

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Automatizované monitorování liberace sulisobenzonu přes modelovou membránu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant:

prof. Manuel Miró

Hradec Králové 2023

David Mareš

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

PODĚKOVÁNÍ

Mé nejsrdečnější poděkování patří především paní doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D., která měla se mnou neskutečnou trpělivost. Moc si vážím jejích rad, postřehů, oprav, a především lidské stránky, která mi dodávala sílu napsat tuto diplomovou práci. Ve stejné míře bych chtěl touto cestou poděkovat i přítelkyni a celé rodině, která mě podporovala nejen při psaní diplomové práce, ale i po celou dobu studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: David Marel

Školitel: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Automatizované monitorování liberace sulisobenzonu přes modelovou membránu

Tato experimentální diplomová práce se zabývá monitorováním uvolňování biologicky aktivní látky přes modelovou membránu pomocí sekvenční injekční analýzy. K detekci byl využíván UV – VIS spektrofotometr. Testovanou biologicky aktivní látkou byl sulisobenzon (jeden z UV filtrů používaných v opalovacích krémech) a byl sledován jeho prostup přes polykarbonátovou membránu s využitím Franzovy cely.

Na začátku práce byla vytvořena kalibrační závislost ve dvou médiích – superčisté vodě a fosfátovém pufru o pH 7,4. Dle těchto závislostí byly vybrány koncentrace, které byly dále používány v rámci liberačních testů. Dané koncentrace sulisobenzonu byly připraveny v různých rozpouštědlech, a to sice v superčisté vodě, v 10% ethanolu, v 10% propylenglykolu a v 5% propylenglykolu. Testovaná rozpouštědla byla vybrána na základě předpokladu zvýšení propustnosti membrány pro liberaci látek s omezenou rozpustností v liberačním médiu. Každý testovaný roztok byl měřen po dobu 2 hodin, přičemž jednotlivé vzorky pro liberační profily byly odebírány v pětiminutových intervalech. Z naměřených výsledků byly vypracovány tabulky a grafy, kde největší pozornost byla věnována především rychlosti uvolňování látky, koncentraci uvolněné látky za určitý čas a jejich rozdílu mezi jednotlivými koncentracemi a médii. Z výsledků vyplývá, že 10% ethanol je nejméně vhodné rozpouštědlo, co se týče opakovatelnosti výsledků, jelikož směrodatná odchylka je zde o dost vyšší než u ostatních rozpouštědel. Dále můžeme vidět, že rovnovážného stavu na obou stranách modelové membrány je dosaženo ve všech případech pouze z části. Nejvyšší propustnost je nalezena u 0,2 mM koncentrace rozpuštěné v superčisté vodě, a naopak nejnižší propustnost je zřejmá u 1 mM koncentrace rozpuštěné v 5% propylenglykolu. Nicméně pro všechny testované koncentrace i rozpouštědla platí přímá úměra mezi dobou liberace a nárůstem koncentrace v dolním kompartmentu Franzovy cely. Čím déle se nachází testovaný roztok na membráně, tím více ho prostoupí přes membránu. Jako nejlepší rozpouštědlo z pohledu lepší propustnosti polykarbonátové membrány pro 1 mM roztok sulisobenzonu se jevil 10% propylenglykol.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: David Marel

Supervisor: assoc. prof. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Automated monitoring of sulisobenzone liberation through model membrane

This diploma thesis deals with the monitoring of biologically active substance liberation through a model membrane using sequential injection analysis. A UV – VIS spectrophotometer was used for the detection. The tested biologically active substance was sulisobenzone (one of the UV filters used in sunscreens) and the permeation through the polycarbonate membrane was monitored using a Franz cell.

At the beginning of the work, a calibration curve was created in two media – water and phosphate buffer of pH 7.4. According to these curves, the concentrations – which were further used in the liberation tests - were selected. The given concentrations of sulisobenzone were prepared in different solvents, namely in water, in 10% ethanol, in 10% propylene glycol and in 5% propylene glycol. The tested solvents were selected based on the assumption of increasing the permeability of the membrane for the liberation of substances with limited solubility in the liberation medium. Each tested solution was measured for 2 hours, with individual samples for release profiles taken at five-minutes intervals. Tables and graphs were drawn up from the measured results, where the greatest attention was paid mainly to the rate of release of substances, the concentration of the released substance during a certain time and their differences between individual concentrations and media. The results show that 10% ethanol is the least suitable solvent in terms of the repeatability of the results because the standard deviation is there much higher than for the other solvents. Furthermore, we can see that the equilibrium state on both sides of the model membrane is achieved only partially in all the cases. The highest permeability is found at 0.2 mM concentration dissolved in water and conversely the lowest permeability is evidenced at 1 mM concentration dissolved in 5% propylene glycol. However, for all the tested concentrations and solvents, there is a direct correlation between the liberation time and the concentration increase in the lower compartment of the Franz cell. The longer the tested solution is on the membrane, the more it permeates through the membrane. 10% propylene glycol appeared to be the best solvent for the highest 1 mM sulisobenzone in terms of better permeability of the polycarbonate membrane.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	9
2. Cíl a popis zadání práce	10
3. Teoretická část.....	11
3.1 Sulisobenzon.....	11
3.2 Neseparační průtokové techniky	15
3.3 Sekvenční injekční analýza	16
3.3.1 Princip SIA	16
3.3.2 Přístroje využívané v SIA	17
3.3.3 Využití SIA	18
3.4 Liberační testy	19
3.5 STRAT – M membrána	19
4. Experimentální část	21
4.1 Použité přístroje a pomůcky	21
4.2 Použité chemikálie.....	21
4.3 Příprava roztoků	21
4.4 Testované roztoky sulisobenzonu.....	23
4.5 Parametry měření v SIA systému	23
4.6 Kalibrační závislost stanovení sulisobenzonu	24
4.7 Postup měření pro monitorování liberace sulisobenzonu.....	24
5. Výsledky a diskuse.....	28
5.1 Kalibrační rozmezí pro stanovení sulisobenzonu	28
5.1.1 Kalibrační rozmezí ve vodném roztoku	28
5.1.2 Kalibrační rozmezí v tlumivém roztoku o pH 7,4.....	29
5.2 Liberace sulisobenzonu	30
5.2.1 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,2 mM	31
5.2.2 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,3 mM	35

5.2.3	Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,4 mM	37
5.2.4	Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,5 mM	39
5.2.5	Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 1 mM	41
5.2.6	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,4 mM v 10% ethanolu.....	43
5.2.7	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,5 mM v 10% ethanolu.....	45
5.2.8	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 10% ethanolu.....	47
5.2.9	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,4 mM v 10% propylenglykolu	49
5.2.10	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,5 mM v 10% propylenglykolu	51
5.2.11	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 10% propylenglykolu	53
5.2.12	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,4 mM v 5% propylenglykolu	55
5.2.13	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,5 mM v 5% propylenglykolu	57
5.2.14	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 5% propylenglykolu	59
5.2.15	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 5% propylenglykolu přes STRAT – M membránu	61
5.2.16	Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 10 % propylenglykolu přes STRAT – M membránu	62
5.3	Diskuze	63
5.3.1	Porovnání testovaných roztoků ve vodném médiu	63
5.3.2	Porovnání testovaných roztoků v 10% ethanolu	64
5.3.3	Porovnání testovaných roztoků v 10% propylenglykolu	65
5.3.4	Porovnání testovaných roztoků v 5% propylenglykolu	66
6.	Závěr.....	67
7.	Seznam použité literatury	68
8.	Přílohy	71
8.1	Program k promytí systému před monitorováním	71
8.2	Program pro monitorování liberace sulisobenzonu	72
8.3	Program pro spektrofotometrické měření kalibrace sulisobenzonu	74
9.	Seznam obrázků	76
10.	Seznam tabulek	78

Seznam použitých zkratek

- BIA – Injekční analýza využívající manipulaci s pevnými částicemi (Bead-injection analysis)
- CFA – Kontinuální průtoková analýza (Continuous flow analysis)
- EtOH – Ethanol
- FIA – Průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
- HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HPTLC – Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
- MPV – Vícecestný selekční ventil (Multiport selection valve)
- MS – Hmotnostní spektrometr
- PC – Polykarbonát
- PG – Propylenglykol
- PTFE – Polytetrafluorethylen
- RSD – Relativní směrodatná odchylka
- SD – Směrodatná odchylka
- SFA – Segmentovaná průtoková analýza (Segmented flow analysis)
- SIA – Sekvenční injekční analýza (Sequential injection analysis)
- UHPLC – Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- UV-VIS – Ultrafialové a viditelné spektrum

1. Úvod

Tato diplomová práce porovnává jednotlivé liberační profily biologicky aktivní látky sulisobenzonu pomocí průtokové metody Sekvenční injekční analýzy (SIA). SIA byla vyvinuta z původní průtokové injekční analýzy (FIA). V moderní době jsou automatizované techniky preferovány z několika důvodů – cena analýzy, rychlost měření, plná automatizace a možnosti miniaturizace a manipulace s roztoky v uzavřeném SIA systému. SIA je založena na principu nástřiku velmi malých objemů v oddělených sekvencích do nosného proudu a může být využita v kombinaci s různými typy detekce [1].

Práce pojednává o tom, jak testovaná rozpouštědla ovlivňují prostupnost sulisobenzonu přes polykarbonátovou nebo STRAT – M membránu do liberačního média. Naměřené liberační profily umožňují lepší pochopení problematiky ovlivnění prostupu UV filtrů přes lidskou pokožku a obecně ovlivnění liberace látek s různou lipofilitou.

Sulisobenzon je biologicky aktivní látka, která se hojně využívá v opalovacích krémech, a to z důvodu ochrany pokožky před UV – A a UV – B zářením [2]. Můžeme jej zařadit mezi benzofenony, což je skupina aromatických ketonů, které jsou významné ve farmaceutickém a zemědělském průmyslu [3]. Používají se jako ochrana před UV zářením, zvýrazňovače chuti a vůně, suroviny pro výrobu insekticidů, zemědělských chemikálií a jako přísada do plastů, nátěrů a lepidel [4].

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem mé diplomové práce je experimentálně změřit a porovnat liberační profily sulisobenzonu, který prochází přes modelovou membránu do liberačního média. K měření testovaných roztoků bude využíván automatizovaný systém SIA – sekvenční injekční analýzy a UV – VIS detektor.

Před samotným měřením bude nutné systém SIA zoptimalizovat. K optimalizaci budou vytvořeny dvě kalibrační závislosti ve dvou odlišných médiích – superčisté vodě a fosfátovém tlumivém roztoku o pH 7,4. V rámci liberačních testů bude proměřeno několik testovaných roztoků, přičemž k přípravě roztoku sulisobenzonu budou využita tato rozpouštědla – superčistá voda, zředěný ethanol a propylenglykol – které budou testovány jako potenciální urychlovače liberace.

Cílem práce je ověřit, zda testovaná rozpouštědla vůbec umožňují/ovlivňují průchod sulisobenzonu přes membránu a pokud ano, tak jaké množství se přes membránu do liberačního média uvolní. Pro získání odpovědí na tyto otázky budou naměřeny kinetické křivky, ze kterých budou následně vytvořeny liberační profily, které budou mezi sebou porovnány.

Obečným cílem práce je testování urychlovačů liberace, které se v liberačních testech používají zejména pro špatně rozpustné biologicky aktivní látky. Z tohoto pohledu jsou vybrány nejběžnější urychlovače (ethanol a propylenglykol) a bude otestován jejich vliv na liberaci sulisobenzonu.

K této diplomové práci bude využíván automatizovaný systém SIA, který se taktéž objevuje v diplomových pracích kolegů: PharmDr. Marie Kodedové (Schneidrové) [5], Mgr. Radovana Ernesta [6] a Mgr. Sabiny Mukařovské [7]. Tato diplomová práce zkoumá jinou biologicky aktivní látku a vliv různých rozpouštědel na liberační profil, který nemá být omezen rozpustností látky, ale má odpovídat pouze liberaci do daného média.

3. Teoretická část

3.1 Sulisobenzon

Sulisobenzon je bílá nebo lehce nažloutlá hydrofilní látka vyskytující se běžně v opalovacích krémech, která způsobuje ochranu pokožky před ultrafialovým světlem [8].

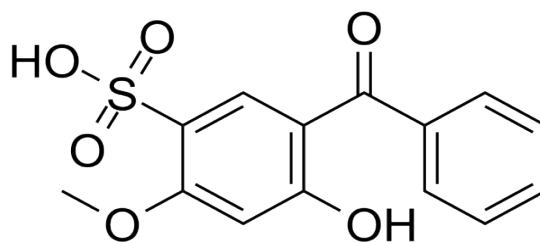
Fyzikálně chemické vlastnosti [9] jsou uvedeny v Tabulce 1:

Tabulka 1 Fyzikálně chemické vlastnosti sulisobenzonu

Molekulární hmotnost	308,3
Teplota tání	145 °C
Rozpustnost ve vodě	0,214 mg/ml
log P	0,39 a 2,8
pKa	-2,4 a -5
log S	-3,2

Sulisobenzon neboli 5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzen-1-sulfonová kyselina (Obr. 1) je malá organická sloučenina spadající do skupiny benzofenonů, což jsou v podstatě aromatické ketony [3]. Volně v přírodě jej lze nalézt v ovoci, například v grepu [10]. Své využití má nejen v ochranných opalovacích přípravcích, ale také jako vonné aroma ve vonných sprejích či příležitostně jako korigens chuti. Své zastoupení má při výrobě insekticidů nebo se využívá jako přísada do nátěrů, plastů a lepidel, kde slouží k prodloužení doby fotodegradace vyrobených produktů [3-4].

Mechanismus účinku spočívá ve vytvoření povrchové vrstvy benzofenonů, která snižuje množství UV záření vlivem absorpce fotonů. Tím se do pokožky dostane méně energie ze záření a pokožka je díky tomu chráněna. Pro tento efekt benzofenonů je nutná hydroxylová skupina v poloze ortho ke karbonylové skupině, která navíc přispívá i ke stabilitě molekuly [11].



Obrázek 1 Vzorec sulisobenzonu [12]

Stanovením sulisobenzonu se věnují dále uvedené práce, které byly vyhledány pomocí databáze sciencedirect.com s využitím klíčového slova: sulisobenzone. Tyto práce byly publikované v letech 2015-2022. Výsledky rešerše jsou shrnuté v Tabulce 2. Mimo rešerši byla do tabulky zakomponována i experimentální práce od firmy Merck, která je dodavatelem STRAT – M

membrány, která byla využita při této diplomové práci. Některé charakteristiky vědeckých prací nejsou uvedeny z důvodu rozmanitosti prací. Např.: u účinků sulisobenzonu na pražmy královské je uvedeno, že na konci testu byly pražmy zváženy, změřeny a rozpitvány na transkripční a metabolickou analýzu, ze které bylo zjištěno, zda má sulisobenzon účinek na mozek, játra a další tkáň, které byly testovány. Popis analýzy, lineární rozsah ani detekce nejsou v práci uvedené. Podobná situace je u článku o ochraně před gama zářením. V tomto článku jsou teoreticky vypočítávány fyzikálně chemické veličiny (koeficient hmotnostního útlumu, vrstva poloviční hodnoty, středně volná dráha atd.) a z nich jsou dle dostupných dat vyhodnocovány teoretické předpoklady o testovaných látkách.

Stanovované vzorky byly používány ve formě roztoků nebo emulzí. Ke stanovení látek byly využívány techniky: HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie), UHPLC (Ultra vysoko účinná kapalinová chromatografie), HPTLC (Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie). K detekci byly využívány: hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem, hmotnostní spektrometr s elektrosprejem a UV spektrofotometry s různými vlnovými délkami (288 nm, 254 nm, 366 nm ve fluorescenčním módu a 270 nm). Lineární rozsahy stanovení se pohybovaly v rozmezí: pro avobenzon ($20-70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), pro oktokrylen ($5-20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), ve formě detekčních limitů (12,5 ng/l pro dioxybenzon, sulisobenzon a padimát-O; 1 ng/l pro avobenzon; 0,5 ng/l pro oxybenzon; 25 ng/l pro oktokrylen a oktinoxát). Doba testů byla různě dlouhá, pohybovala se řádově od několika minut až po desítky dnů.

Tabulka 2 Výsledky rešerše dříve publikovaných prací o stanovení sulisobenzonu a jeho účincích

Účel práce	Stanovovaná látka	Matrice	Detekce/vlnová délka	Lineární rozsah	Doba testu	Interval dávkování	Metoda stanovení	Citace
Testování fotodegradace	sulisobenzon oxybenzon	roztoky	UV detektor/288 nm	neuveđen	12 min (oxybenzon) 8 min (sulisobenzon)	neuveđen	HPLC	[13]
Účinek na živý organismus (pražma královská)	sulisobenzon	roztoky	neuveđen	neuveđen	22 dní	denně pomocí peristaltického čerpadla	extrakce + LC-HRMS; transkripční analýza, microarray technologie a RT-qPCR	[14]
Rozbor moči	PM a PFAS (perzistentní a mobilní chemikálie; per – a polyfluoralkylové látky)	roztoky	MS s trojitým kvadrupólem	neuveđen	30 min pro PM 35 min pro PFAS	neuveđen	UHPLC s MS detekcí	[15]
Stanovení UV filtrů v mořské vodě	avobenzon dioxybenzon oktokrylen oktinoxát oxybenzon padimát-O sulisobenzon	roztoky	MS s elektrosprejem	detekční limit: 12,5 ng/l dioxybenzon, sulisobenzon a padimát-O; 1 ng/l avobenzon; 0,5 ng/l oxybenzon; 25 ng/l oktokrylen, oktinoxát	neuveđen	neuveđen	HPLC s MS detekcí	[16]
Testování separační účinnosti látek pro separaci univerzální HPTLC směsi	guanosin sulisobenzon thymidin paracetamol, ftalimid 9-hydroxyfluoren thioxanten-9-on 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol	roztoky	UV při 254 nm (absorpční mód), při 366 nm (fluorescenční mód s rtuťovou lampou)	interval spolehlivosti: 0,04 jednotek RF; finální koncentrace upravena na 0,01 mg/ml pro thioxanten-9-on; 0,5 mg/ml guanosin; 1 mg/ml sulisobenzon, thymidin, paracetamol, 9-hydroxyfluoren, 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol; 2 mg/ml ftalimid	35 min	neuveđen	HPTLC	[17]
Ochrana před gama zářením	padimát-O homosalát	neuveđen	neuveđen	neuveđen	neuveđen	neuveđen	experimentální výzkum	[18]

	dioxybenzon sulisobenzon oxid titaničitý oxid zinečnatý						fyzikálně- chemických vlastností	
Doplnění validačních parametrů u testované HPTLC univerzální směsi (vychází z článku 17)	guanosin sulisobenzon thymidin paracetamol, ftalimid 9-hydroxyfluoren, thioxanten-9-on 2-(2H-benzotriazol-2-yl)- 4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)fenol	roztoky	UV při 254 nm (absorpční mód), při 366 nm (fluorescenční mód s rtuťovou lampou)	interval spolehlivosti: 0,04 jednotek RF; finální koncentrace upravena na 0,01 mg/ml pro thioxanten-9-on; 0,5 mg/ml guanosin; 1 mg/ml sulisobenzon, thymidin, paracetamol, 9- hydroxyfluoren, 2-(2H- benzotriazol-2-yl)-4- (1,1,3,3- tetramethylbutyl)fenol; 2 mg/ml ftalimid	35 min	neuveđen	HPTLC	[19]
Porovnání průchodu UV filtrů přes lidskou kůži a STRAT – M membránu	Avobenzon oktokrylen	emulze	UV při 270 nm	avobenzon – 20–70 μg/cm ² oktokrylen - 5–20 μg/cm ²	26 hod	Po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24 a 26 hodinách	HPLC s UV detektorem	[20- 21]

3.2 Neseparační průtokové techniky

Jsou to kinetické metody založené na principu vstřikování definovaného objemu vzorku, který je pomocí nosného proudu unášen systémem do detektoru. Metody využívají kontrolovanou disperzi pro lepší promísení vzorku s činidlem, díky kterému dochází ke vzniku detekovatelného produktu. Detektor následně vyhodnotí tento produkt díky signálu ve formě píků. Naměřené hodnoty jsou následně porovnávány a vyhodnocovány nejčastěji v počítači na základě průměrné hodnoty výšky signálu [1,22-23].

Do neseparačních průtokových technik spadají tyto typy: kontinuální průtoková analýza (CFA), segmentovaná průtoková analýza (SFA), průtoková injekční analýza (FIA), při této diplomové práci používaná sekvenční injekční analýza, miniaturizovaná verze sekvenční injekční analýzy s využitím Lab-On-Valve modulu SIA/BIA [24]. Jednotlivé principy technik jsou rozepsány níže [1,24-26]:

- CFA – kontinuální průtoková analýza: Je to nejstarší neseparační průtoková technika, při které dochází ke kontinuálnímu dávkování nosného proudu/činidla a vzorku do průtokového systému. Produkt začíná vznikat při prvním kontaktu vzorku s činidlem. Je zde stejně dlouhá doba měření jako bez průtokové analýzy, protože se čeká na ustálení rovnováhy. U této techniky je i vysoká spotřeba dávkovaných vzorků/roztoků.
- SFA – segmentovaná průtoková analýza: Byla vyvinuta z CFA. Vzorky jsou dávkované s bublinkou vzduchu, která slouží k oddělení vzorků mezi sebou. Kvůli vzduchové bublince jsou vzorky oddělené a promytí systému je jednodušší. Je zde ovšem stále dlouhá doba měření kvůli ustálení rovnováhy dané reakce a stále vysoká spotřeba činidel. V současnosti se využívá pro stanovení iontů v povrchové a pitné vodě.
- FIA – průtoková injekční analýza: Je to první nestacionární průtoková technika (nemusí se čekat na rovnováhu, což přináší obrovské zrychlení analýzy). Do systému jsou čerpány činidla a nosný proud (resp. pufrů a další pomocné látky nutné k reakci). Vzorek je dávkován injekčním ventilem s vyměnitelnou dávkovací smyčkou. Každý kanál vede pouze 1 roztok (činidlo/pufr/nosný proud). Roztoky jsou cestou míseny a při průchodu vzorku dochází k vytvoření detekovatelného produktu. Produkt je měřený v průtokové detekční cele na konci systému. Roztoky jsou kontinuálně čerpány pomocí vícekanalového peristaltického čerpadla. Čerpadlo způsobuje pulzování, které ovlivňuje pravidelnost průtokové rychlosti, což vede ke zhoršeným výsledkům z pohledu opakovatelnosti. FIA je mnohem výkonnější technika než předchozí neseparační průtokové techniky. Dokáže zpracovat 100x více vzorků v daném čase než SFA/CFA.
- SIA – sekvenční injekční analýza: Nestacionární technika, při které je využito pístové čerpadlo poháněné krokovým motorkem a vícecestný selekční ventil umožňující dávkování přesného objemu, řízená vždy ovládacím programem v počítači. Hlavní rozdíly od FIA jsou: Čerpadlo zajišťuje omezené pulzování a zároveň umožňuje oboustranný tok v systému. Selekční ventil snižuje množství objemu roztoků

potřebných pro analýzu. SIA je univerzální a nabízí možnost jednoduché manipulace s aspirovanými roztoky. Oproti starším technikám má lehčí proveditelnost a snadněji se optimalizuje.

