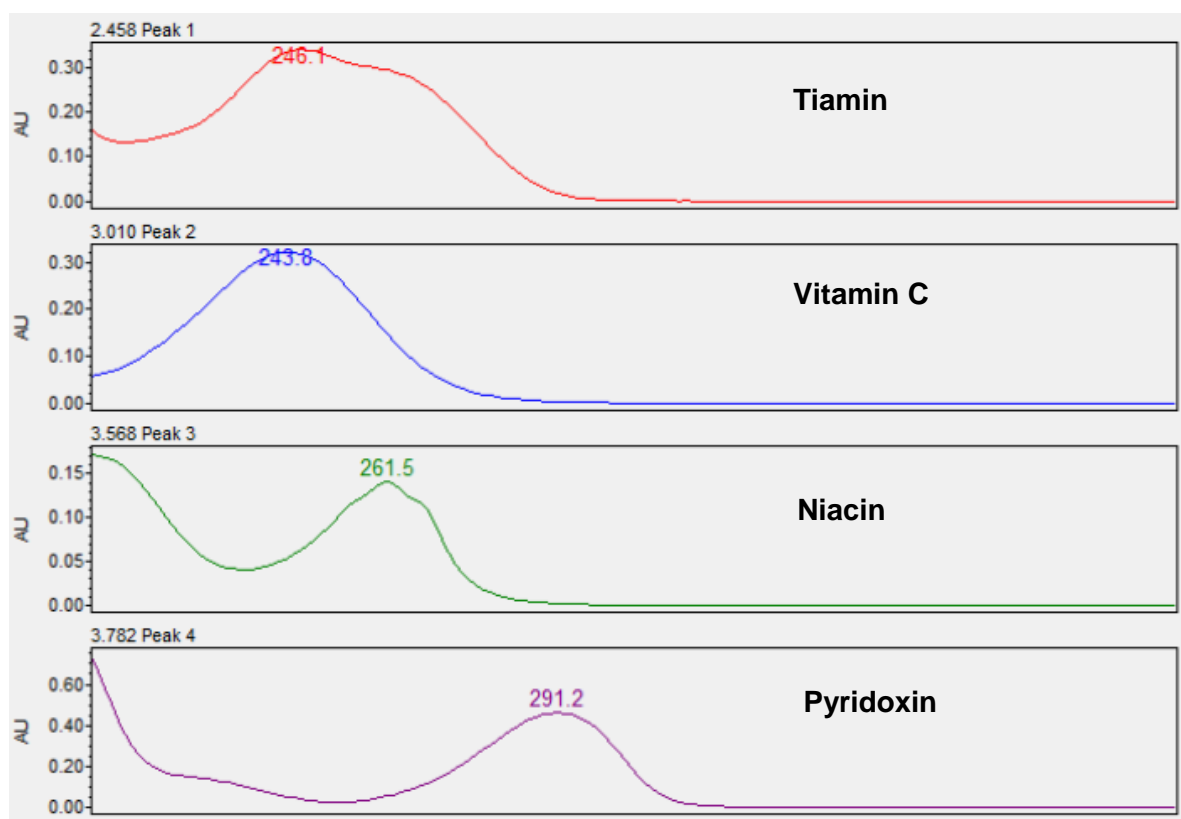
Příloha 8. Absorpční spektrum niacinu UV-VIS



Příloha 9. Lineární závislost absorbance na koncentraci niacinu pro vlnovou délku 261 nm pomocí UV-VIS



Příloha 10. Sestavená Franzova cela



Příloha 11. Maximální absorbanci pro příslušné vodorozpustné vitaminy stanovené pomocí PDA detektoru