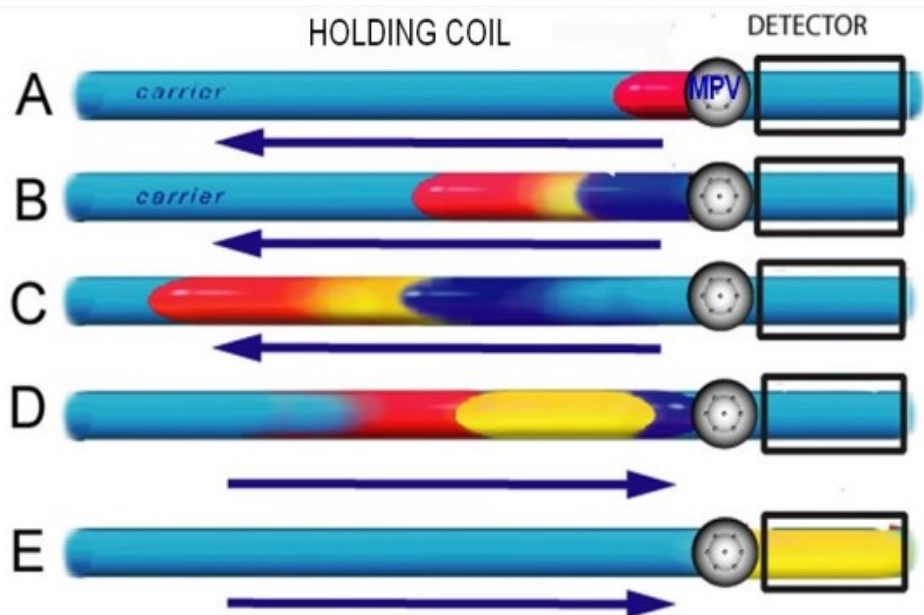
- Lab-On-Valve SIA/BIA: Zde dochází k miniaturizaci SIA systému. Hadičky jsou přeměněny na kanálky a přední část selekčního ventilu je nahrazena plastovým modulem. Mohou být aspirovány malé polymerní částice do SIA systému, což vede k možnému využití při „bead injection“ technice, která využívá definovaný objem mikrokuliček, který je vstříkovan do nosného proudu, kde jsou kuličky zachyceny na daném místě. Vzorky jsou aspirovány do systému a prochází přes vrstvu kuliček. Dochází k interakci vzorků s funkčními skupinami na povrchu kuliček. Zadržené molekuly jsou detekovány spektrofotometricky nebo reagují s barevnými či fluorescenčními činidly. Po detekci dojde k obrácení směru toku a kuličky jsou přemístěny na jiné místo nebo přímo do odpadu.

3.3 Sekvenční injekční analýza

Tento typ analýzy byl vyvinut za účelem zdokonalení systému FIA, který má oproti systému SIA mnoho nedostatků. Povedlo se to v devadesátých letech výzkumné skupině pod vedením prof. J. Růžičky [26]. Tato skupina dokázala vymyslet systém, který je plně automatizovaný a lze v něm pomocí počítačového softwaru ovládat jednotlivé parametry metody – rychlost průtoku a objem vzorků, činidel i nosného proudu [27]. Dalšími výhodami jsou: jednoduchost základních principů, cena vybavení, nízká spotřeba vzorků, činidel a nosného proudu a rychlost analýzy [28].

3.3.1 Princip SIA

SIA systém pracuje v předem naprogramovaných krocích měření, při kterých dochází postupně k pohybům pístu čerpadla, které je synchronizované s přepínáním jednotlivých portů vícecestného selekčního ventilu. Po aspiraci analytu a činidla dochází k vytvoření produktu, který je detekovatelný zvoleným detektorem. Před detekcí produktu dochází k otočení směru toku. Tím dojde k lepšímu promísení analytu a činidla v mísící cívce, a vzniklý produkt je odeslán do detektoru, kde je změřena jeho analytická vlastnost (absorbance/fluorescence/elektrochemické vlastnosti). Všechny tyto kroky probíhají v předem oddělených měřicích cyklech. Přesnost a synchronizace pohybů selekčního ventilu a pístového čerpadla je nezbytná pro reprodukovatelnost výsledků. Vzhledem k tomu je nutné využívat počítač s příslušným softwarem, který bude dohlížet na jednotlivé kroky, bude je moci jakkoliv upravovat a současně bude sbírat a vyhodnocovat data [26]. Tento princip je zobrazen na Obrázku 2.



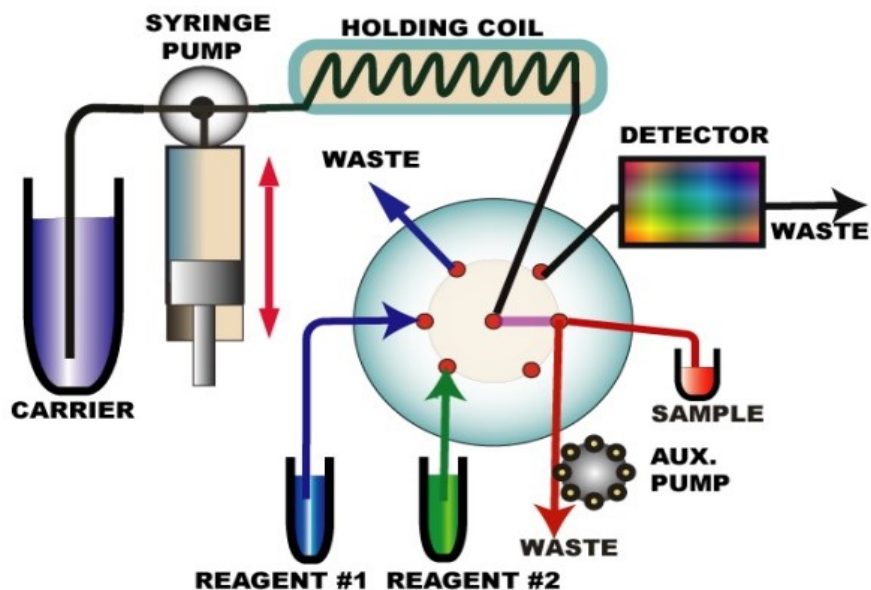
Obrázek 2 Jednotlivé principy systému SIA [1]

(holding coil – mísící cívka, carrier – nosný proud, detector – detektor, MPV – vícecestný selekční ventil, červená barva – testovaný vzorek, žlutá barva – produkt, tmavě modrá barva – činidlo)

- A – aspirace testovaného vzorku do mísící cívky
- B – aspirace činidla
- C – promíchávání vzorku a činidla v mísící cívce
- D – otočení směru toku směsi vedoucí k lepšímu promísení a tím ke vzniku produktu
- E – odeslání vzniklého produktu do detektoru a následná detekce signálu

3.3.2 Přístroje využívané v SIA

Sekvenční injekční analýza se skládá z několika částí (Obr. 3), které jsou mezi sebou propojeny nejčastěji pomocí plastových hadiček. Systém můžeme rozdělit na 2 hlavní části: průtokovou část a měřicí část [29]. Průtoková část obsahuje počítač a v něm spuštěný počítačový software s naprogramovaným ovládacím programem, který řídí jednokanálové obousměrné pístové čerpadlo, které umožňuje přesnou aspiraci roztoků. To je napojeno na mísící cívku a následně na vícecestný selekční ventil. Mísící cívka slouží prvotně k uspořádání vzorků do jednotlivých zón, ale také jako pojistka před vniknutím vzorků do čerpadla. Vícecestný ventil je komponent SIA systému, který umožňuje řazení jednotlivých zón v mísící cívce. Umožňuje též připojení několika dalších komponentů, jelikož obsahuje nejčastěji 6-10 portů. Přes ventil jsou aspirovány a následně odeslány do detektoru jednotlivé zóny. Do měřicí části systému patří detektory, které v SIA systému nejsou omezeny, a výběr detektoru závisí pouze na analytické reakci. Nejčastější detektory jsou spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické s příslušnými průtokovými celami [26]. Jedno z možných schémat uspořádání SIA systému je uvedeno níže.



Obrázek 3 Schéma SIA systému [25]

(carrier – nosný proud, syringe pump – pístové čerpadlo, holding coil – mísící cívka, waste – odpad, sample – vzorek, reagent – činidlo, detector – detektor, aux. pump – pomocné čerpadlo)

3.3.3 Využití SIA

V současnosti SIA nachází místo ve výzkumných laboratořích, kde je kladen důraz na: rychlost analýzy, flexibilitu, jednoduchost, analýzu velkého množství vzorků, plnou automatizaci, sledování změn koncentrace u analytů při déletrvajících testech nebo při studiích reakcí buněk na vnější podněty [26]. Co se týče vědních oborů, tak v dnešní době nachází SIA uplatnění v oceánografii, biochemii, farmakologii, biotechnologii, organické syntéze, buněčných technologiích, a i ve studiích půdy nebo povrchové vody. Konkrétní příklady využití můžeme nalézt ve studiích věnujících se analýze potravin [30], enviromentální studii o atmosférických plynech [31] nebo enviromentální aplikacích pro analýzu vod, sedimentů a půdy [32]. V našem oboru (farmacii) se využívá především ke stanovení obsahu látek v substancích, lékových formách a biologických materiálech. Též se používá ke stanovení obsahové stejnoměrnosti v lékových formách. V neposlední řadě je možné ji aplikovat při monitorování disolučního procesu pevných lékových forem a k zjišťování vazby léčiv na bílkoviny [25].

3.4 Liberační testy

Metoda, která byla vybrána pro tuto experimentální práci je v podstatě modifikovaná lékopisná metoda – Metoda s extrakční celou [33]. K této metodě byla využita tzv. Franzova cela (viz. Obr. 4), která se skládá z těla (dolní kompartment), víka (horní kompartment), držáku a horního víčka. Franzova cela se využívá pro disoluční testy aktivních látek z polotuhých léčivých přípravků typu mastí, krémů a gelů. V tomto případě byla mezi horní a dolní kompartment vložena polykarbonátová nebo STRAT – M membrána, která oddělila testovaný roztok od liberačního média v dolním kompartmentu. V dolním kompartmentu Franzovy cely je kruhová dutina určená pro 15 ml liberačního média. Víko (horní kompartment) má středový kruhový otvor sloužící pro umístění testovaného roztoku. Víko jako takové má totožný průměr jako tělo Franzovy cely a tím je vymezen povrch pro uvolňování aktivní látky do dolního kompartmentu. Víko se připevní k nosiči pomocí kovového držáku a přikryje se plastovým víčkem, aby se zabránilo případnému vypařování testovaného roztoku. Těsnění mezi víkem a nosičem vytváří vložená membrána a tlak držáku. Při dávkování vzorku z dolního kompartmentu je po měření v daném čase objem liberačního média doplněn tak, aby nevznikal podtlak a membrána zůstala v kontaktu s liberačním médiem.



Obrázek 4 Franzova cela s držákem

3.5 STRAT – M membrána

Strat – M membrána (viz. Obr. 5) je syntetická, modelová membrána, která se využívá pro experimenty zabývající se transdermální difúzí. Její hlavní předností je to, že je velmi podobná lidské pokožce a má experimentálně prokázané lepší parametry než dříve používané živočišné membrány. Nejspíše je to tím, že se skládá z více vrstev (stejně jako lidská pokožka) a tím lépe simuluje prostup látky než jednovrstevné živočišné membrány. Strat – M membránu tvoří vrstva polyethersulfonu, která je více odolná vůči difúzi. Pod touto vrstvou se nachází vrstva polyolefinu, která je naopak více otevřená difúzi. Vrstvy nemají pevně dané hranice, a především kvůli tomu se mezi nimi tvoří pórovitá struktura, která umožňuje prostup látek přes membránu. Z tohoto důvodu je Strat – M membrána vhodná pro testování roztoků, krémů, gelů, pěn a emulzí. Její další předností

je stabilita, opakovatelnost, cenová dostupnost a také fakt, že nemusí být před samotným experimentem hydratována. Stačí ji pouze vyndat z obalu od výrobce a hned je možné ji použít [21].

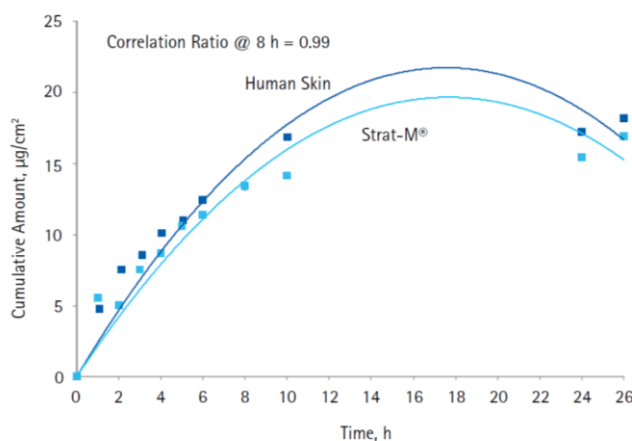
Tato membrána byla výrobcem testována za účelem výzkumu průchodu UV filtrů z opalovacích přípravků přes lidskou pokožku. Byla vyvinuta tak, aby byla konzistentní a stabilní, což bylo při vývoji testováno na 21 různých sloučeninách, které se lišily složením, molekulovou hmotností i lipofilitou. Cílem bylo vyvinout membránu co nejvíce podobnou lidské pokožce [20].

To, že Strat – M membrána je opravdu velmi podobná lidské kůži, dokazuje například experiment porovnávající lidskou, krysí kůži a Strat – M membránu. Všechny membrány jsou si velmi podobné a téměř úplná totožnost výsledků difúze se vyskytuje u látek o molekulární hmotnosti 151–288 a $\log k_{o/w}$ -0,9 až 3,53 [34].

V jiném výzkumu můžeme nalézt důkaz o tom, že Strat – M membrána je cenově dostupná, stabilní a jednoduchá membrána pro posuzování propustnosti jak lipofilních, tak hydrofilních látek. Testované látky v tomto výzkumu byly: sodná sůl diklofenaku, hydrokortizon a kofein. Ilustrační graf z tohoto výzkumu – porovnání STRAT – M membrány s lidskou kůží a acetátu celulózy s lidskou kůží, je uveden na obrázku č. 6 [35].



Obrázek 5 Strat – M membrána



Obrázek 6 Porovnání propustnosti oktokrylenu přes STRAT – M membránu a lidskou kůži [20]

4. Experimentální část

4.1 Použité přístroje a pomůcky

- MicroSIA systém, FIAlab Instruments, USA, s osmicestným ventilem a pěti mililitrovým pístovým čerpadlem
- Peristaltické čerpadlo Minipuls 3 od firmy Gilson, USA
- Peristaltické pružné hadičky (materiál PTFE, vnitřní průměr 0,75 mm)
- UV-VIS spektrofotometr Ocean Optics USB 4000, USA
- Počítačový software FIAlab software for Windows 5.0, FIAlab Instruments, USA
- Nesterilní Strat – M membrána o průměru 47 mm (průměr byl upraven tak, aby odpovídal rozměrům použité Franzovy cely)
- Hydrofilní nesterilní polykarbonátová membrána o průměru 37 mm a velikosti pórů 0,4 μm
- Vodní lázeň
- Termostat od firmy Julabo, Německo
- Franzova cela (vnitřní objem 15 ml) od firmy PermeGear, Německo
- Magnetická míchačka POLY 15 Variomag od firmy H+P Labortechnik AG, Německo

4.2 Použité chemikálie

- Sulisobenzon ($\geq 97\%$) od firmy Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- Ultra čistá voda získaná z přístroje Millipore, Merck, Praha, Česká republika
- Ethanol denaturovaný 96% od firmy Lihovar Kolín, Česká republika
- Propylenglykol 99% od firmy Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- Chlorid sodný čistota p. a. od firmy Penta s. r. o., Praha, Česká republika
- Chlorid draselný čistota p. a. od firma Penta s. r. o., Praha, Česká republika
- Hydrogenfosforečnan sodný čistota p. a. od firmy Penta s. r. o., Praha, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný čistota p. a. od firmy Penta s. r. o., Praha, Česká republika

4.3 Příprava roztoků

Příprava zásobního roztoku sulisobenzonu

Pro přípravu jednotlivých roztoků k optimalizaci podmínek (kalibraci) i k samotnému monitorování byl využíván zásobní roztok sulisobenzonu, který byl po celou dobu práce uchováván v lednici. Roztok byl připraven navážením 0,308 g sulisobenzonu, který byl rozpuštěn v 10 ml ethanolu a uchováván chráněný před světlem v tmavé lahvičce. Výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 100 mM. Roztok po smíchání se superčistou vodou, tlumivým roztokem, zředěným ethanolem nebo propylenglykolem sloužil pro přípravu testovaných roztoků.

Příprava tlumivého roztoku o pH 7,4

Fosfátový tlumivý roztok o koncentraci 0,1 M byl složen z: 80 g chloridu sodného, 2 g chloridu draselného, 14,4 g hydrogenfosforečnanu sodného, 2,4 g dihydrogenfosforečnanu draselného rozpuštěných a doplněných superčistou vodou do 1 l. Vše bylo důkladně promícháno a uchováno

v menších zásobních lahvích. Tímto postupem byl připraven koncentrovaný roztok pufru, který je možné uchovávat za laboratorní teploty. Tlumivý roztok, který byl využíván pro kalibraci i liberaci byl následně ještě 10x zředěn superčistou vodou, čímž byla upravena jeho koncentrace na 0,01 M a pH na 7,4, což bylo ověřeno změřením pH.

Příprava vodných standardů pro vytvoření kalibrační křivky

Před samotným experimentem bylo nutné zoptimalizovat podmínky pro měření a ověřit lineární kalibrační rozmezí. Pro tento účel byla vytvořena kalibrační křivka pomocí šesti roztoků standardu, které byly připraveny ze zásobního roztoku sulisobenzonu a superčisté vody o výsledné koncentraci 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,15 a 0,20 mM do 10 ml odměrných baněk. Ze zásobního roztoku sulisobenzonu bylo odebráno 0,1 ml pomocí automatické pipety do 50 ml odměrné baňky a následně byla odměrná baňka doplněna po rysku superčistou vodou. Takto byl vytvořen standardní roztok o koncentraci 0,20 mM. Z tohoto roztoku bylo následně naředěno dalších 5 standardních roztoků do 10 ml odměrných baněk (viz. Tabulka č. 3).

Tabulka 3 Příprava vodných standardních roztoků sulisobenzonu

výsledná koncentrace (mM)	objem 0,20 mM roztoku (ml)	objem superčisté vody (ml)
0,01	0,5	9,5
0,02	1	9
0,05	2,5	7,5
0,10	5	5
0,15	7,5	2,5
0,20	10	0

Příprava standardů sulisobenzonu s tlumivým roztokem o pH 7,4

Před první liberací byla taktéž vytvořena kalibrační křivka ze standardních roztoků sulisobenzonu s tlumivým roztokem o výsledných koncentracích 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,15 a 0,20 mM, které byly uchovány v 10 ml odměrných baňkách. Roztoky byly připraveny stejným způsobem jako při přípravě vodných roztoků standardu (Tabulka 3), jen místo vody byl použit pufr.

Příprava roztoků pro liberační test

Pro samotnou liberaci byly využívány roztoky, které byly naředěné v den měření. Ze zásobního roztoku sulisobenzonu byl odebrán potřebný objem pomocí automatické pipety, který byl následně naředěn na požadovanou koncentraci superčistou vodou, 10% ethanolem, 5% nebo 10% propylenglykolem v 25 ml odměrné baňce. Potřebný objem zásobního roztoku sulisobenzonu byl vypočítán pomocí vzorce $c_1V_1=c_2V_2$, kdy c_1 je koncentrace zásobního roztoku (100 mM), V_1 je potřebný objem k odebrání, c_2 je požadovaná koncentrace testovaného vzorku a V_2 je objem odměrné baňky.

4.4 Testované roztoky sulisobenzonu

Jednotlivé testované roztoky, které byly použity k samotnému měření, byly připraveny v den měření a dle postupu, který je uveden v kapitole 4.3. Byly testovány roztoky sulisobenzonu v koncentracích 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 1 mM. 1 ml testovaného roztoku byl nadávkován do vrchního kompartmentu Franzovy cely na polykarbonátovou membránu pomocí automatické pipety a následně byl změřen jeho liberační profil za pomoci programu pro monitorování v aplikaci FIALabs for Windows (viz. příloha 8.2). Tento jeden cyklus měření trval 2 hodiny. Podrobnější popis liberace sulisobenzonu bude popsán v kapitole 4.8. Po čas liberace bylo on-line měřeno množství uvolněného sulisobenzonu přes membránu do dolního kompartmentu Franzovy cely v 5 min intervalech. Jako liberační médium byl použit fosfátový pufr o pH 7,4. Jednotlivé roztoky, které souvisely s rozpouštědlem, ve kterém byl testovaný roztok sulisobenzonu rozpuštěn, byly pozorovány při porovnání jednotlivých liberačních profilů (viz. kapitola 5.2).

4.5 Parametry měření v SIA systému

Pro optimalizaci podmínek stanovení i monitorování byl využit systém SIA s UV-VIS spektrofotometrickým detektorem propojený s jednou 15 ml Franzovou celou, která byla umístěna ve vodní lázni s termostatem. Pod vodní lázní byla umístěna magnetická míchačka. Samotný systém SIA se skládal ze: zásobní lahve obsahující superčistou vodu (nosný proud), zásobní lahve obsahující fosfátový tlumivý roztok o pH 7,4, kádinky pro vzniklý odpad, obousměrného pístového 5 ml čerpadla, osmicestného selekčního ventilu, mísící cívky, peristaltického čerpadla a hadiček pro peristaltické čerpadlo v dávkovací smyčce a teflonových hadiček, které propojovaly jednotlivé součásti průtokového systému s porty selekčního ventilu. Promývání systému i samotné monitorování bylo řízeno přednastavenými programy v ovládacím softwaru FIALabs for Windows. (viz. příloha 8.1 a 8.2) Parametry pro optimalizaci systému byly stejné jako parametry pro samotné monitorování liberačních profilů viz. Tabulka 4.

Tabulka 4 Parametry měření v systému SIA

Vlnová délka detekce	280 nm
Rychlost aspirace nosného proudu	60 μ l/s
Objem aspirace nosného proudu	650 μ l
Rychlost aspirace vzorku	30 μ l/s
Objem aspirace vzorku	50 μ l
Rychlost toku do detektoru	30 μ l/s
Objem toku do detektoru	700 μ l
Objem pro doplnění Francovy cely	200 μ l
Objem Franzovy cely	15 ml
Teplota vodní lázně	32 °C
Otáčky míchačky	230 rpm
Délka jednoho cyklu (2 signály)	5 min

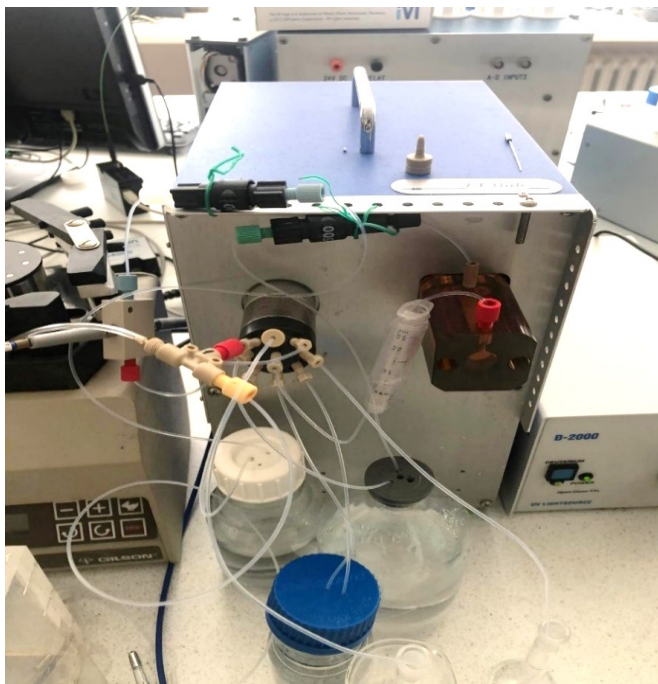
4.6 Kalibrační závislost stanovení sulisobenzonu

Před monitorováním liberace sulisobenzonu z testovaných roztoků byly ověřeny dvě kalibrační závislosti. Stanovení sulisobenzonu bylo optimalizováno s ohledem na citlivost stanovení (nastavení vlnové délky detekce), přesnost odečítání detekovaného signálu (počet bodů na jeden pík), objemu vzorku (kompromis mezi citlivou detekcí a objemem, který příliš neovlivní liberační test) a kalibrační rozsah (dostatečné rozmezí pro liberaci sulisobenzonu z testovaných roztoků). Jedna kalibrace byla naměřena s vodnými standardy, druhá byla naměřena se standardy v tlumivém roztoku o pH 7,4. Koncentrace standardů jsou uvedené v předešlé kapitole 4.4. Každý standard byl proměřen celkem třikrát. Z těchto tří výsledků byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka a byla sestavena lineární kalibrační křivka. Program z aplikace FIALabs for Windows, který byl použit pro tato měření je uveden v příloze 8.3.

Pro kalibraci bylo použito 6 standardních roztoků, které byly zmíněny v kapitole 4.3. Postup měření je uveden v kapitole 4.5. Lineární křivky byly popsány jednotlivými rovnicemi ve tvaru: $y = kx + q$, kde y představuje hodnotu signálu, k je směrnice přímky, x je koncentrace roztoku a q je absolutní člen přímky. K ověření linearity stanovení sulisobenzonu byl využit determinační koeficient, jehož hodnota by měla být vyšší než 0,99. Dále byly z hodnot šumu základní linie vypočítány detekční a kvantifikační limit (LOD a LOQ) jako trojnásobek a desetinásobek hodnot šumu vztažených do rovnice kalibrační závislosti.

4.7 Postup měření pro monitorování liberace sulisobenzonu

Samotné monitorování liberace sulisobenzonu probíhalo v systému SIA (viz. Obr. 7), který byl ovládán předem naprogramovaným ovládacím programem v aplikaci FIALabs for Windows (Příloha 8.2).



Obrázek 7 Systém SIA

Každé liberaci předcházelo řádné promytí systému superčistou vodou. Program, který byl k tomuto účelu používán je uveden v příloze 8.1. Tento proces byl vždy dvakrát zopakován a pokud byly viditelné nečistoty/bubliny v hadičkách SIA systému, tak byl i několikanásobně zopakován. Během tohoto procesu byl spuštěn i termostat ve vodní lázni, aby se potřebná teplota stihla ustálit, než začne samotný proces monitorování.

Po promytí systému byl vybrán jeden ze standardů, (0,1 mM) který byl využitý k sestrojení kalibrační křivky, a byl použit pro ověření hodnot absorbance v daný den měření (korekce odlišné intenzity UV lampy). Tento proces byl vykonán pomocí programu: spektrofotometrické měření, který je uveden v příloze 8.3. Port 7 byl v tomto případě využit pro měření standardu.

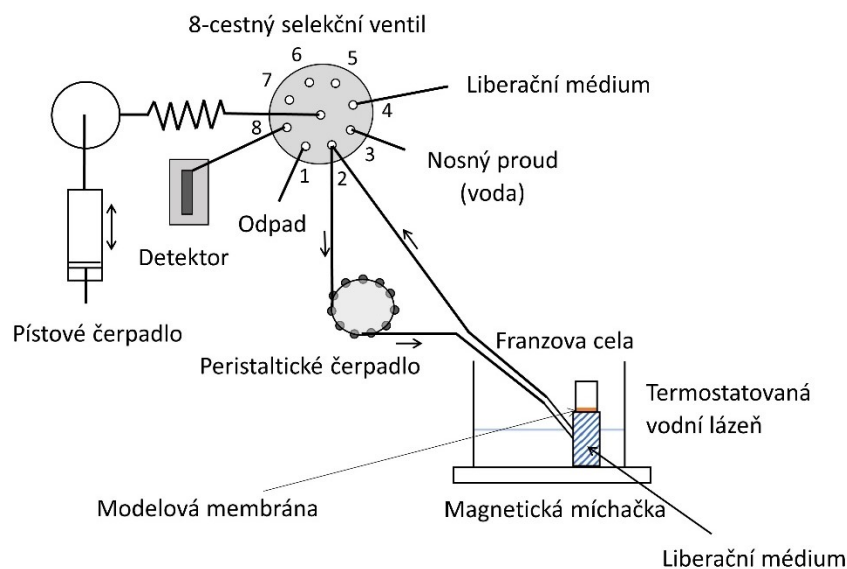
Poté byl systém SIA opět promyt a byla provedena příprava aparatury pro samotné monitorování liberace sulisobenzonu. Franzova cela byla naplněna po okraj (přibližně 15 ml) naředěným tlumivým roztokem a bylo do ní vloženo magnetické míchadlo. Následně na dolní kompartment Franzovy cely byla umístěna polykarbonátová membrána tak, aby se v dolním kompartmentu (pod membránou) nenacházely bubliny vzduchu. Polykarbonátová membrána (viz. Obr. 8) byla zvolena z důvodu nejmenšího vlivu na liberační profily [36].



Obrázek 8 Polykarbonátová membrána

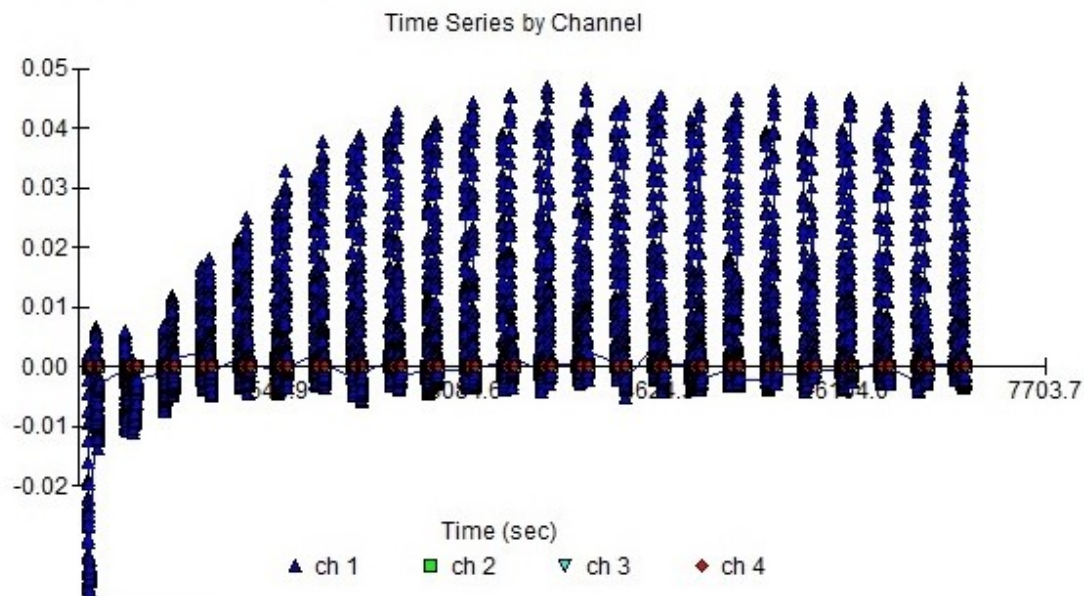
Tento krok byl prováděn opatrně pomocí pinzety, jelikož polykarbonátová membrána byla velmi tenká a snadno se dala natrhnout. Po celou dobu monitorování bylo nutné, aby byla membrána neustále v kontaktu s pufrem v dolním kompartmentu. Na membránu byl posléze umístěn horní kompartment Franzovy cely, který byl uchycený k dolnímu kompartmentu pomocí kovového držáku. Takto připravená cela byla vložena v plastovém držáku do předem vytemperované vodní lázně. Vodní lázeň byla udržována pomocí termostatu při teplotě 32 °C. Pod vodní lázní byla magnetická míchačka, která byla nastavená na 230 otáček za minutu. Bylo nutné připravit i zásobní lahev s tlumivým roztokem i se superčistou vodou, které byly následně připojeny k SIA systému.

Dále byl připraven testovaný roztok, který byl nanesen pomocí automatické pipety na vrchní část membrány ve Franzově cele při začátku monitorování. Co se týče samotného systému SIA, tak ten byl pomocí teflonových hadiček připojen k zásobní lahvi s tlumivým roztokem na portu číslo 4, k zásobní lahvi se superčistou vodou na portu číslo 3, k Franzově cele na portu číslo 2, k detektoru na portu 8 a k zásobní láhvi na odpad na portu 1. Porty 5, 6 a 7 nebyly pro tento experiment využívány. Hadičky z portu 2 byly T-konektorem připojeny a vedeny přes peristaltické čerpadlo, která zajišťovala plynulý pohyb liberačního média uvnitř dávkovací smyčky, a vloženy do otvoru ve Franzově cele. Schéma použitého SIA systému pro diplomovou práci je uvedeno na obrázku č. 9. Rychlost peristaltického čerpadla byla nastavena na 1,3 ml/min.



Obrázek 9 Schéma použitého SIA systému

Takto byl systém připravený a byl spuštěn dvouhodinový program monitorování liberace sulisobenzonu viz. příloha 8.2. Jeden cyklus, během kterého proběhlo dvojí on-line stanovení, probíhal 5 min, resp. celkový čas byl doplněn krátkou pauzou tak, aby další aspirace vzorku proběhla po 5 min. Základní úkony programu byly: aspirace superčisté vody a vzorku k promytí dávkovacího portu a T-konektoru a následné vypuštění objemu do odpadu. Dále byla provedena aspirace superčisté vody (nosného proudu) a vzorku. Tento objem byl pak odeslán do detekční cely a bylo provedeno spektrofotometrické měření. Aspirace nosného proudu a vzorku byla zopakována a zóna opět odeslána do detektoru pro druhé spektrofotometrické měření. Poté byl doplněn objem ve Franzově cele liberačním médiem – fosfátovým pufrům o pH 7,4. Přebytečný objem kapalin byl odeslán do odpadu. Tento cyklus se celkem 24x opakoval. Pro každý testovaný roztok bylo testování opakováno třikrát. Po experimentech, kdy byl testovaný roztok nanášen na polykarbonátovou membránu, byla testována při stejných podmínkách i STRAT – M membrána. Ukázka záznamu měření je zobrazena na obrázku č. 10.



Obrázek 10 Záznam měření

Jelikož byla Franzova cela na konci jednoho cyklu vždy doplňována médiem, bylo nutné naměřené koncentrace přepočítávat z důvodu ředění uvolněného sulisobenzonu právě tímto doplňovaným médiem. Konečná hodnota koncentrace byla proto vypočítána ze vzorce [37]:

$$C_{\text{korigovaná}} = C_{\text{naměřená}} + \text{objem doplněného objemu/objem systému} * (C_1 + C_2 + \dots C_{(n-1)})$$

5. Výsledky a diskuse

Všechny hodnoty získány z počítačového programu FIALab for Windows byly následně zadány do programu Microsoft Excel, ve kterém byly vytvořené výsledné grafy kalibračních profilů.

5.1 Kalibrační rozmezí pro stanovení sulisobenzonu

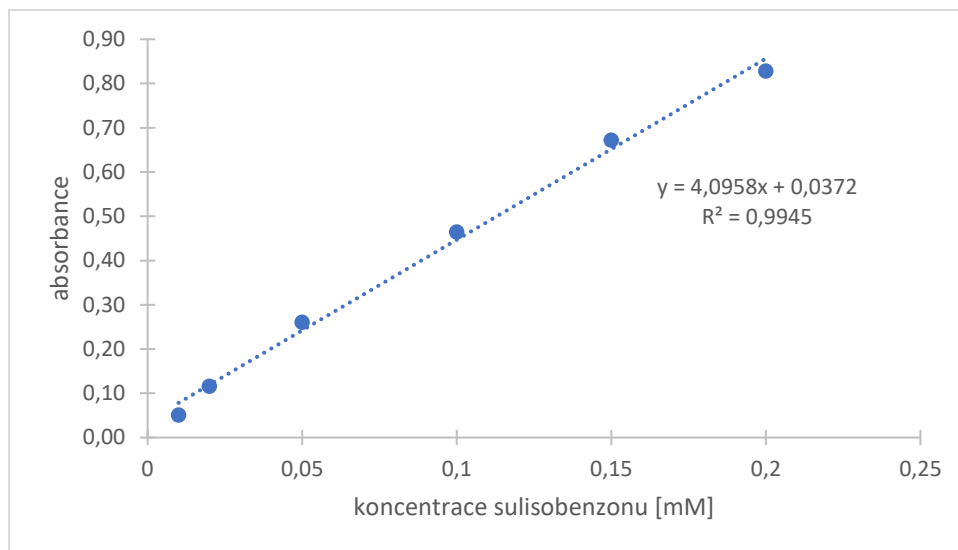
Před samotným monitorováním liberace sulisobenzonu bylo nutné zoptimalizovat podmínky jeho stanovení. Po optimalizaci objemů, průtokových rychlostí a nastavení detektoru byly proměřeny kalibrační křivky. Nejdříve bylo provedeno měření v prostředí s vodným roztokem. Podruhé byly tytéž vzorky o stejné koncentraci změřeny v tlumivém roztoku o pH 7,4. Z daných hodnot byly vytvořeny tabulky a sestrojeny příslušné grafy. Determinační koeficient byl v obou případech vyšší než 0,99, takže byla splněna podmínka pro relevantní praktické měření a další aplikaci této kalibrace v testovaném rozmezí.

5.1.1 Kalibrační rozmezí ve vodném roztoku

Měření bylo prováděno se vzorky o koncentraci 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,15 a 0,20 mM. Pro kontrolu lineární závislosti byl využit i roztok o koncentraci 0,005 mM ovšem ten nevykazoval při měření signál vyšší než desetinásobek signálu šumu, takže byl z tabulky vyřazen, jelikož jeho hodnota není v takovém případě relevantní. Limit detekce byl stanoven na hodnotu 0,015 (0,005 mM). Limit kvantifikace byl stanoven na hodnotu 0,05 (0,01 mM). Data byla naměřena pro každou koncentraci třikrát. Na začátku měření a při změně koncentrace byl celý systém SIA důkladně promyt superčistou vodou, aby se předešlo chybě spojené s předchozím měřením. Odečtené hodnoty signálů byly zapsány do tabulky v programu Microsoft Excel. Z těchto hodnot byly spočítány průměry, směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) viz. Tabulka 5. Z jednotlivých průměrů absorbance a koncentrace vzorků byla sestrojena lineární závislost pro kalibraci sulisobenzonu o determinačním koeficientu 0,9945 a rovnicí přímky $y = 4,0958x + 0,0372$. Obrázek 11 představuje tuto lineární závislost. U zředěnějších standardů, které vykazují nižších hodnoty absorbance, si můžeme všimnout vyšších hodnot RSD. To je způsobeno větším vlivem hodnot šumu než u koncentrovanějších standardů s vyšší absorbancí.

Tabulka 5 Kalibrace ve vodném roztoku

c [mM]	1.měření	2.měření	3.měření	průměr	SD	RSD [%]
0,01	0,060	0,050	0,042	0,051	0,009	17,70
0,02	0,144	0,111	0,095	0,116	0,025	21,82
0,05	0,310	0,250	0,223	0,261	0,044	17,02
0,10	0,507	0,457	0,431	0,465	0,039	8,31
0,15	0,718	0,661	0,639	0,672	0,041	6,12
0,20	0,823	0,834	0,829	0,829	0,005	0,62



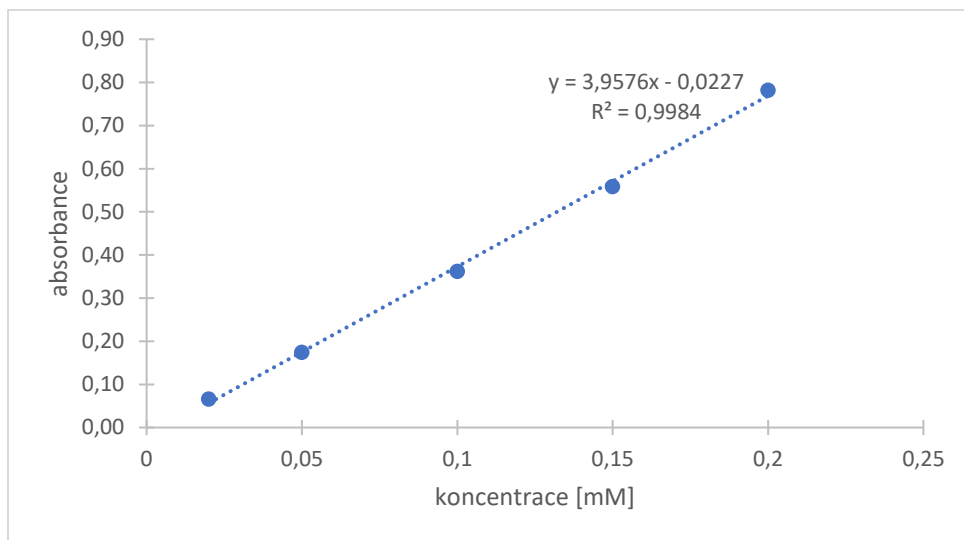
Obrázek 11 Závislost absorbance na koncentraci sulisobenzonu ve vodném prostředí

5.1.2 Kalibrační rozmezí v tlumivém roztoku o pH 7,4

Pro měření v tlumivém roztoku byly využity roztoky o stejné koncentraci, které byly využity pro měření ve vodném prostředí. Pro kontrolu lineární závislosti byly stejně jako v předchozím případě využity i nižší koncentrace standardů (0,005 a 0,01 mM), které ovšem nevykazovaly odpověď vyšší než desetinásobek signálu šumu, takže byly z tabulky vyjmuty. Limit detekce byl stanoven na hodnotu 0,018 (0,01 mM). Limit kvantifikace byl stanoven na 0,06 (0,02 mM). Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6. Následně byl vytvořen z této tabulky graf viz. Obrázek 12. Determinační koeficient byl v tomto případě 0,9984 a rovnice přímky byla $y = 3,9576x - 0,0227$. Stejně jako ve vodném prostředí jsou zde u nižších absorbancí viditelné vyšší hodnoty RSD z důvodu většího vlivu šumu.

Tabulka 6 Kalibrace v tlumivém roztoku o pH 7,4

c [mM]	1.měření	2.měření	3.měření	průměr	SD	RSD [%]
0,02	0,057	0,070	0,071	0,066	0,008	11,81
0,05	0,149	0,179	0,196	0,175	0,024	13,75
0,10	0,316	0,376	0,395	0,363	0,041	11,37
0,15	0,521	0,567	0,589	0,559	0,035	6,19
0,20	0,733	0,835	0,779	0,782	0,051	6,55



Obrázek 12 Závislost absorbance na koncentraci sulisobenzonu v tlumivém roztoku o pH 7,4

5.2 Liberace sulisobenzonu

K měření byly využívány testované roztoky v různých koncentracích, které byly rozpuštěny v různých rozpouštědlech. Koncentrace roztoků byly v hodnotách od 0,2 mM až po 1 mM. Rozpouštědla, která byly využívána k přípravě roztoků byly: superčistá voda, 10% ethanol, 10% propylenglykol a 5% propylenglykol. Podmínky liberace byly uvedeny v Tabulce č. 7. Teplota vodní lázně byla 32 °C, což odpovídá povrchu lidské kůže a běžně se používá v liberačních testech. Hodnota pH 7,4 byla vybrána, aby simulovala prostředí pod kůží pro případ, kdy by došlo k průchodu a liberaci sulisobenzonu přes kožní bariéru. Spektrofotometrickým měřením byly získány vždy 2 píky v rámci jednoho intervalu měření. Z píků byla odečtena nejvyšší hodnota absorbancí v programu FIALabs for Windows, z těchto dvou hodnot byl vytvořen aritmetický průměr a jeho výsledná hodnota byla zapsána do příslušné tabulky v programu Microsoft Excel. Jednotlivý cyklus měření probíhal po dobu 2 hod, což odpovídá 24 intervalům měření. Každý testovaný roztok byl proměřen celkem třikrát. Následně ze získaných tabulek byly vytvořeny liberační profily (závislosti koncentrací na čase u testovaných roztoků). Vzhledem k neustálému ředění systému při doplňování Franzovy cely na konci každého měřicího intervalu, byly tabulky přepočítány pro získání správných hodnot koncentrací. Porovnáním výsledných grafů můžeme zjistit, ve kterém rozpouštědle sulisobenzon nejrychleji prostupuje přes membránu a ve kterém naopak nejpomaleji. Taktéž můžeme zhodnotit, jak velkou roli představuje koncentrace samotného sulisobenzonu pro rychlost prostupnosti přes membránu.

Tabulka 7 Podmínky liberace sulisobenzonu

Testované roztoky	Rozpouštědlo	Membrána
0,2 mM	Voda	PC
0,3 mM	Voda	PC
0,4 mM	Voda	PC
0,5 mM	Voda	PC

1 mM	Voda	PC
0,4 mM	10% ethanol	PC
0,5 mM	10% ethanol	PC
1 mM	10% ethanol	PC
0,4 mM	10% propylenglykol	PC
0,5 mM	10% propylenglykol	PC
1 mM	10% propylenglykol	PC, STRAT-M
0,4 mM	5% propylenglykol	PC
0,5 mM	5% propylenglykol	PC
1 mM	5% propylenglykol	PC, STRAT-M

5.2.1 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,2 mM

Jako první byl měřen testovaný roztok o koncentraci 0,2 mM, který byl rozpuštěn v superčisté vodě. Pro názornou ukázkou jsou u tohoto vzorku přiloženy všechny tabulky s naměřenými hodnotami v Microsoft Excel.

Tabulka 8 Výsledky prvního testu liberace sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM

Doba měření (min)	1. měření	2. měření	průměr	c (mM)	suma	c korigovaná (mM)	SD	RSD
5	0,009	0,005	0,007	0,006	0,000	0,006	0,002	26,04
10	0,007	0,008	0,007	0,006	0,012	0,006	0,001	10,92
15	0,012	0,013	0,013	0,007	0,020	0,008	0,001	4,86
20	0,016	0,017	0,017	0,008	0,028	0,009	0,001	4,47
25	0,019	0,021	0,020	0,009	0,037	0,010	0,001	5,63
30	0,018	0,022	0,020	0,009	0,047	0,010	0,002	9,32
35	0,021	0,024	0,023	0,010	0,057	0,011	0,001	6,40
40	0,022	0,026	0,024	0,010	0,067	0,011	0,002	8,70
45	0,027	0,026	0,026	0,011	0,078	0,012	0,000	1,32
50	0,024	0,026	0,025	0,011	0,089	0,012	0,001	3,50
55	0,026	0,025	0,025	0,011	0,099	0,012	0,000	1,08
60	0,024	0,027	0,025	0,011	0,110	0,012	0,002	6,73
65	0,025	0,028	0,027	0,011	0,121	0,013	0,001	5,30
70	0,024	0,027	0,025	0,011	0,132	0,012	0,001	5,74
75	0,025	0,027	0,026	0,011	0,143	0,013	0,001	5,44
80	0,024	0,026	0,025	0,011	0,153	0,013	0,001	5,00
85	0,026	0,025	0,026	0,011	0,164	0,013	0,000	0,33
90	0,027	0,026	0,026	0,011	0,175	0,013	0,001	2,04
95	0,024	0,023	0,024	0,010	0,185	0,013	0,000	0,74
100	0,022	0,026	0,024	0,010	0,195	0,013	0,002	7,09
105	0,022	0,024	0,023	0,010	0,206	0,013	0,001	4,51
110	0,023	0,023	0,023	0,010	0,216	0,013	0,000	0,76

115	0,023	0,024	0,023	0,010	0,226	0,013	0,000	0,40
120	0,020	0,024	0,022	0,010	0,236	0,013	0,002	8,48

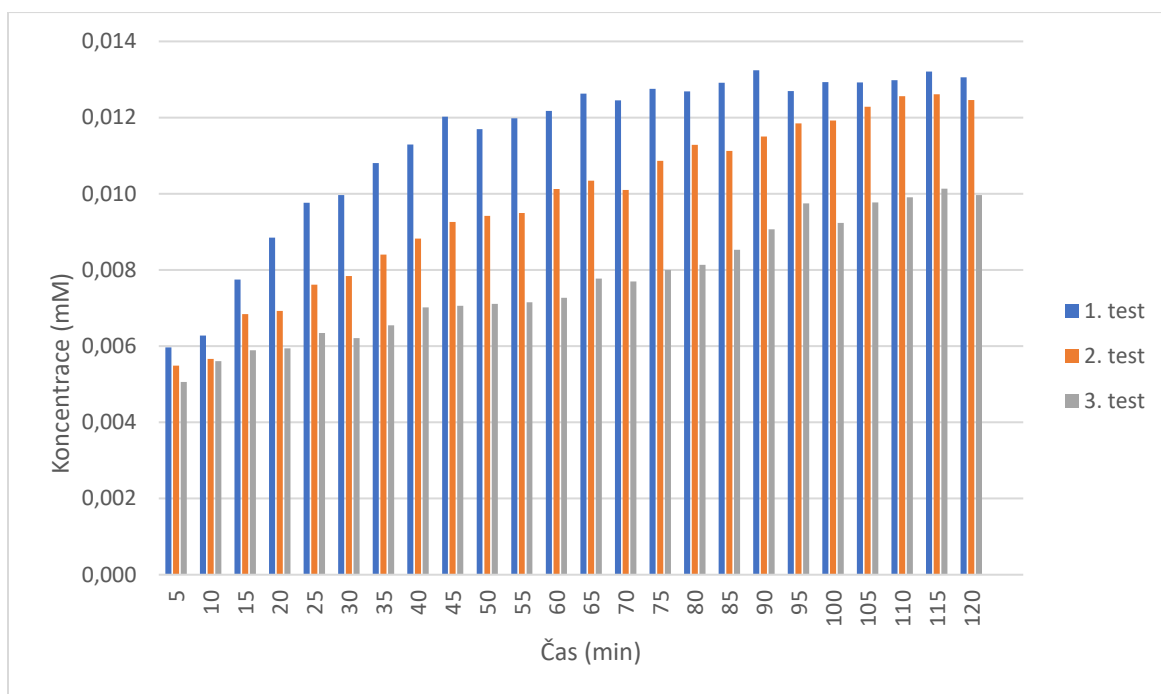
Tabulka 9 Výsledky druhého testu liberace sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM

Doba měření (min)	1. měření	2. měření	průměr	C (mM)	suma	c korigovaná (mM)	SD	RSD
5	0,006	0,004	0,005	0,005	0,000	0,005	0,001	27,48
10	0,004	0,006	0,005	0,006	0,011	0,006	0,001	20,72
15	0,010	0,009	0,009	0,007	0,018	0,007	0,001	6,37
20	0,009	0,010	0,009	0,007	0,024	0,007	0,000	5,24
25	0,012	0,011	0,012	0,007	0,031	0,008	0,000	2,57
30	0,012	0,012	0,012	0,007	0,039	0,008	0,000	1,63
35	0,014	0,014	0,014	0,008	0,047	0,008	0,000	0,29
40	0,015	0,016	0,015	0,008	0,055	0,009	0,001	4,35
45	0,015	0,018	0,016	0,008	0,063	0,009	0,001	8,33
50	0,016	0,017	0,017	0,008	0,071	0,009	0,001	4,47
55	0,015	0,018	0,016	0,008	0,080	0,009	0,001	6,22
60	0,018	0,019	0,018	0,009	0,089	0,010	0,000	1,03
65	0,019	0,019	0,019	0,009	0,098	0,010	0,000	0,53
70	0,017	0,018	0,017	0,009	0,107	0,010	0,001	4,54
75	0,021	0,019	0,020	0,009	0,116	0,011	0,001	4,28
80	0,021	0,021	0,021	0,010	0,126	0,011	0,000	1,60
85	0,020	0,020	0,020	0,009	0,135	0,011	0,000	1,53
90	0,021	0,021	0,021	0,010	0,144	0,011	0,000	1,94
95	0,021	0,023	0,022	0,010	0,154	0,012	0,001	5,08
100	0,020	0,024	0,022	0,010	0,164	0,012	0,002	9,12
105	0,023	0,022	0,023	0,010	0,174	0,012	0,000	0,34
110	0,021	0,025	0,023	0,010	0,184	0,013	0,002	8,41
115	0,020	0,025	0,023	0,010	0,194	0,013	0,003	11,22
120	0,020	0,023	0,022	0,010	0,204	0,012	0,001	6,08

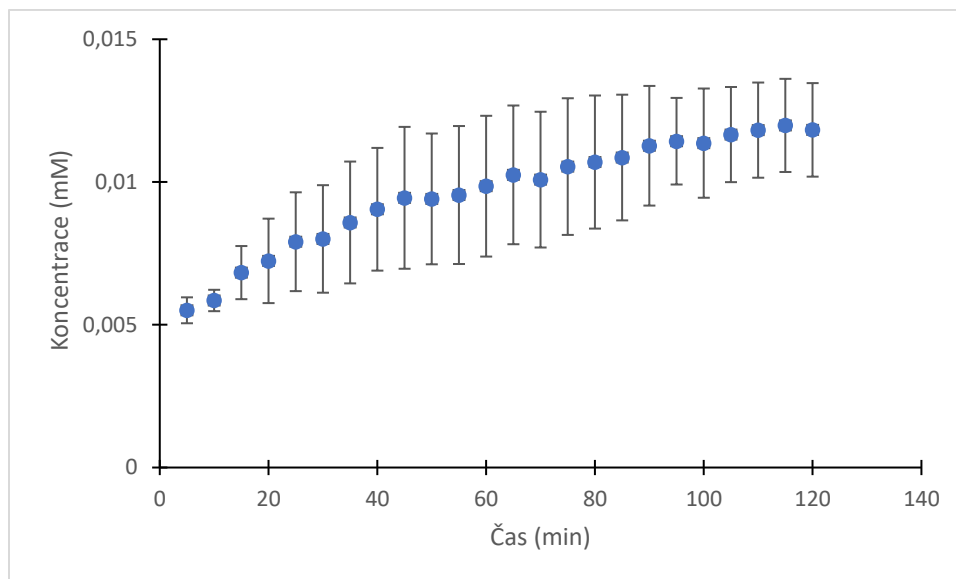
Tabulka 10 Výsledky třetího testu liberace sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM

Doba měření (min)	1. měření	2. měření	průměr	C (mM)	suma	c korigovaná (mM)	SD	RSD
5	0,004	0,003	0,003	0,005	0,000	0,005	0,001	15,13
10	0,005	0,005	0,005	0,005	0,011	0,006	0,000	1,77
15	0,004	0,008	0,006	0,006	0,016	0,006	0,002	34,01
20	0,007	0,004	0,006	0,006	0,022	0,006	0,001	23,22
25	0,007	0,006	0,007	0,006	0,028	0,006	0,001	8,61

30	0,006	0,006	0,006	0,006	0,034	0,006	0,000	0,71
35	0,007	0,007	0,007	0,006	0,040	0,007	0,000	1,17
40	0,009	0,008	0,009	0,006	0,046	0,007	0,000	3,47
45	0,007	0,010	0,008	0,006	0,052	0,007	0,001	14,33
50	0,009	0,008	0,008	0,006	0,059	0,007	0,000	3,44
55	0,009	0,007	0,008	0,006	0,065	0,007	0,001	9,28
60	0,008	0,009	0,008	0,006	0,071	0,007	0,001	6,33
65	0,007	0,013	0,010	0,007	0,078	0,008	0,003	26,73
70	0,008	0,011	0,009	0,007	0,085	0,008	0,002	16,87
75	0,009	0,011	0,010	0,007	0,091	0,008	0,001	9,43
80	0,010	0,010	0,010	0,007	0,098	0,008	0,000	2,09
85	0,010	0,013	0,011	0,007	0,105	0,009	0,001	9,69
90	0,014	0,013	0,013	0,008	0,113	0,009	0,000	3,36
95	0,015	0,016	0,015	0,008	0,121	0,010	0,000	1,70
100	0,012	0,014	0,013	0,008	0,129	0,009	0,001	9,29
105	0,015	0,014	0,015	0,008	0,137	0,010	0,000	2,53
110	0,014	0,016	0,015	0,008	0,144	0,010	0,001	5,96
115	0,016	0,015	0,015	0,008	0,153	0,010	0,000	2,30
120	0,013	0,015	0,014	0,008	0,160	0,010	0,001	5,84



Obrázek 13 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM



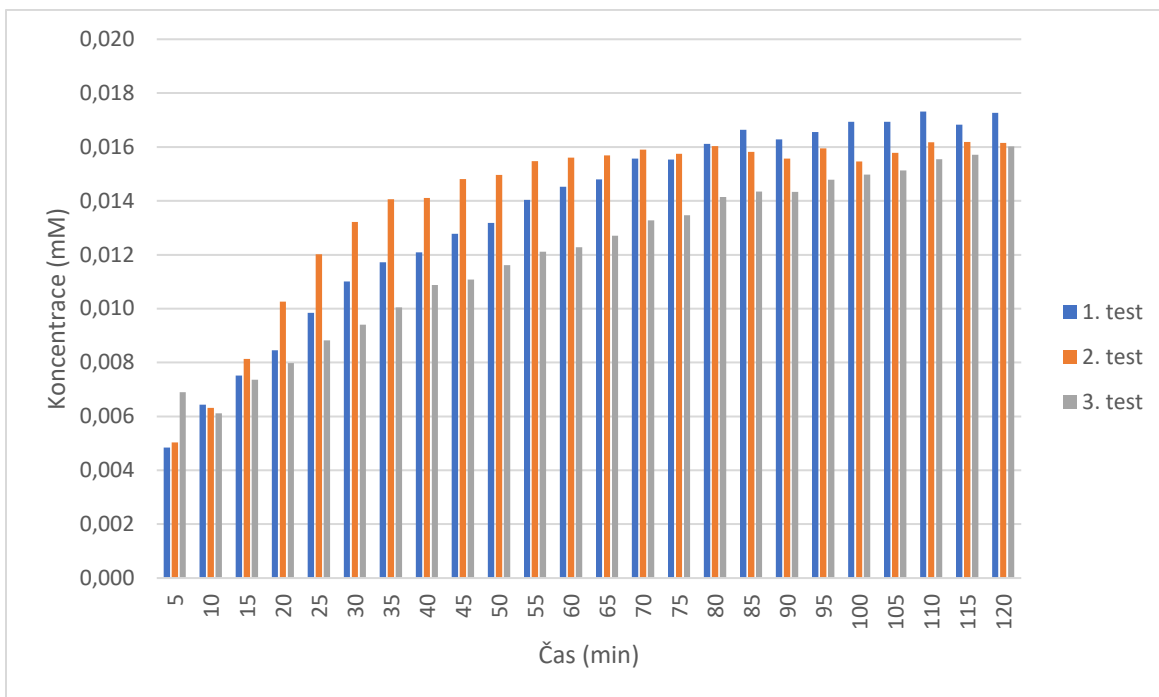
Obrázek 14 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM

Při této koncentraci bylo experimentálně vyzkoušeno, jak dlouho bude vhodné jednotlivé koncentrace testovat. Testovaný roztok byl ponechán v systému 2 a půl hodiny. Po dvou hodinách se naměřené hodnoty lišily už jen minimálně, takže měřicí interval jednotlivých testů byl stanoven na 2 hodiny. Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den liberace této koncentrace byla 0,41. Tento test absorbance byl proveden pro 0,1 mM standard. Co se týče směrodatných odchylek, můžeme pozorovat relativně vyšší odchylky. To je způsobeno nižší koncentrací testovaného roztoku a tím pádem větším vlivem šumu na odchylky. Koncentrace sulisobenzonu v dolním kompartmentu Franzovy cely s přibývajícím časem roste. Z hodnoty koncentrace a jejího potenciálního naředění do objemu média ve Franzově cele můžeme spočítat, že za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,013 mM (104%), v 2. testu 0,012 mM (96%) a v 3. testu 0,010 mM (80%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,012 mM (96%) sulisobenzonu. Do ustálené rovnováhy se dostal první test a to za 60 minut. Z výsledků taktéž plyne, že do 25 minut jsou všechny koncentrace u všech testů pod limitem kvantifikace. Z tohoto důvodu byla postupně navyšována koncentrace testovaných roztoků.

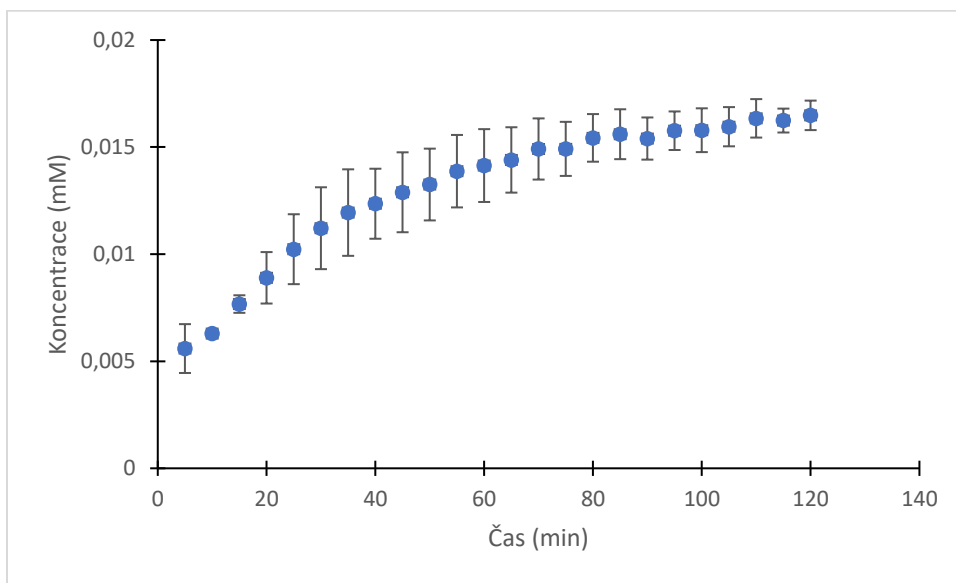
5.2.2 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,3 mM

Tabulka 11 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,3 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,007	0,006	0,001	16,66
10	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000	2,10
15	0,008	0,008	0,007	0,008	0,000	4,36
20	0,008	0,010	0,008	0,009	0,001	11,03
25	0,010	0,012	0,009	0,010	0,002	13,03
30	0,011	0,013	0,009	0,011	0,002	13,92
35	0,012	0,014	0,010	0,012	0,002	13,81
40	0,012	0,014	0,011	0,012	0,002	10,80
45	0,013	0,015	0,011	0,013	0,002	11,82
50	0,013	0,015	0,012	0,013	0,002	10,33
55	0,014	0,015	0,012	0,014	0,002	9,95
60	0,015	0,016	0,012	0,014	0,002	9,82
65	0,015	0,016	0,013	0,014	0,002	8,66
70	0,016	0,016	0,013	0,015	0,001	7,82
75	0,016	0,016	0,013	0,015	0,001	6,91
80	0,016	0,016	0,014	0,015	0,001	5,89
85	0,017	0,016	0,014	0,016	0,001	6,10
90	0,016	0,016	0,014	0,015	0,001	5,22
95	0,017	0,016	0,015	0,016	0,001	4,66
100	0,017	0,015	0,015	0,016	0,001	5,29
105	0,017	0,016	0,015	0,016	0,001	4,69
110	0,017	0,016	0,016	0,016	0,001	4,49
115	0,017	0,016	0,016	0,016	0,001	2,81
120	0,017	0,016	0,016	0,016	0,001	3,41



Obrázek 15 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,3 mM



Obrázek 16 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,3 mM

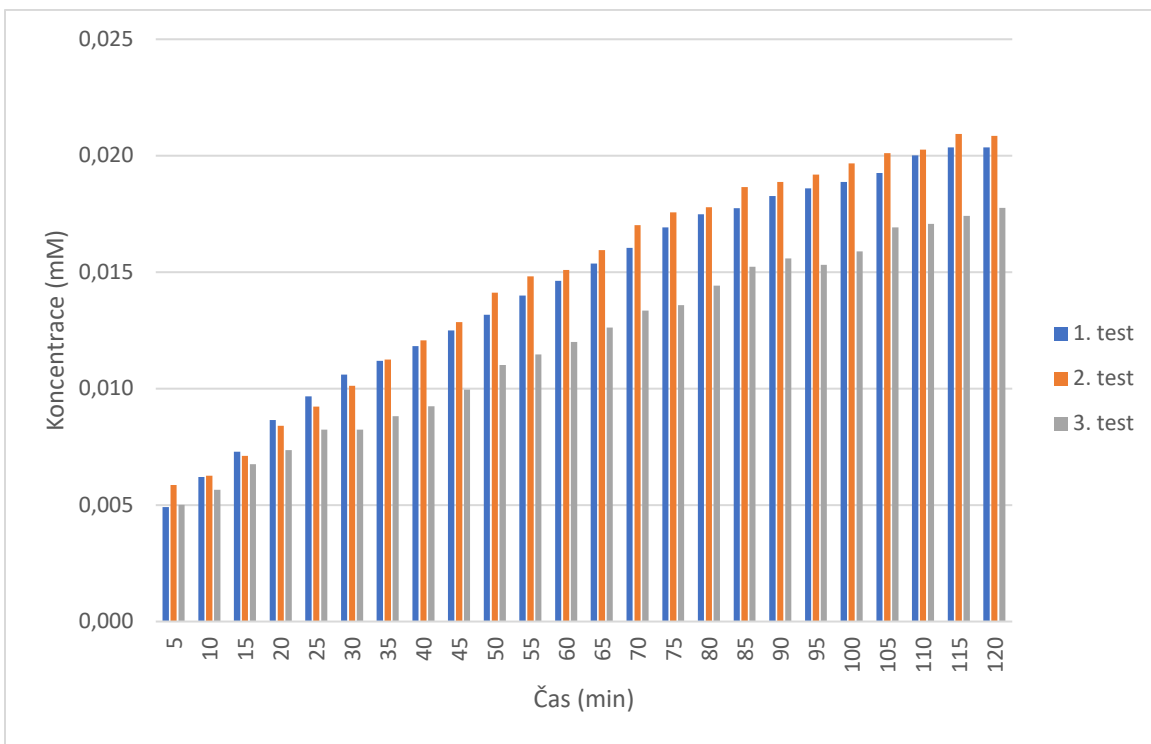
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den liberace této koncentrace byla 0,33. Tento test absorbance byl proveden pro 0,1 mM standard. Při této koncentraci testovaného roztoku si můžeme všimnout mnohem menších směrodatných odchylek na rozdíl od 0,2 mM roztoku. Šum už zde nezpůsobuje vysoké výkyvy hodnot. Koncentrace sulisobenzonu v dolním kompartmentu Franzovy cely s přibývajícím časem opět roste. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,017 mM (91%), v 2. testu 0,016 mM (85%) a v 3. testu 0,016 mM (85%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,016 mM (85%) sulisobenzonu. Rovnováhy bylo

dosaženo ve 2. testu cca po 60 min. Počáteční hodnoty (do 20. min) jsou opět pod LOQ, a proto byla dále zvýšena koncentrace testovaného roztoku.

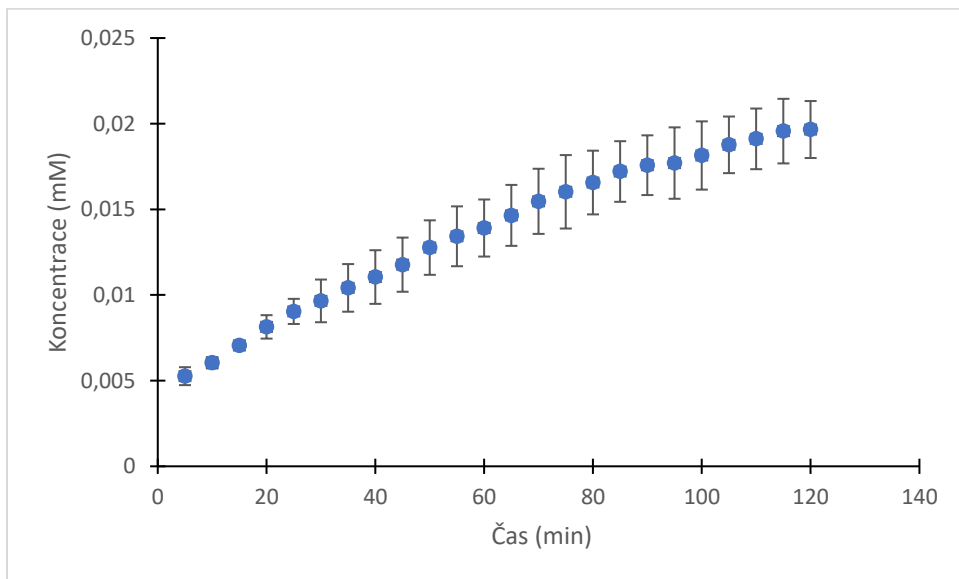
5.2.3 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,4 mM

Tabulka 12 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,4 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,006	0,005	0,005	0,001	9,94
10	0,006	0,006	0,006	0,006	0,000	5,49
15	0,007	0,007	0,007	0,007	0,000	3,87
20	0,009	0,008	0,007	0,008	0,001	8,41
25	0,010	0,009	0,008	0,009	0,001	8,11
30	0,011	0,010	0,008	0,010	0,001	12,90
35	0,011	0,011	0,009	0,010	0,001	13,35
40	0,012	0,012	0,009	0,011	0,002	14,17
45	0,013	0,013	0,010	0,012	0,002	13,44
50	0,013	0,014	0,011	0,013	0,002	12,46
55	0,014	0,015	0,011	0,013	0,002	13,01
60	0,015	0,015	0,012	0,014	0,002	11,97
65	0,015	0,016	0,013	0,015	0,002	12,14
70	0,016	0,017	0,013	0,015	0,002	12,29
75	0,017	0,018	0,014	0,016	0,002	13,37
80	0,017	0,018	0,014	0,017	0,002	11,23
85	0,018	0,019	0,015	0,017	0,002	10,28
90	0,018	0,019	0,016	0,018	0,002	9,92
95	0,019	0,019	0,015	0,018	0,002	11,78
100	0,019	0,020	0,016	0,018	0,002	10,98
105	0,019	0,020	0,017	0,019	0,002	8,81
110	0,020	0,020	0,017	0,019	0,002	9,26
115	0,020	0,021	0,017	0,020	0,002	9,63
120	0,020	0,021	0,018	0,020	0,002	8,46



Obrázek 17 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,4 mM



Obrázek 18 Směrodatné odchytky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,4 mM

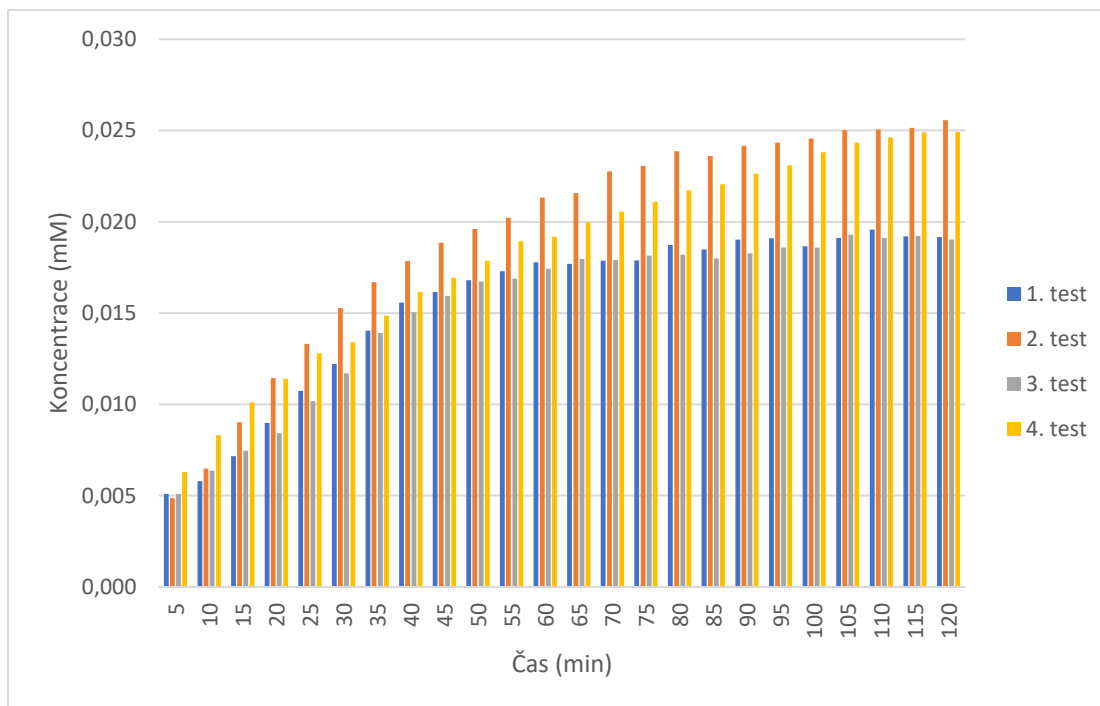
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den liberace této koncentrace byla 0,34 (0,1 mM standard). Pro koncentraci 0,4 mM můžeme pozorovat menší směrodatné odchytky. Z liberačního profilu je patrné, že koncentrace neustále roste po celou dobu liberace a nestagnuje ani po 2 hodinách měření, takže by bylo nejspíše možné dosažení vyšší propuštěné koncentrace přes membránu, pokud by doba testování byla delší. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,020 mM (80%), v 2. testu 0,021 mM (84%) a v 3. testu 0,018 mM (72%) sulisobenzonu.

V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,020 mM (80%) sulisobenzonu. Také můžeme konstatovat, že od koncentrace 0,2 mM se neustále snižuje procentuální poměr průchodu sulisobenzonu přes membránu, která tvoří určitou bariéru pro prostup sulisobenzonu. Při porovnání výsledných koncentrací po 2 hod se hodnoty zvyšují.

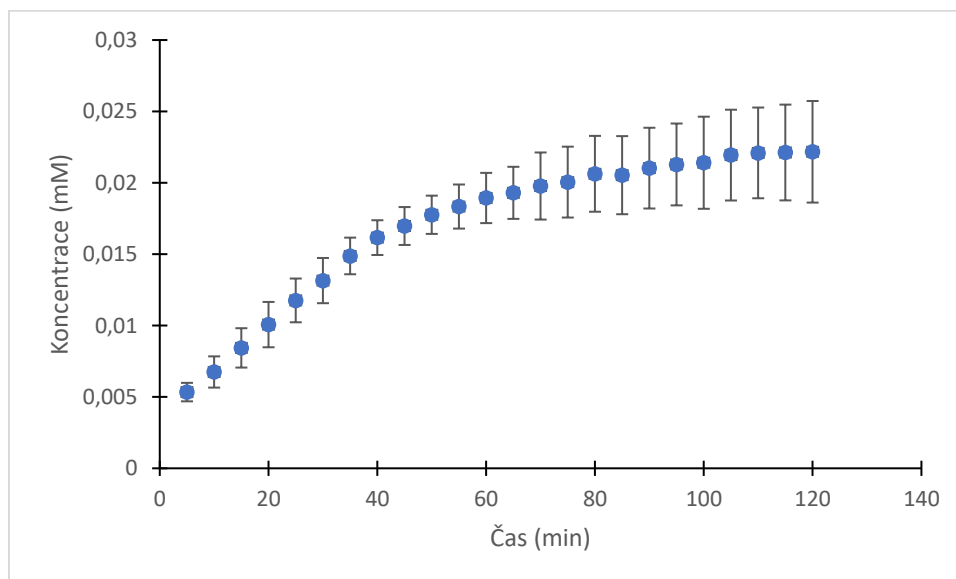
5.2.4 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,5 mM

Tabulka 13 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,5 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)				průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3	test 4			
5	0,005	0,005	0,005	0,006	0,005	0,001	12,13
10	0,006	0,006	0,006	0,008	0,007	0,001	16,21
15	0,007	0,009	0,007	0,010	0,008	0,001	16,35
20	0,009	0,011	0,008	0,011	0,010	0,002	15,77
25	0,011	0,013	0,010	0,013	0,012	0,002	13,03
30	0,012	0,015	0,012	0,013	0,013	0,002	12,04
35	0,014	0,017	0,014	0,015	0,015	0,001	8,62
40	0,016	0,018	0,015	0,016	0,016	0,001	7,53
45	0,016	0,019	0,016	0,017	0,017	0,001	7,82
50	0,017	0,020	0,017	0,018	0,018	0,001	7,55
55	0,017	0,020	0,017	0,019	0,018	0,002	8,42
60	0,018	0,021	0,017	0,019	0,019	0,002	9,29
65	0,018	0,022	0,018	0,020	0,019	0,002	9,45
70	0,018	0,023	0,018	0,021	0,020	0,002	11,88
75	0,018	0,023	0,018	0,021	0,020	0,002	12,38
80	0,019	0,024	0,018	0,022	0,021	0,003	12,87
85	0,018	0,024	0,018	0,022	0,021	0,003	13,32
90	0,019	0,024	0,018	0,023	0,021	0,003	13,45
95	0,019	0,024	0,019	0,023	0,021	0,003	13,48
100	0,019	0,025	0,019	0,024	0,021	0,003	15,07
105	0,019	0,025	0,019	0,024	0,022	0,003	14,49
110	0,020	0,025	0,019	0,025	0,022	0,003	14,38
115	0,019	0,025	0,019	0,025	0,022	0,003	15,17
120	0,019	0,026	0,019	0,025	0,022	0,004	16,04



Obrázek 19 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,5 mM



Obrázek 20 Směrodatné odchytky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,5 mM

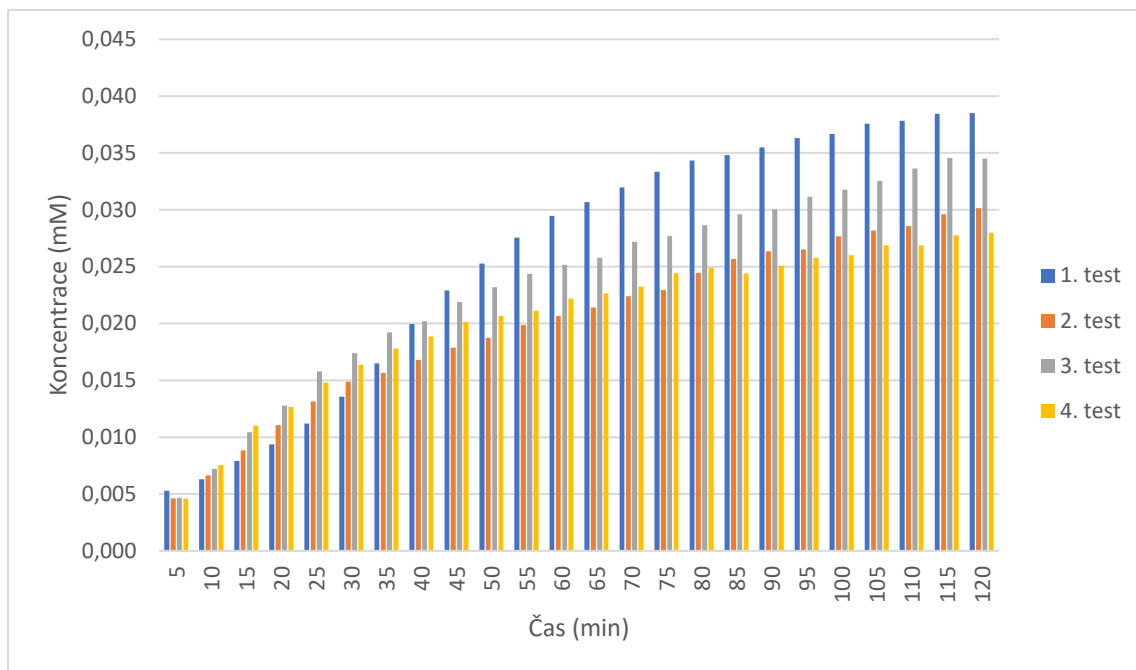
U této koncentrace byly proměřeny výjimečně čtyři testované vzorky, jelikož jeden vzorek se původně výrazně odlišoval od zbylých dvou. Nicméně i tak jsou 2 testy odlišné od 2 zbylých. Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,34 (0,1 mM standard). U této koncentrace je zajímavé, že směrodatné odchytky se zvětšují s přibývajícím časem měření. Zvláštní je i skutečnost, že u 1. a 3. měřeného vzorku se po 70. min koncentrace téměř nemění, na rozdíl od 2. a 4. testu, kde koncentrace neustále rostou i po 2 hod monitorování. Za 2 hodiny testování prošlo přes membránu v 1. testu 0,019 mM (61%), v 2. testu

0,026 mM (83%), v 3. testu 0,019 mM (61%) a v 4. testu 0,025 mM (80%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,022 mM (70%) sulisobenzonu. U této koncentrace dochází opět ke zvýšení maximální dosažené koncentrace (ale procentuální hodnota se snížila) v porovnání s předchozími nižšími koncentracemi.

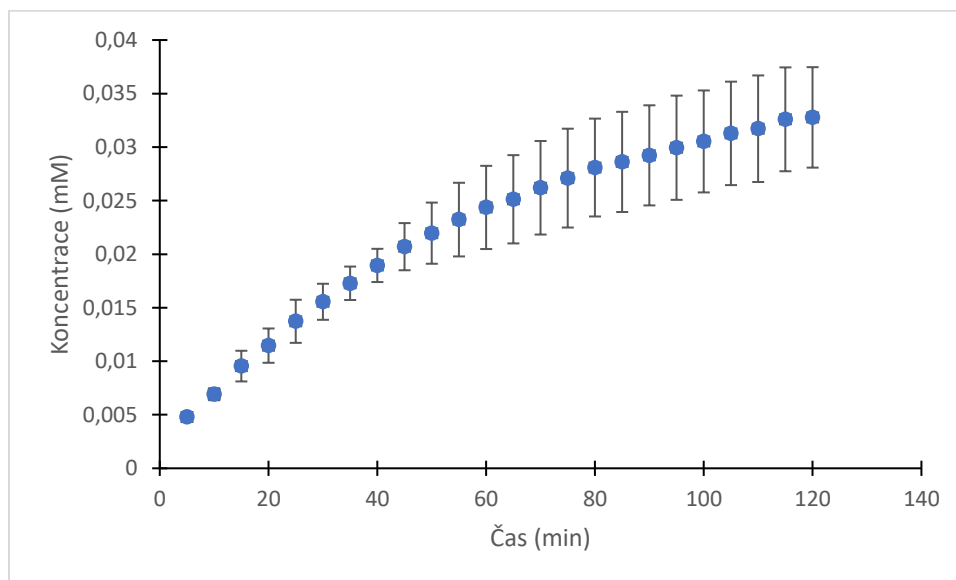
5.2.5 Liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 1 mM

Tabulka 14 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 1 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)				průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3	test 4			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	6,95
10	0,006	0,007	0,007	0,008	0,007	0,001	8,05
15	0,008	0,009	0,010	0,011	0,010	0,001	15,00
20	0,009	0,011	0,013	0,013	0,011	0,002	13,98
25	0,011	0,013	0,016	0,015	0,014	0,002	14,66
30	0,014	0,015	0,017	0,016	0,016	0,002	10,83
35	0,016	0,016	0,019	0,018	0,017	0,002	9,04
40	0,020	0,017	0,020	0,019	0,019	0,002	8,19
45	0,023	0,018	0,022	0,020	0,021	0,002	10,64
50	0,025	0,019	0,023	0,021	0,022	0,003	13,01
55	0,028	0,020	0,024	0,021	0,023	0,003	14,81
60	0,029	0,021	0,025	0,022	0,024	0,004	15,94
65	0,031	0,021	0,026	0,023	0,025	0,004	16,40
70	0,032	0,022	0,027	0,023	0,026	0,004	16,67
75	0,033	0,023	0,028	0,024	0,027	0,005	17,03
80	0,034	0,024	0,029	0,025	0,028	0,005	16,27
85	0,035	0,026	0,030	0,024	0,029	0,005	16,35
90	0,035	0,026	0,030	0,025	0,029	0,005	15,99
95	0,036	0,027	0,031	0,026	0,030	0,005	16,25
100	0,037	0,028	0,032	0,026	0,031	0,005	15,60
105	0,038	0,028	0,033	0,027	0,031	0,005	15,45
110	0,038	0,029	0,034	0,027	0,032	0,005	15,69
115	0,038	0,030	0,035	0,028	0,033	0,005	14,88
120	0,039	0,030	0,035	0,028	0,033	0,005	14,31



Obrázek 21 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 1 mM



Obrázek 22 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 1 mM

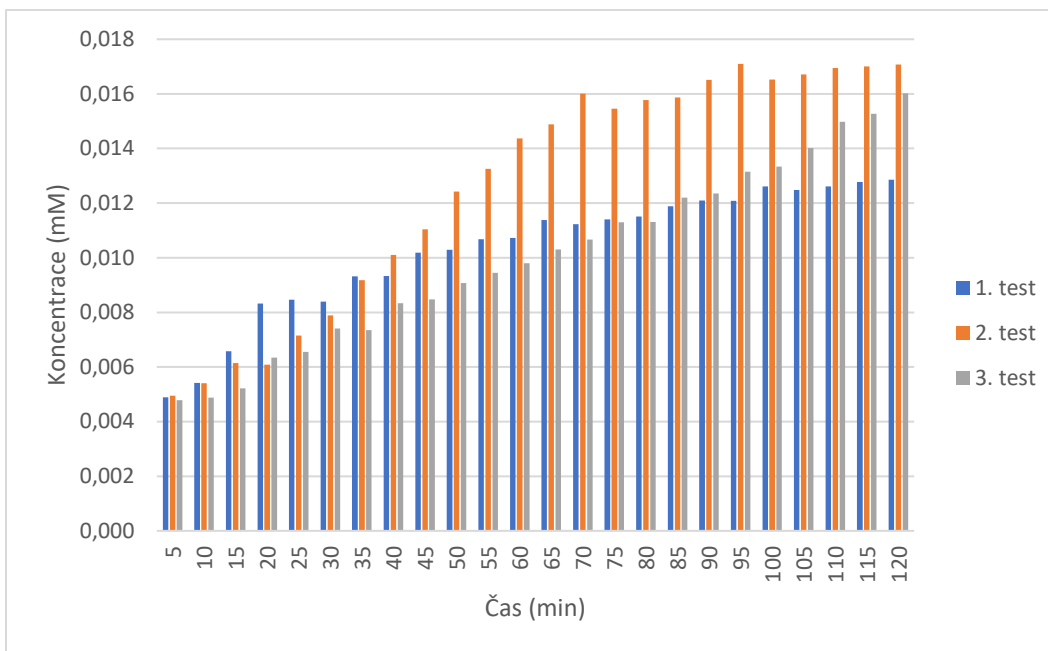
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,34 (0,1 mM standard). Při této koncentraci byly také proměřeny čtyři vzorky na místo tří, jelikož první vzorek se výsledky velmi lišil od ostatních dvou. U 1 mM koncentrace můžeme zpozorovat, že směrodatné odchylky se opět zvětšují s přibývajícím časem měření i s rostoucí koncentrací. I když první test vyšel poněkud v jiných hodnotách než ostatní 3 testy, tak pro všechny testované vzorky v této koncentraci platí, že po celou dobu monitorování propuštěná koncentrace sulisobenzonu roste, a to i na konci měření. Za 2 hodiny testování prošlo přes membránu v 1. testu 0,040 mM (64%), v 2. testu 0,030 mM (48%), v 3. testu 0,035 mM (56%) a v 4. testu 0,028 mM

(45%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,033 mM (53%) sulisobenzonu. U této koncentrace je patrný nejvyšší nárůst výsledné koncentrace oproti původní, ale také nejnižší procento prošlého sulisobenzonu.

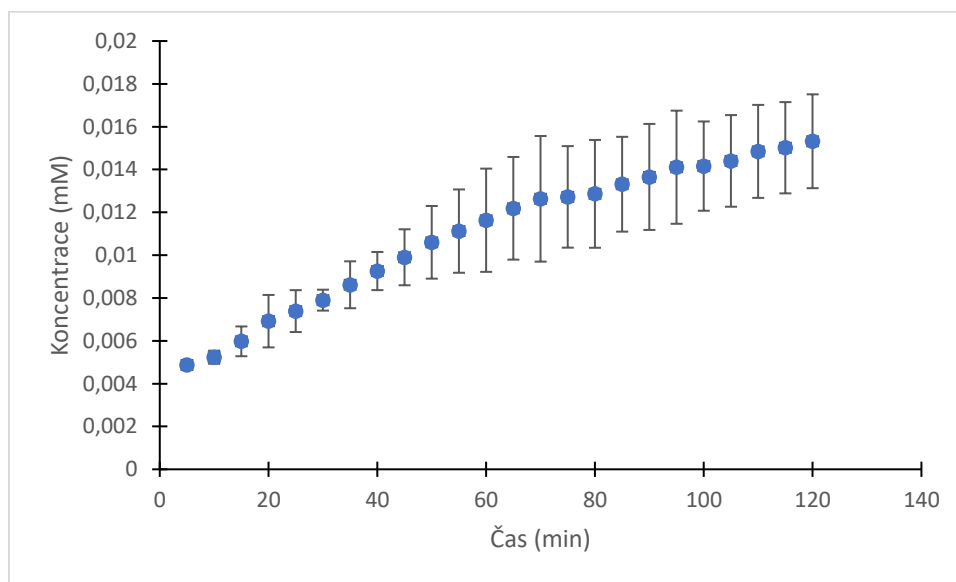
5.2.6 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,4 mM v 10% ethanolu

Tabulka 15 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu o koncentraci 0,4 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	1,65
10	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	5,84
15	0,007	0,006	0,005	0,006	0,001	11,64
20	0,008	0,006	0,006	0,007	0,001	17,71
25	0,008	0,007	0,007	0,007	0,001	13,24
30	0,008	0,008	0,007	0,008	0,000	6,18
35	0,009	0,009	0,007	0,009	0,001	12,72
40	0,009	0,010	0,008	0,009	0,001	9,61
45	0,010	0,011	0,008	0,010	0,001	13,21
50	0,010	0,012	0,009	0,011	0,002	16,01
55	0,011	0,013	0,009	0,011	0,002	17,49
60	0,011	0,014	0,010	0,012	0,002	20,73
65	0,011	0,015	0,010	0,012	0,002	19,67
70	0,011	0,016	0,011	0,013	0,003	23,22
75	0,011	0,015	0,011	0,013	0,002	18,64
80	0,012	0,016	0,011	0,013	0,003	19,58
85	0,012	0,016	0,012	0,013	0,002	16,63
90	0,012	0,017	0,012	0,014	0,002	18,13
95	0,012	0,017	0,013	0,014	0,003	18,73
100	0,013	0,017	0,013	0,014	0,002	14,72
105	0,012	0,017	0,014	0,014	0,002	14,86
110	0,013	0,017	0,015	0,015	0,002	14,62
115	0,013	0,017	0,015	0,015	0,002	14,19
120	0,013	0,017	0,016	0,015	0,002	14,31



Obrázek 23 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,4 mM



Obrázek 24 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,4 mM

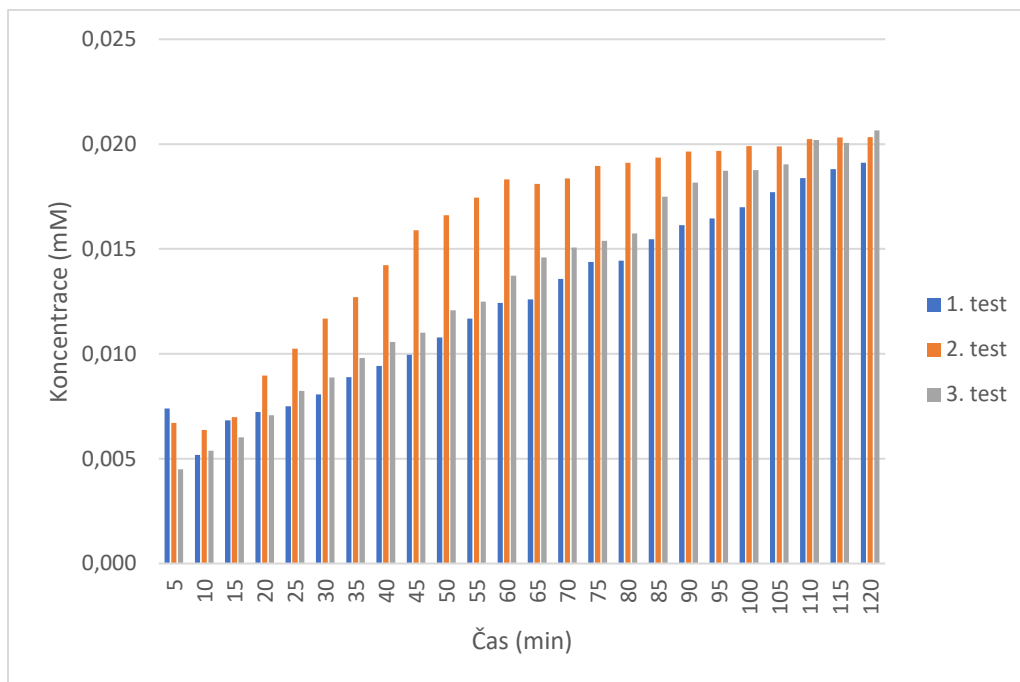
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,36 (0,1 mM standard). Po vodném rozpouštědle byly testovány roztoky připravené v 10% ethanolu. V tomto rozpouštědle, a i v dalších rozpouštědlech byly testovány pouze koncentrace 0,4; 0,5 a 1 mM z důvodu lepší reprodukovatelnosti dat. Při měření 0,4 mM koncentrace si můžeme všimnout, že směrodatné odchylky jsou větší spíše ke konci měření než na začátku liberace. Jejich velikost je chaotická a první větší odchylku můžeme pozorovat již v 20-té minutě měření, což u žádné dosud měřené koncentrace nebylo patrné. V porovnání s 0,4 mM koncentrací testovanou ve vodném médiu jsou směrodatné odchylky v 10% ethanolu o dost větší. Reprodukovatelnost dat je

tedy lepší ve vodném prostředí při této koncentraci. Z liberačního profilu je zřejmé, že koncentrace roste po celou dobu liberace a není ustálena ani po 2 hodinách měření. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,013 mM (52%), v 2. testu 0,017 mM (68%) a v 3. testu 0,016 mM (64%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,015 mM (60%) sulisobenzonu. Z toho vyplývá, že EtOH má vliv na prostupnost sulisobenzonu přes membránu, a to takovou, že zabraňuje prostupu látky přes bariéru v porovnání s vodným roztokem.

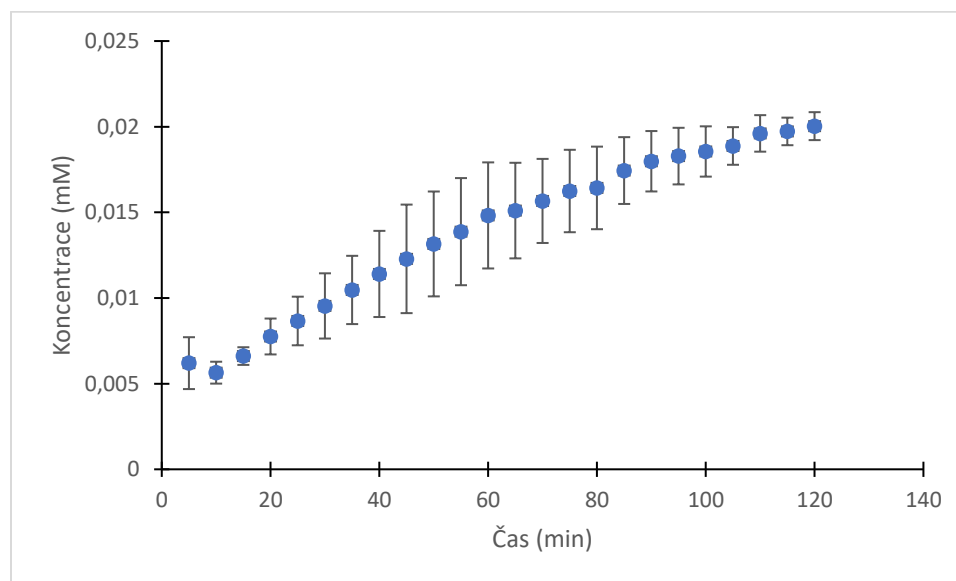
5.2.7 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,5 mM v 10% ethanolu

Tabulka 16 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu o koncentraci 0,5 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,007	0,007	0,004	0,006	0,002	24,43
10	0,005	0,006	0,005	0,006	0,001	11,33
15	0,007	0,007	0,006	0,007	0,001	7,80
20	0,007	0,009	0,007	0,008	0,001	13,51
25	0,007	0,010	0,008	0,009	0,001	16,39
30	0,008	0,012	0,009	0,010	0,002	19,96
35	0,009	0,013	0,010	0,010	0,002	19,03
40	0,009	0,014	0,011	0,011	0,003	22,05
45	0,010	0,016	0,011	0,012	0,003	25,79
50	0,011	0,017	0,012	0,013	0,003	23,27
55	0,012	0,017	0,012	0,014	0,003	22,54
60	0,012	0,018	0,014	0,015	0,003	20,89
65	0,013	0,018	0,015	0,015	0,003	18,48
70	0,014	0,018	0,015	0,016	0,002	15,67
75	0,014	0,019	0,015	0,016	0,002	14,81
80	0,014	0,019	0,016	0,016	0,002	14,67
85	0,015	0,019	0,017	0,017	0,002	11,18
90	0,016	0,020	0,018	0,018	0,002	9,80
95	0,016	0,020	0,019	0,018	0,002	9,04
100	0,017	0,020	0,019	0,019	0,001	7,91
105	0,018	0,020	0,019	0,019	0,001	5,82
110	0,018	0,020	0,020	0,020	0,001	5,44
115	0,019	0,020	0,020	0,020	0,001	4,08
120	0,019	0,020	0,021	0,020	0,001	4,07



Obrázek 25 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,5 mM



Obrázek 26 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,5 mM

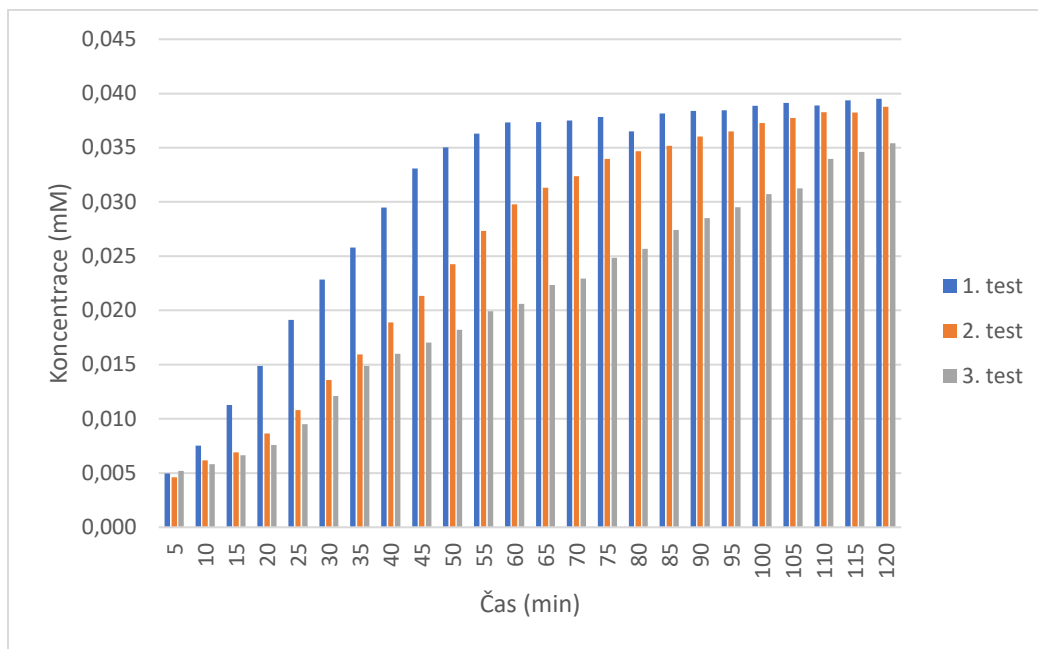
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,36 (0,1 mM standard). Při testování 0,5 mM koncentrace můžeme pozorovat atypický graf se směrodatnými odchylkami, které jsou největší uprostřed měření, a naopak na začátku a ke konci monitorování jsou relativně malé. Takový průběh nebyl doposud zaznamenán v žádném rozpouštědle ani u žádné testované koncentrace. Z liberačního profilu je zřejmé, že koncentrace roste po celou dobu liberace. Za 2 hodiny měření prošlo přes membránu v 1. testu 0,019 mM (61%), v 2. testu 0,020 mM (64%) a v 3. testu 0,021 mM (67%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes

membránu za 2 hodiny 0,020 mM (64%) sulisobenzonu, což je o 6% méně než při použití superčisté vody jako rozpouštědla. Procentuálně prošlo více sulisobenzonu přes membránu při této koncentraci než při 0,4 mM, což je přesný opak, než byl pozorován u vodného roztoku. U EtOH očividně roste procentuální prostup látky přes membránu s rostoucí výchozí koncentrací na rozdíl od vodného média, kde je tomu přesně naopak.

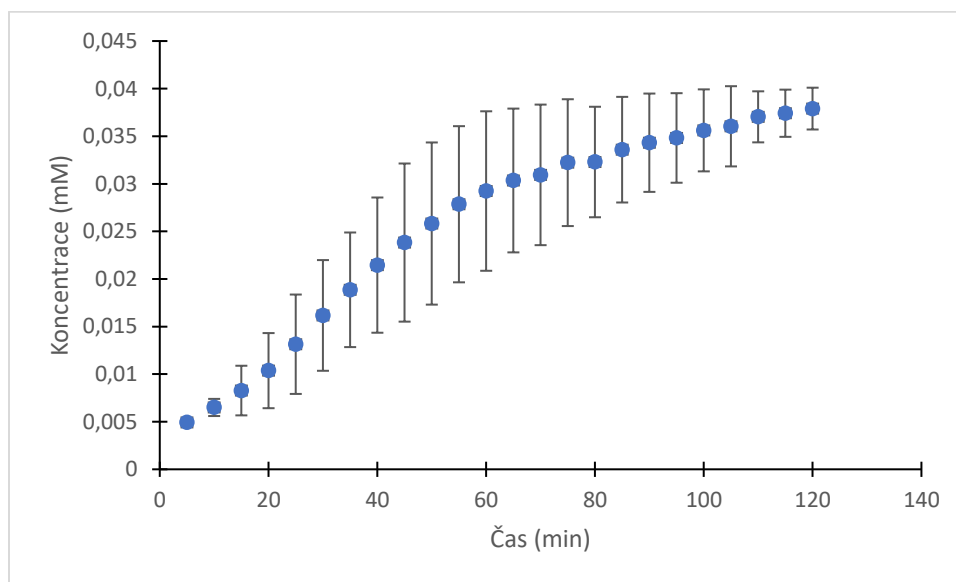
5.2.8 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 10% ethanolu

Tabulka 17 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu o koncentraci 1 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	6,13
10	0,008	0,006	0,006	0,006	0,001	13,87
15	0,011	0,007	0,007	0,008	0,003	31,50
20	0,015	0,009	0,008	0,010	0,004	38,07
25	0,019	0,011	0,009	0,013	0,005	39,74
30	0,023	0,014	0,012	0,016	0,006	35,97
35	0,026	0,016	0,015	0,019	0,006	31,92
40	0,029	0,019	0,016	0,021	0,007	33,11
45	0,033	0,021	0,017	0,024	0,008	34,87
50	0,035	0,024	0,018	0,026	0,009	32,99
55	0,036	0,027	0,020	0,028	0,008	29,46
60	0,037	0,030	0,021	0,029	0,008	28,66
65	0,037	0,031	0,022	0,030	0,008	24,89
70	0,037	0,032	0,023	0,031	0,007	23,87
75	0,038	0,034	0,025	0,032	0,007	20,68
80	0,037	0,035	0,026	0,032	0,006	17,98
85	0,038	0,035	0,027	0,034	0,006	16,52
90	0,038	0,036	0,029	0,034	0,005	15,06
95	0,038	0,037	0,029	0,035	0,005	13,52
100	0,039	0,037	0,031	0,036	0,004	12,10
105	0,039	0,038	0,031	0,036	0,004	11,69
110	0,039	0,038	0,034	0,037	0,003	7,24
115	0,039	0,038	0,035	0,037	0,002	6,63
120	0,040	0,039	0,035	0,038	0,002	5,80



Obrázek 27 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 1 mM



Obrázek 28 Směrodatné odchytky při liberaci sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 1 mM

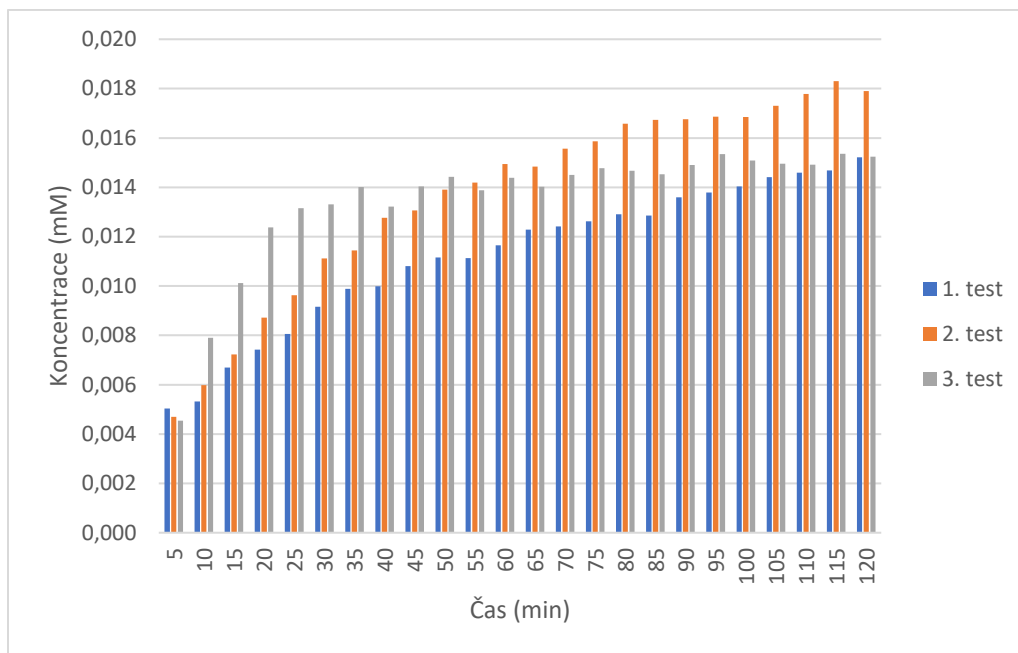
Poslední testovaná koncentrace rozpuštěná v 10% EtOH byla 1 mM. Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,35 (0,1 mM standard). Stejně jako u 0,5 mM rozpuštěné v 10% EtOH můžeme vidět atypický graf se směrodatnými odchytkami. Odchytky jsou stejně jako u 0,5 mM koncentrace největší uprostřed měření, a naopak na začátku a ke konci testování jsou relativně malé. Z liberačního profilu je zřejmé, že koncentrace roste po celou dobu liberace až na 1. test, kdy naměřená koncentrace se od 60-té minuty téměř nemění a drobně kolísá kolem hodnoty 0,037 mM. Za 2 hodiny měření prošlo přes membránu v 1. testu 0,040 mM (64%), v 2. testu 0,039 mM (62%) a v 3. testu 0,035 mM (56%) sulisobenzonu.

V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,038 mM (61%) sulisobenzonu, což je o 8% více než při použití superčisté vody jako rozpouštědla. Procentuálně prošlo více sulisobenzonu přes membránu při této koncentraci než při 0,4 mM, ale méně než při koncentraci 0,5 mM. Plyne tedy z toho fakt, že koncentrace nemá přímý efekt na výslednou prostoupenou koncentraci. EtOH v porovnání se superčistou vodou rozhodně nejeví známky nějaké posloupnosti či možnosti předpovědi chování.

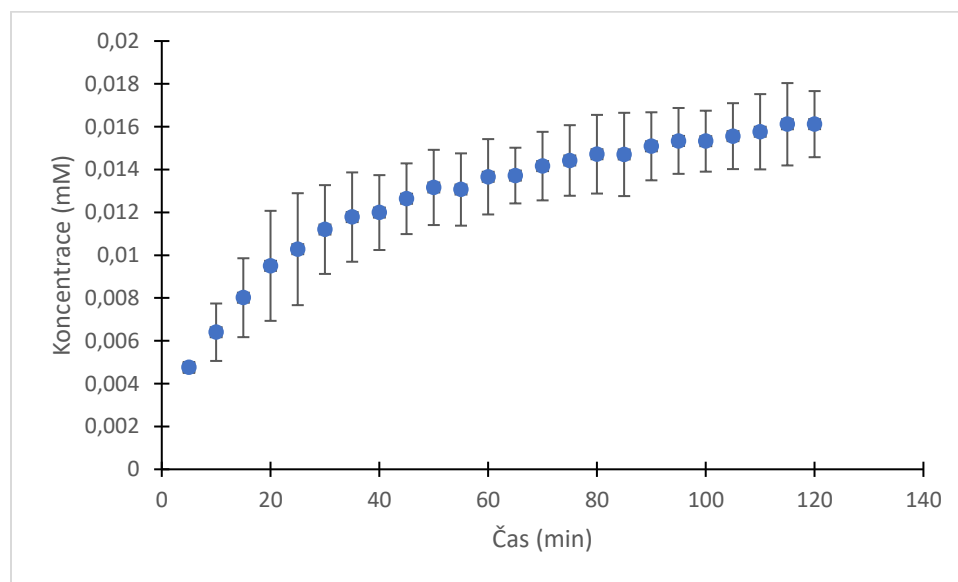
5.2.9 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,4 mM v 10% propylenglykolu

Tabulka 18 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu o koncentraci 0,4 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	5,29
10	0,005	0,006	0,008	0,006	0,001	20,95
15	0,007	0,007	0,010	0,008	0,002	22,99
20	0,007	0,009	0,012	0,010	0,003	27,04
25	0,008	0,010	0,013	0,010	0,003	25,43
30	0,009	0,011	0,013	0,011	0,002	18,51
35	0,010	0,011	0,014	0,012	0,002	17,71
40	0,010	0,013	0,013	0,012	0,002	14,58
45	0,011	0,013	0,014	0,013	0,002	13,07
50	0,011	0,014	0,014	0,013	0,002	13,34
55	0,011	0,014	0,014	0,013	0,002	12,92
60	0,012	0,015	0,014	0,014	0,002	12,88
65	0,012	0,015	0,014	0,014	0,001	9,49
70	0,012	0,016	0,015	0,014	0,002	11,31
75	0,013	0,016	0,015	0,014	0,002	11,43
80	0,013	0,017	0,015	0,015	0,002	12,48
85	0,013	0,017	0,015	0,015	0,002	13,23
90	0,014	0,017	0,015	0,015	0,002	10,54
95	0,014	0,017	0,015	0,015	0,002	10,03
100	0,014	0,017	0,015	0,015	0,001	9,29
105	0,014	0,017	0,015	0,016	0,002	9,89
110	0,015	0,018	0,015	0,016	0,002	11,15
115	0,015	0,018	0,015	0,016	0,002	11,94
120	0,015	0,018	0,015	0,016	0,002	9,58



Obrázek 29 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM



Obrázek 30 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM

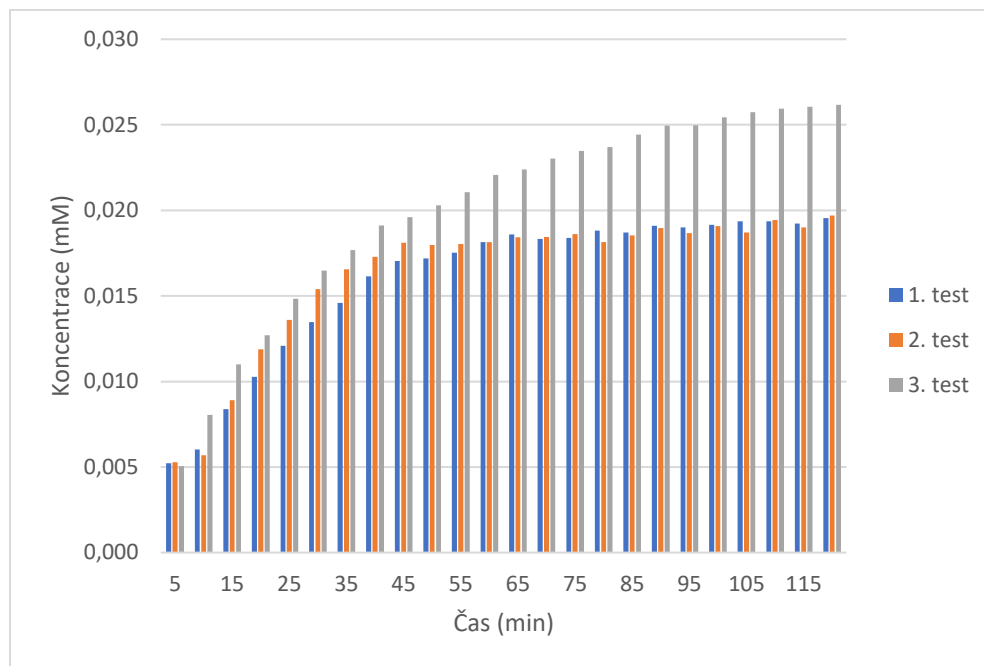
Další testované rozpouštědlo byl 10% propylenglykol. Testovány byly roztoky o koncentracích 0,4; 0,5 a 1 mM. Průměrná hodnota absorpance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,35 (0,1 mM standard). Graf s odchylkami je zde zajímavý v tom, že odchylky jsou velmi podobné po celou dobu měření a nijak extrémně se nemění v jeho průběhu. To do této doby nebylo pozorováno. Z liberačního profilu je zřejmé, že koncentrace roste po celou dobu liberace, vyjma 3. testu. Ten dosahuje téměř maximální hodnoty již po 50 minutách monitorování. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,015 mM (60%), v 2. testu 0,018 mM (72%) a v 3. testu 0,015 mM (60%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny

0,016 mM (64%) sulisobenzonu, což je o 16% méně než při použití superčisté vody jako rozpouštědla a o 4% více než při použití EtOH jako rozpouštědla. Můžeme konstatovat, že 10% PG také ovlivňuje prostupnost přes membránu (stejně jako EtOH) a to tak, že spíše prostupu brání.

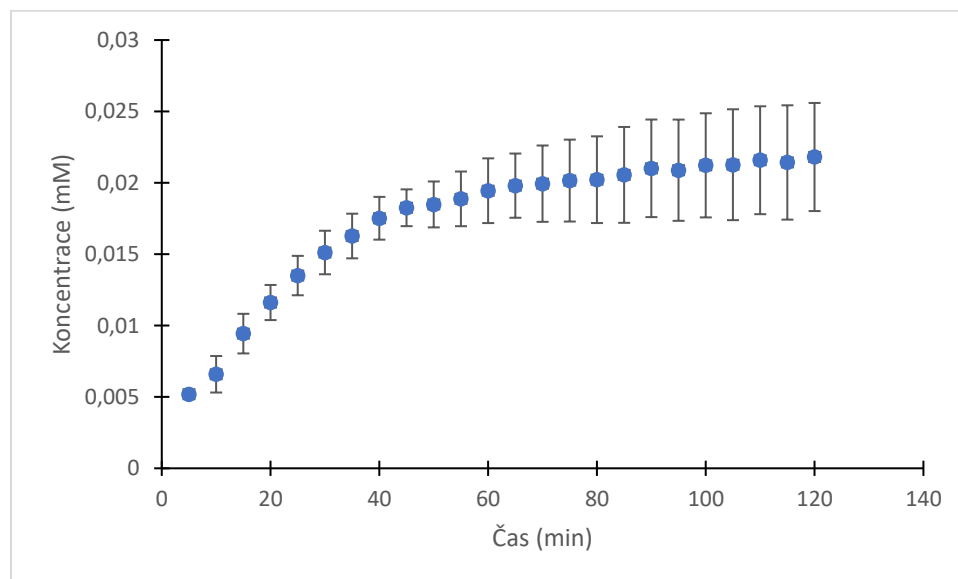
5.2.10 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,5 mM v 10% propylenglykolu

Tabulka 19 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu o koncentraci 0,5 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	2,31
10	0,006	0,006	0,008	0,007	0,001	19,41
15	0,008	0,009	0,011	0,009	0,001	14,72
20	0,010	0,012	0,013	0,012	0,001	10,59
25	0,012	0,014	0,015	0,014	0,001	10,23
30	0,013	0,015	0,016	0,015	0,002	10,08
35	0,015	0,017	0,018	0,016	0,002	9,61
40	0,016	0,017	0,019	0,018	0,001	8,55
45	0,017	0,018	0,020	0,018	0,001	7,06
50	0,017	0,018	0,020	0,018	0,002	8,70
55	0,018	0,018	0,021	0,019	0,002	10,15
60	0,018	0,018	0,022	0,019	0,002	11,66
65	0,019	0,018	0,022	0,020	0,002	11,36
70	0,018	0,018	0,023	0,020	0,003	13,41
75	0,018	0,019	0,023	0,020	0,003	14,24
80	0,019	0,018	0,024	0,020	0,003	15,02
85	0,019	0,019	0,024	0,021	0,003	16,34
90	0,019	0,019	0,025	0,021	0,003	16,27
95	0,019	0,019	0,025	0,021	0,004	16,98
100	0,019	0,019	0,025	0,021	0,004	17,18
105	0,019	0,019	0,026	0,021	0,004	18,26
110	0,019	0,019	0,026	0,022	0,004	17,51
115	0,019	0,019	0,026	0,021	0,004	18,69
120	0,020	0,020	0,026	0,022	0,004	17,36



Obrázek 31 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM



Obrázek 32 Směrodatné odchytky při liberaci sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM

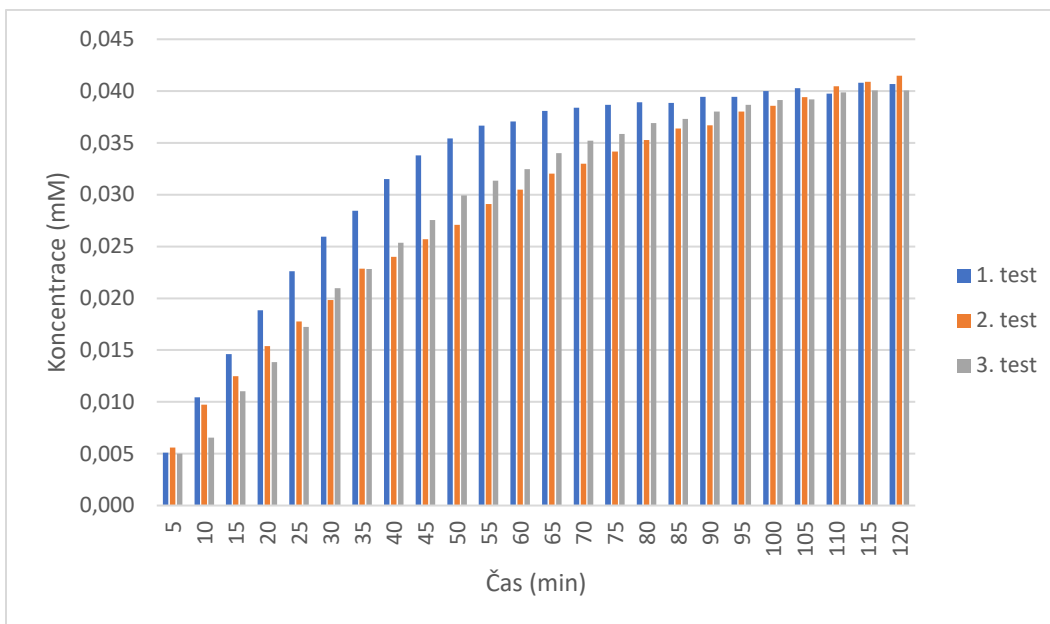
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,34 (0,1 mM standard). U 0,5 mM koncentrace je viditelný graf s rostoucími směrodatnými odchytkami po čas měření, což je velmi podobné směrodatným odchytkám naměřených ve vodném prostředí. Liberační profil je při této koncentraci poněkud rozdílný. 1. a 2. test vychází velmi podobně. Oba dosahují maximální koncentrace již v průběhu monitorování. 3. test neustále roste, a především dosahuje i vyšších koncentrací než první dva testy. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,020 mM (64%), v 2. testu 0,020 mM (64%) a v 3. testu 0,026 mM (83%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,022 mM (70%) sulisobenzonu, což je shodný

výsledek jako při použití superčisté vody jako rozpouštědla a o 6% více než při použití 10% EtOH jako rozpouštědla. Při této koncentraci se PG chová podobně jako při použití superčisté vody na rozdíl od 0,4 mM koncentrace, kde se spíše podobal chováním EtOH.

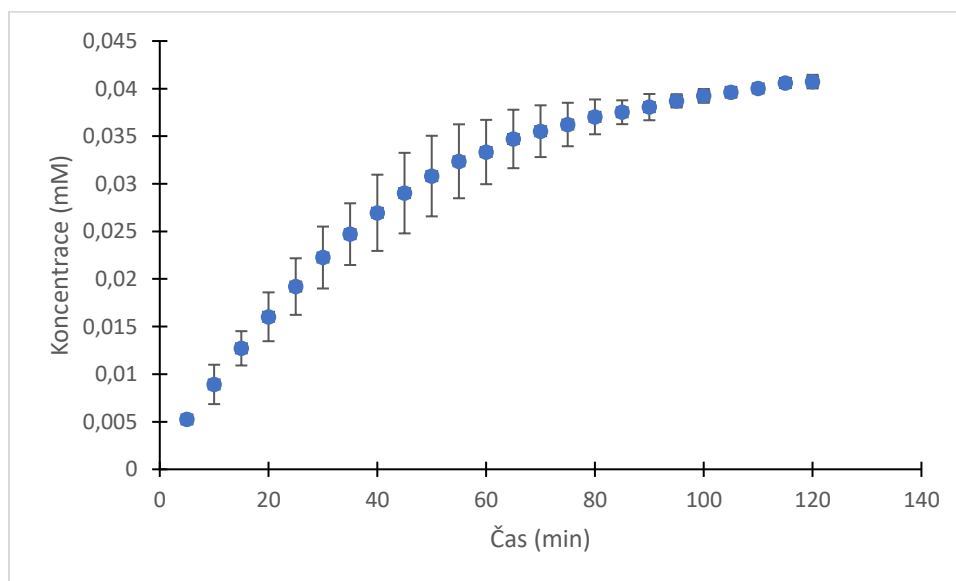
5.2.11 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 10% propylenglykolu

Tabulka 20 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu o koncentraci 1 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,006	0,005	0,005	0,000	6,05
10	0,010	0,010	0,007	0,009	0,002	23,20
15	0,015	0,012	0,011	0,013	0,002	14,19
20	0,019	0,015	0,014	0,016	0,003	16,02
25	0,023	0,018	0,017	0,019	0,003	15,48
30	0,026	0,020	0,021	0,022	0,003	14,62
35	0,028	0,023	0,023	0,025	0,003	13,12
40	0,032	0,024	0,025	0,027	0,004	14,86
45	0,034	0,026	0,028	0,029	0,004	14,58
50	0,035	0,027	0,030	0,031	0,004	13,75
55	0,037	0,029	0,031	0,032	0,004	12,00
60	0,037	0,030	0,032	0,033	0,003	10,14
65	0,038	0,032	0,034	0,035	0,003	8,85
70	0,038	0,033	0,035	0,036	0,003	7,65
75	0,039	0,034	0,036	0,036	0,002	6,30
80	0,039	0,035	0,037	0,037	0,002	4,94
85	0,039	0,036	0,037	0,038	0,001	3,35
90	0,039	0,037	0,038	0,038	0,001	3,62
95	0,039	0,038	0,039	0,039	0,001	1,80
100	0,040	0,039	0,039	0,039	0,001	1,85
105	0,040	0,039	0,039	0,040	0,001	1,42
110	0,040	0,040	0,040	0,040	0,000	0,93
115	0,041	0,041	0,040	0,041	0,000	1,11
120	0,041	0,041	0,040	0,041	0,001	1,74



Obrázek 33 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonumu v 10% propylenglykolu při koncentraci 1 mM



Obrázek 34 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonumu v 10% propylenglykolu při koncentraci 1 mM

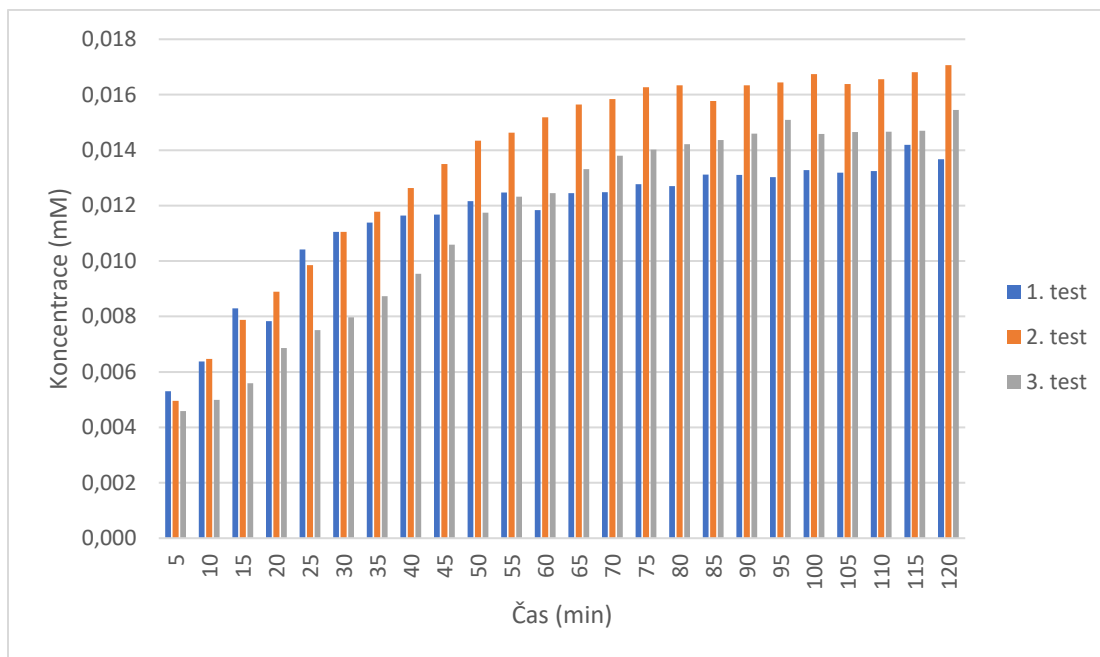
Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,36 (0,1 mM standard). Směrodatné odchylky u 1 mM koncentrace jsou větší v průběhu měření. Na začátku a ke konci jsou malé, ale jsou relativně nižší zejména v porovnání s EtOH. Průběh, kdy byly SD větší během měření a na začátku/konci byly menší, byl už zpozorován při monitorování 0,5 mM a 1 mM koncentrací rozpuštěných v 10% EtOH. Z liberačního profilu je zřejmé, že koncentrace roste po celou dobu liberace. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,041 mM (66%), v 2. testu 0,041 mM (66%) a v 3. testu 0,040 mM (64%) sulisobenzonumu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,041 mM (66%) sulisobenzonumu, což je o 13% více než při použití superčisté vody jako rozpouštědla a o 3% více než při použití EtOH jako

rozpuštědla. Z výsledků, kdy je procentuálně dosaženo nejvyšší koncentrace při koncentraci 0,5 mM poté v 1 mM a nakonec při 0,4 mM je patrné, že 10% PG se chová velmi podobně jako 10% EtOH. Nicméně u všech testovaných koncentrací je dosaženo vyšších propuštěných koncentrací než u 10% EtOH.

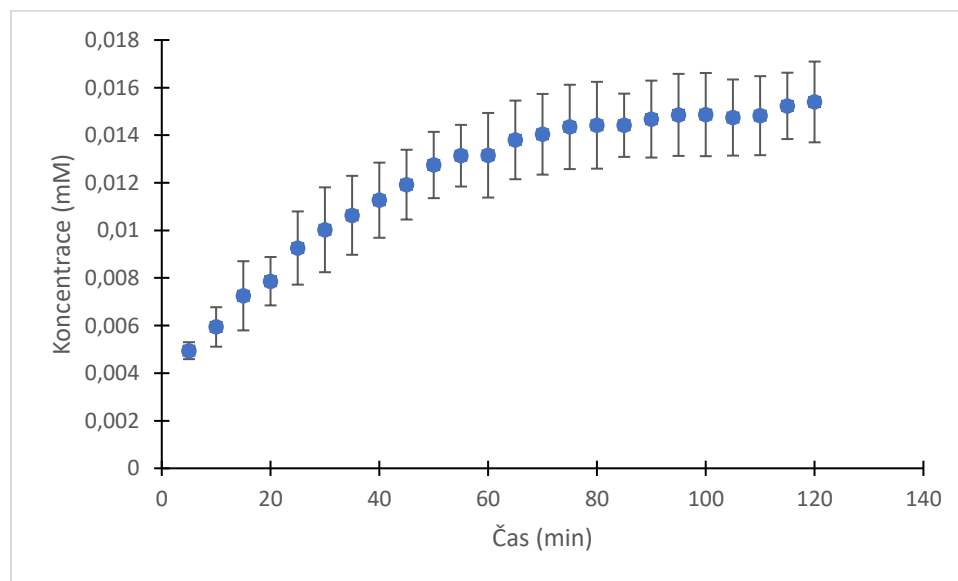
5.2.12 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,4 mM v 5% propylenglykolu

Tabulka 21 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu o koncentraci 0,4 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	7,20
10	0,006	0,006	0,005	0,006	0,001	13,97
15	0,008	0,008	0,006	0,007	0,001	20,06
20	0,008	0,009	0,007	0,008	0,001	12,94
25	0,010	0,010	0,008	0,009	0,002	16,62
30	0,011	0,011	0,008	0,010	0,002	17,78
35	0,011	0,012	0,009	0,011	0,002	15,61
40	0,012	0,013	0,010	0,011	0,002	14,01
45	0,012	0,013	0,011	0,012	0,001	12,30
50	0,012	0,014	0,012	0,013	0,001	10,93
55	0,012	0,015	0,012	0,013	0,001	9,87
60	0,012	0,015	0,012	0,013	0,002	13,51
65	0,012	0,016	0,013	0,014	0,002	11,97
70	0,012	0,016	0,014	0,014	0,002	12,08
75	0,013	0,016	0,014	0,014	0,002	12,35
80	0,013	0,016	0,014	0,014	0,002	12,65
85	0,013	0,016	0,014	0,014	0,001	9,22
90	0,013	0,016	0,015	0,015	0,002	11,02
95	0,013	0,016	0,015	0,015	0,002	11,61
100	0,013	0,017	0,015	0,015	0,002	11,76
105	0,013	0,016	0,015	0,015	0,002	10,85
110	0,013	0,017	0,015	0,015	0,002	11,20
115	0,014	0,017	0,015	0,015	0,001	9,16
120	0,014	0,017	0,015	0,015	0,002	11,03



Obrázek 35 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonum v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM



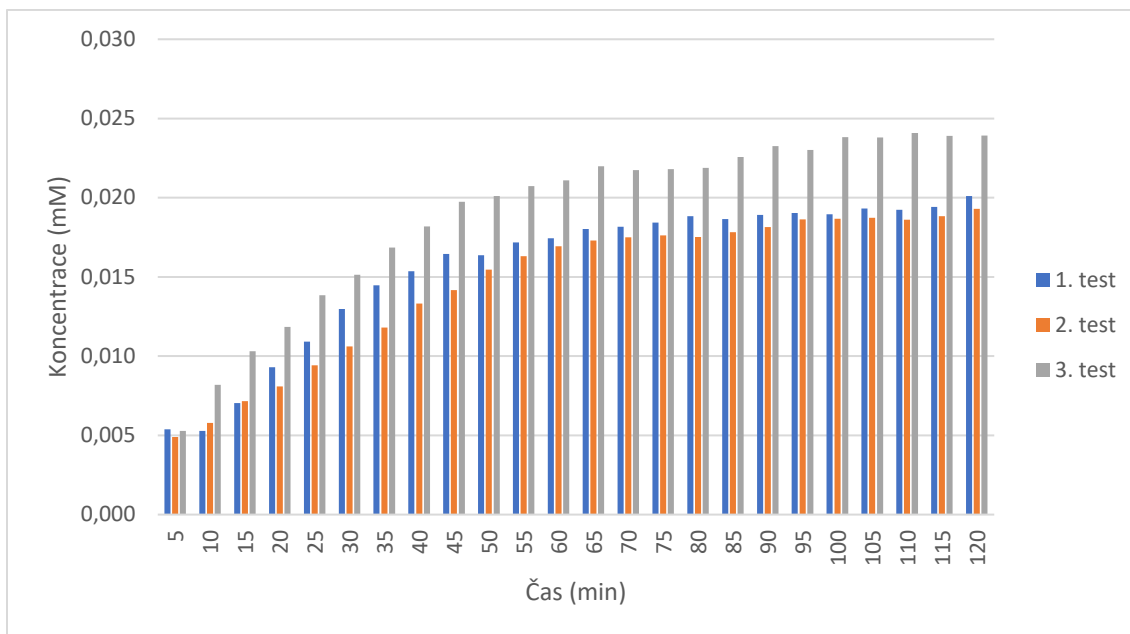
Obrázek 36 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonum v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM

Dále bylo otestováno, jestli stačí nižší koncentrace propylenglykolu a jaký bude mít vliv na liberaci sulisobenzonum. Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,35 (0,1 mM standard). SD u 0,4 mM koncentrace jsou dosti podobné po celý průběh měření. Z liberačního profilu je zřejmé, že koncentrace roste po celou dobu liberace. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,014 mM (56%), v 2. testu 0,017 mM (68%) a v 3. testu 0,015 mM (60%) sulisobenzonum. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,015 mM (60%) sulisobenzonum, což je o 20% méně než při použití superčisté vody jako rozpouštědla, stejně jako při použití 10% EtOH a o 4% méně než při použití 10% PG jako rozpouštědla.

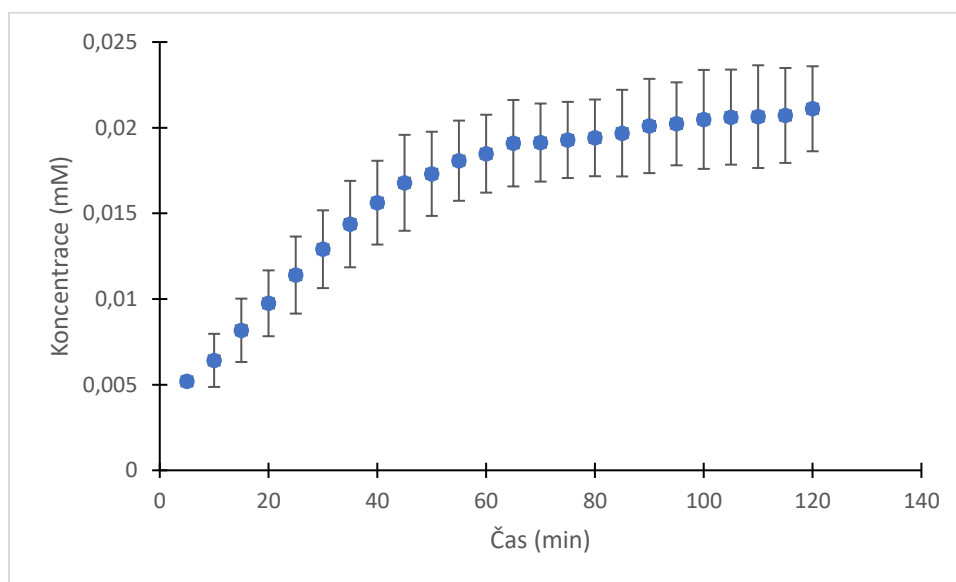
5.2.13 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 0,5 mM v 5% propylenglykolu

Tabulka 22 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu o koncentraci 0,5 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)			průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3			
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	4,86
10	0,005	0,006	0,008	0,006	0,002	24,17
15	0,007	0,007	0,010	0,008	0,002	22,63
20	0,009	0,008	0,012	0,010	0,002	19,72
25	0,011	0,009	0,014	0,011	0,002	19,74
30	0,013	0,011	0,015	0,013	0,002	17,59
35	0,014	0,012	0,017	0,014	0,003	17,56
40	0,015	0,013	0,018	0,016	0,002	15,66
45	0,016	0,014	0,020	0,017	0,003	16,68
50	0,016	0,015	0,020	0,017	0,002	14,20
55	0,017	0,016	0,021	0,018	0,002	12,95
60	0,017	0,017	0,021	0,018	0,002	12,30
65	0,018	0,017	0,022	0,019	0,003	13,21
70	0,018	0,017	0,022	0,019	0,002	11,92
75	0,018	0,018	0,022	0,019	0,002	11,53
80	0,019	0,018	0,022	0,019	0,002	11,54
85	0,019	0,018	0,023	0,020	0,003	12,85
90	0,019	0,018	0,023	0,020	0,003	13,69
95	0,019	0,019	0,023	0,020	0,002	11,98
100	0,019	0,019	0,024	0,020	0,003	14,10
105	0,019	0,019	0,024	0,021	0,003	13,46
110	0,019	0,019	0,024	0,021	0,003	14,53
115	0,019	0,019	0,024	0,021	0,003	13,38
120	0,020	0,019	0,024	0,021	0,002	11,76



Obrázek 37 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM



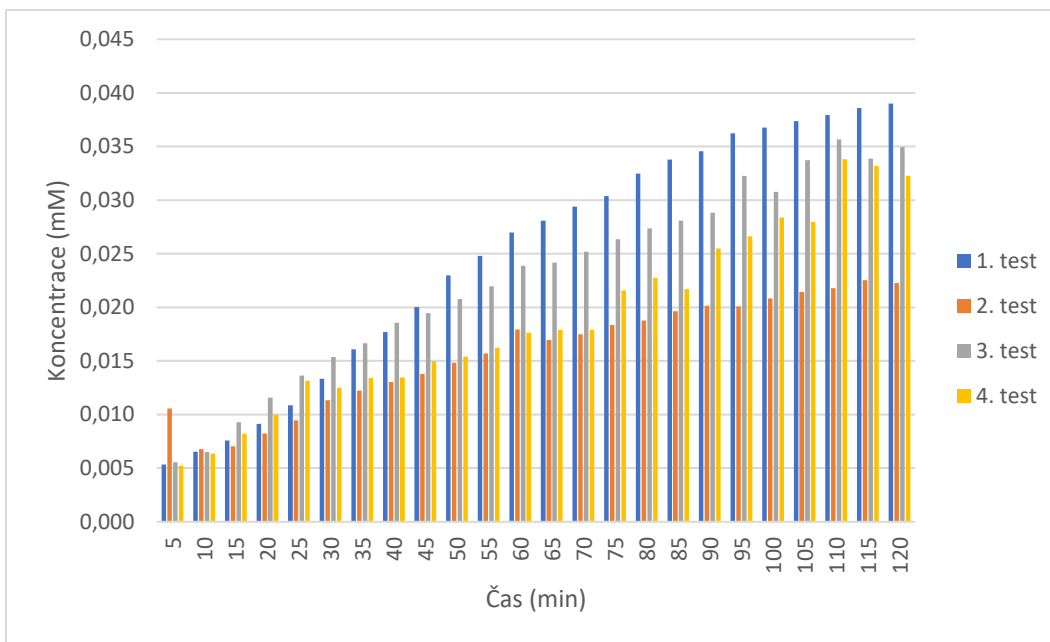
Obrázek 38 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM

Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,35 (0,1 mM standard). U 0,5 mM koncentrace jsou směrodatné odchylky velmi podobné po celou dobu liberace stejně jako u 0,4 mM koncentrace. Z liberačního profilu můžeme vyčíst, že koncentrace roste především v první hodině měření, poté roste pomaleji. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,020 mM (64%), v 2. testu 0,019 mM (61%) a v 3. testu 0,024 mM (77%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,020 mM (64%) sulisobenzonu, což je o 6% méně než při použití superčisté vody jako rozpouštědla, stejně jako při použití 10% EtOH a o 6% méně než při použití 10% PG jako rozpouštědla.

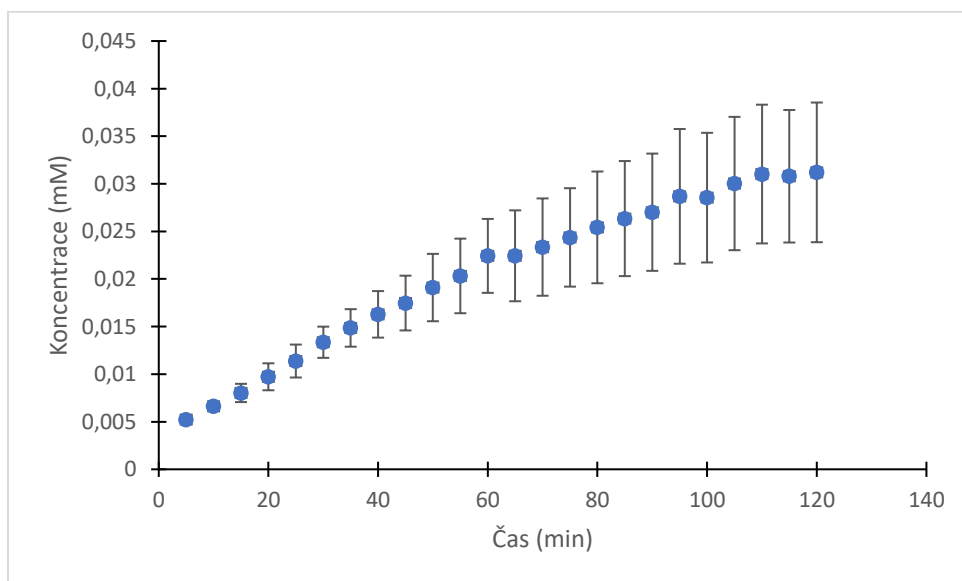
5.2.14 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 5% propylenglykolu

Tabulka 23 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu o koncentraci 1 mM

Doba měření (min)	Koncentrace sulisobenzonu (mM)				průměr	SD	RSD (%)
	test 1	test 2	test 3	test 4			
5	0,005	0,005	0,006	0,005	0,005	0,000	6,09
10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,000	1,95
15	0,008	0,007	0,009	0,008	0,008	0,001	11,96
20	0,009	0,008	0,012	0,010	0,010	0,001	14,58
25	0,011	0,009	0,014	0,012	0,011	0,002	15,21
30	0,013	0,011	0,015	0,013	0,013	0,002	12,29
35	0,016	0,012	0,017	0,014	0,015	0,002	13,28
40	0,018	0,013	0,019	0,016	0,016	0,002	15,02
45	0,020	0,014	0,019	0,017	0,017	0,003	16,47
50	0,023	0,015	0,021	0,018	0,019	0,004	18,53
55	0,025	0,016	0,022	0,019	0,020	0,004	19,29
60	0,027	0,018	0,024	0,021	0,022	0,004	17,32
65	0,028	0,017	0,024	0,021	0,022	0,005	21,29
70	0,029	0,017	0,025	0,021	0,023	0,005	21,90
75	0,030	0,018	0,026	0,022	0,024	0,005	21,22
80	0,032	0,019	0,027	0,023	0,025	0,006	23,10
85	0,034	0,020	0,028	0,024	0,026	0,006	22,95
90	0,035	0,020	0,029	0,024	0,027	0,006	22,81
95	0,036	0,020	0,032	0,026	0,029	0,007	24,68
100	0,037	0,021	0,031	0,026	0,029	0,007	23,87
105	0,037	0,021	0,034	0,028	0,030	0,007	23,33
110	0,038	0,022	0,036	0,029	0,031	0,007	23,50
115	0,039	0,023	0,034	0,028	0,031	0,007	22,61
120	0,039	0,022	0,035	0,029	0,031	0,007	23,52



Obrázek 39 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 1 mM

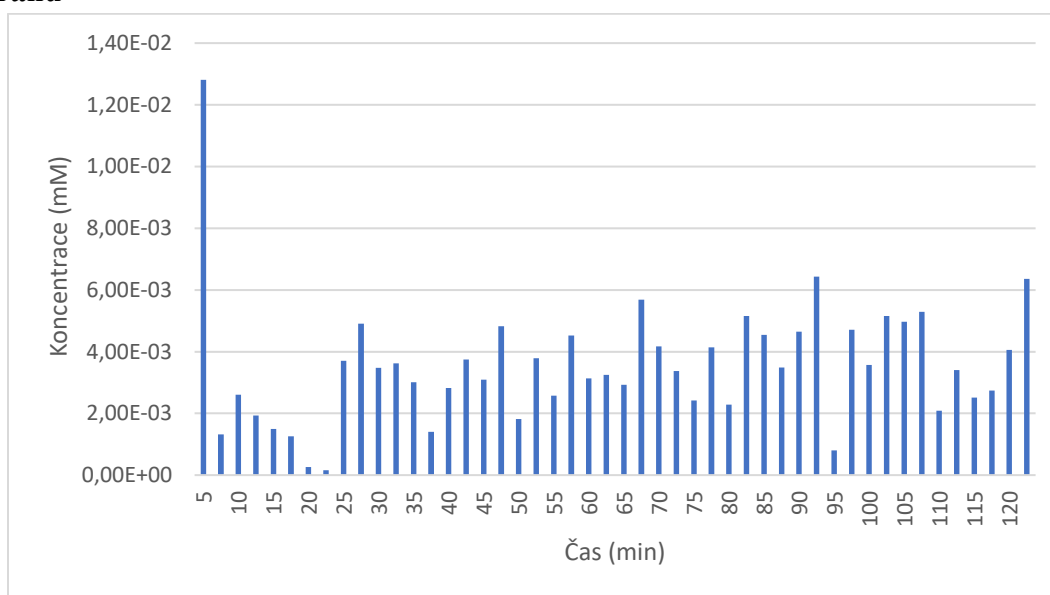


Obrázek 40 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 1 mM

Při koncentraci 1 mM testovaného roztoku byl experiment proveden opět čtyřikrát, protože mezi jednotlivými testovanými vzorky byly poměrné rozdíly. Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování této koncentrace byla 0,34 (0,1 mM standard). Směrodatné odchylky jsou zde jedny z největších vůbec ze všech testovaných koncentrací. S přibývajícím časem rostou po celou dobu měření. Všechny testy v liberačním profilu rostou v závislosti na přibývajícím čase. Za 2 hodiny prošlo přes membránu v 1. testu 0,039 mM (62%), v 2. testu 0,022 mM (35%), v 3. testu 0,035 mM (56%) a v 4. testu 0,032 mM (51%) sulisobenzonu. V průměru prošlo přes membránu za 2 hodiny 0,032 mM (51%) sulisobenzonu, což je o 2% méně než při

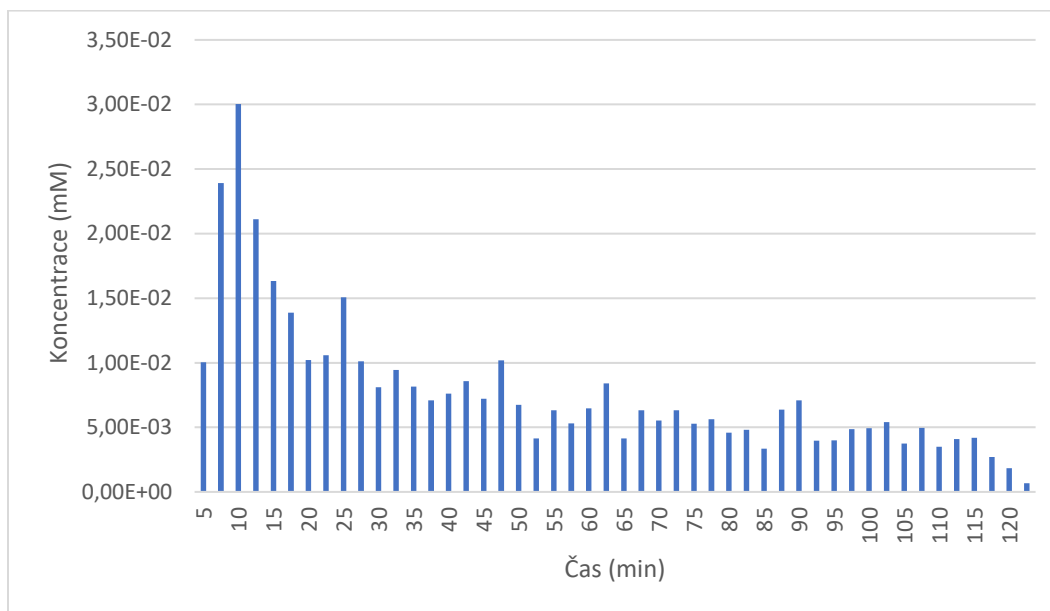
použití superčisté vody jako rozpouštědla, o 10% méně než při použití 10% EtOH jako rozpouštědla a o 15% méně než při použití 10% PG jako rozpouštědla. Až na 1 mM roztok byly výsledky naměřené v 5% PG totožné jako při použití 10% EtOH jako rozpouštědla. Nejvyšší koncentrace (1 mM) tuto podobnost nepotvrdila. Obecně se vymyká všem naměřeným výsledkům a procenta propuštěného sulisobenzonu jsou nejnižší vůbec. Žádná koncentrace v žádném rozpouštědle neposkytla tak málo prostoupeného sulisobenzonu jako tato.

5.2.15 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 5% propylenglykolu přes STRAT – M membránu



Obrázek 41 Liberační profil sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 1 mM na STRAT – M membráně

5.2.16 Liberace sulisobenzonu o koncentraci 1 mM v 10 % propylenglykolu přes STRAT – M membránu



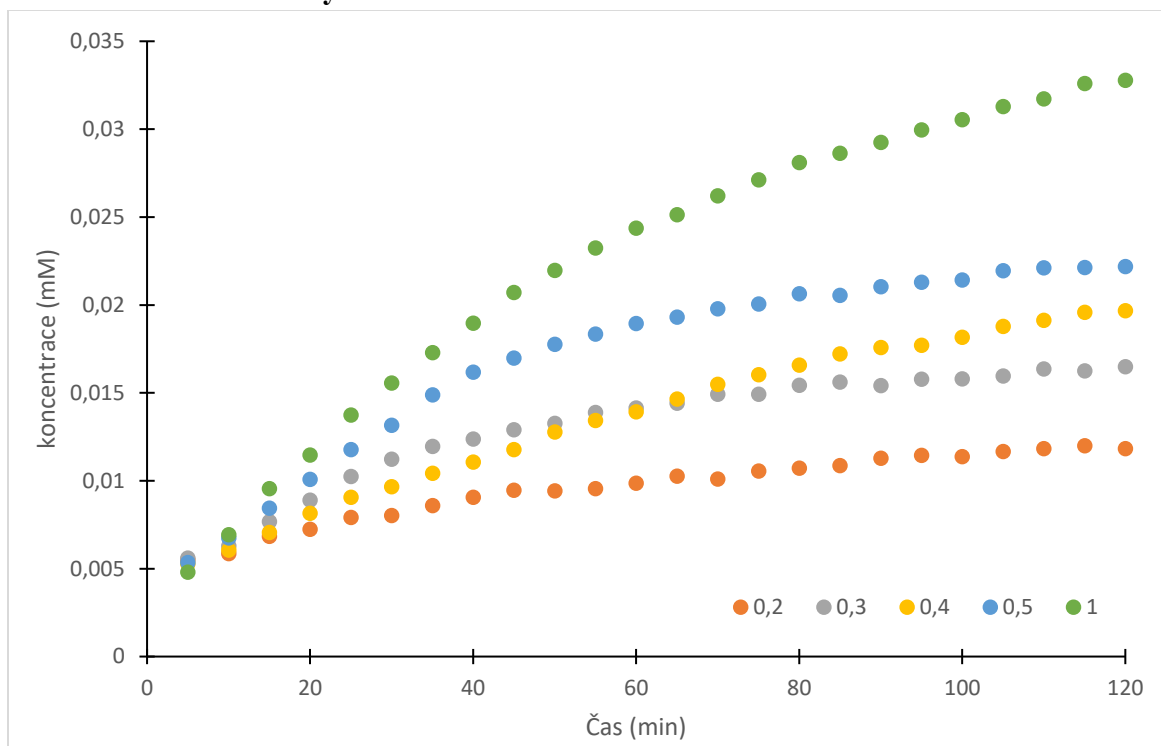
Obrázek 42 Liberační profil sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 1 mM na STRAT – M membráně

Nejkoncentrovanější testovaný roztok byl aplikován v kombinaci s 5% a 10% propylenglykolem na STRAT – M membránu, aby bylo potvrzeno, že tyto látky nezpůsobují prostup přes model lidské kůže. Průměrná hodnota absorbance pro ověření podmínek měření v den monitorování na STRAT – M membráně byla 0,34 (0,1 mM standard).

Vyhodnocení naměřených liberačních profilů v 5% a 10% propylenglykolu na STRAT – M membráně: Po naměřených liberačních profilech na polykarbonátové membráně byl proveden stejný experiment na STRAT – M membráně, která naopak tvoří bariéru podobnou lidské kůži. Naměřené profily v obou médiích dokazují, že STRAT – M membrána je pro sulisobenzon nepropustná, což je očekávaný výsledek s ohledem na působení sulisobenzonu jako UV filtru na povrchu kůže. Celé dvě hodiny monitorování se naměřené koncentrace pohybovaly pouze kolem hodnot šumu. Po ukončení monitorování byl proveden odběr zbylého množství testovaných roztoků z vrchního kompartmentu Franzovy cely. Odebrané vzorky byly opět spektrofotometricky proměřeny a porovnány se standardy z kalibrační křivky. Poměry vzorků a standardů byly velmi podobné, takže můžeme tvrdit, že STRAT–M membrána je pro sulisobenzon opravdu nepropustná. Výsledná koncentrace vzorků získaná ze vzorce: $c(vz)=A(vz)*c(st)/A(st)$ je u 5% PG 1,03 mM a u 10% PG 0,93 mM.

5.3 Diskuze

5.3.1 Porovnání testovaných roztoků ve vodném médiu



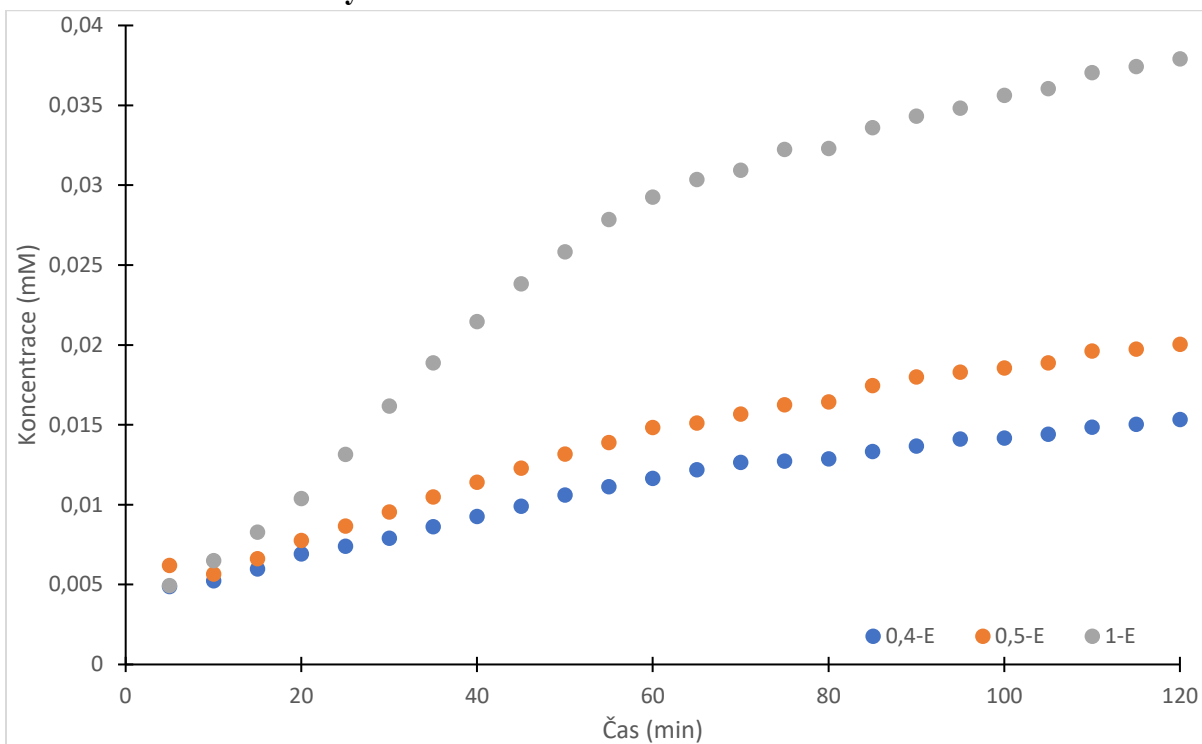
Obrázek 43 Porovnání testovaných roztoků ve vodném médiu

Tabulka 24 Porovnání liberace sulisobenzonu z vodných roztoků

koncentrace testovaného roztoku (mM)	Rozpouštědlo	koncentrace po 2 hod (mM)	procentuální prostupnost po 2 hod (%)
0,2	Voda	0,012	96
0,3	Voda	0,016	85
0,4	Voda	0,020	80
0,5	Voda	0,022	70
1	Voda	0,033	53

U všech testovaných roztoků roste propuštěná koncentrace s přibývajícím časem monitorování. PC membrána je procentuálně více propustnější, čím jsou výchozí koncentrací testovaných roztoků nižší. U 0,2 mM koncentrace je propustná z 96%. U 0,3 mM koncentrace je propustná z 85%. U 0,4 mM koncentrace je propustná z 80%. U 0,5 mM koncentrace je propustná z 70% a u 1 mM koncentrace je propustná z 53%. Platí zde tedy nepřímá úměra mezi propustností membrány a koncentrací testovaných roztoků.

5.3.2 Porovnání testovaných roztoků v 10% ethanolu



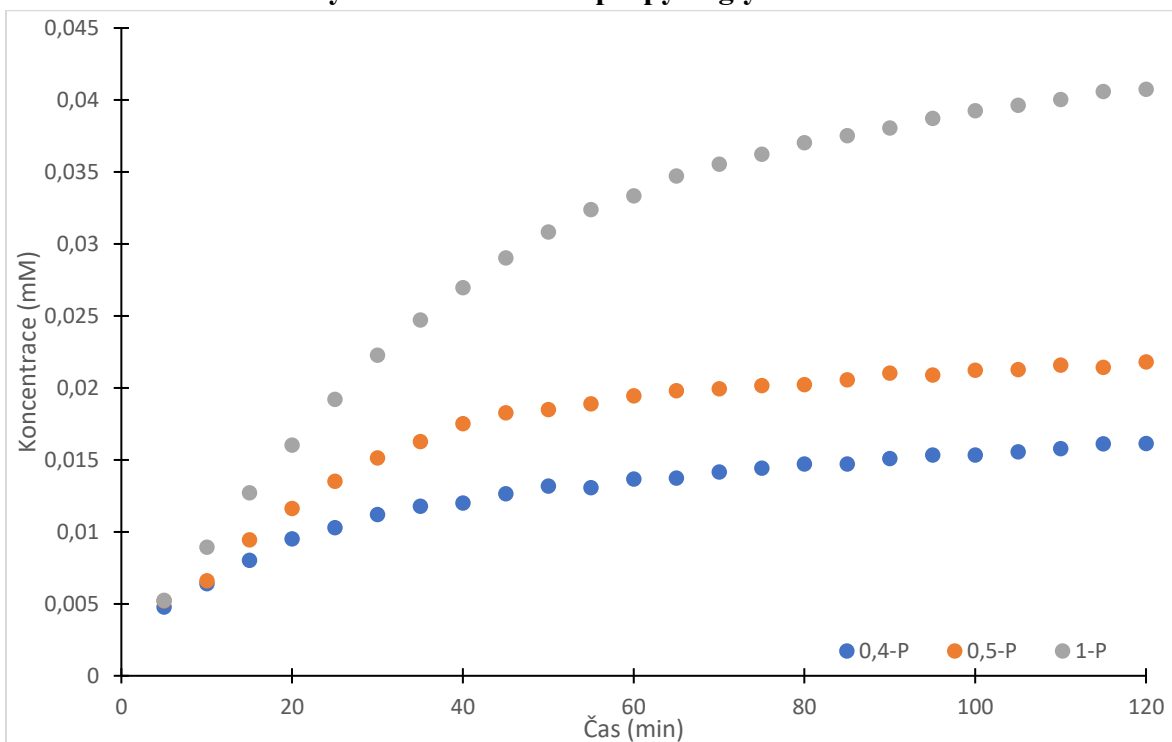
Obrázek 44 Porovnání testovaných roztoků v 10% ethanolu

Tabulka 25 Porovnání liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu

koncentrace testovaného roztoku (mM)	rozpuštědlo	koncentrace po 2 hod (mM)	procentuální prostupnost po 2 hod (%)
0,4	10% EtOH	0,015	60
0,5	10% EtOH	0,020	64
1	10% EtOH	0,038	61

U všech testovaných roztoků rozpuštěných v 10% EtOH roste propuštěná koncentrace s rostoucím časem měření. 1 mM vzorek navíc má o dost větší nárůst koncentrace v průběhu měření na rozdíl od 0,4 mM a 0,5 mM koncentrace. PC membrána je procentuálně propustná pro všechny 3 koncentrace velmi podobně. U 0,4 mM koncentrace je propustná z 60%. U 0,5 mM koncentrace je propustná z 64% a u 1 mM koncentrace je propustná z 61%. Zdá se, že propustnost membrány je 10% EtOH ovlivněna, jelikož procentuálně jsou koncentrace o dost nižší u 0,4 a 0,5 mM koncentrace než při použití superčisté vody jako rozpuštědla. U 1 mM koncentrace je ale výsledná koncentrace vyšší než u 1 mM roztoku rozpuštěného v superčisté vodě.

5.3.3 Porovnání testovaných roztoků v 10% propylenglykolu



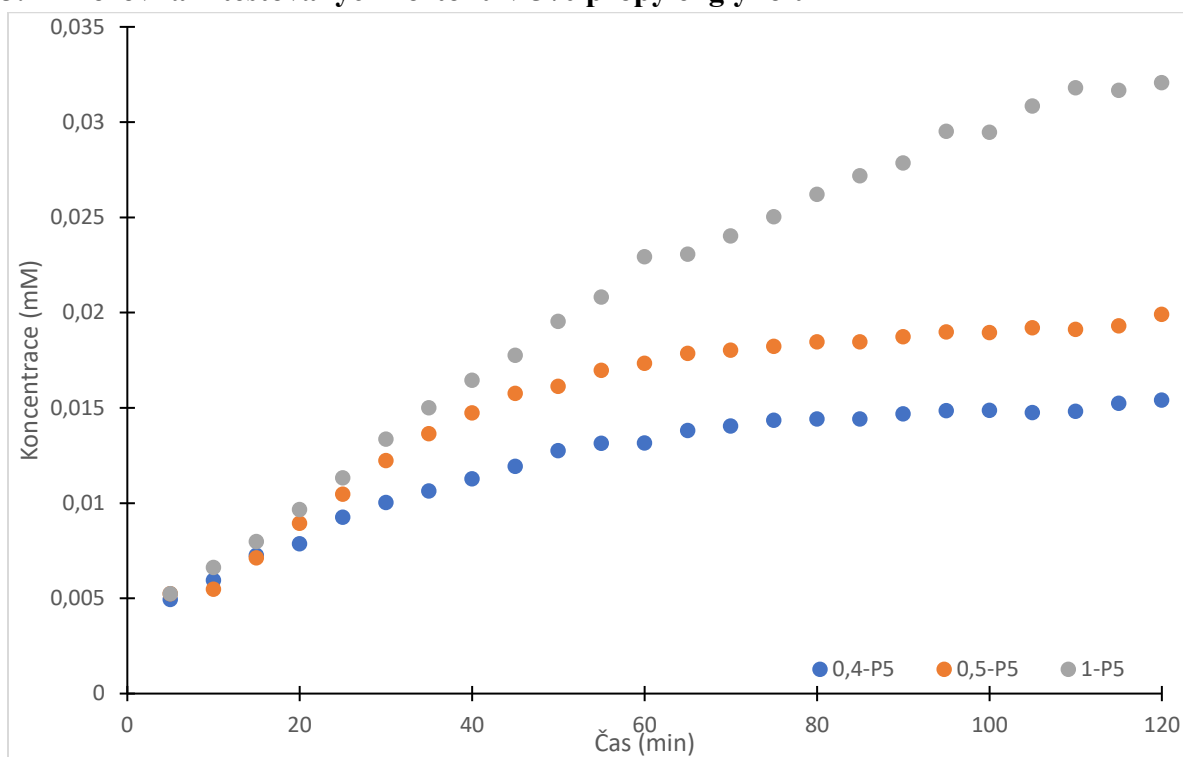
Obrázek 45 Porovnání testovaných roztoků v 10% propylenglykolu

Tabulka 26 Porovnání liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu

koncentrace testovaného roztoku (mM)	rozpuštědlo	koncentrace po 2 hod (mM)	procentuální propustnost po 2 hod (%)
0,4	10% PG	0,016	64
0,5	10% PG	0,022	70
1	10% PG	0,041	66

U všech testovaných roztoků rozpuštěných v 10% PG roste propuštěná koncentrace s rostoucím časem měření. Všechny testované vzorky rostou velmi podobně v závislosti na své výchozí koncentraci. PC membrána je procentuálně propustná pro všechny 3 koncentrace velmi podobně, stejně jako u 10% EtOH. U 0,4 mM koncentrace je propustná z 64%. U 0,5 mM koncentrace je propustná z 70% a u 1 mM koncentrace je propustná z 66%. Zdá se, že propustnost membrány je 10% PG ovlivněna. Podobnost s 10% EtOH můžeme nalézt v tom, kdy 0,5 mM koncentrace poskytuje nejvyšší propustnost membrány, po ní následuje 1 mM koncentrace a nejméně propustnou koncentrací se stává 0,4 mM. Hodnoty výsledných koncentrací jsou nicméně vyšší než u 10% EtOH. 0,4 mM koncentrace má nižší procentuální propustnost (o 16%) než 0,4 mM koncentrace rozpuštěná v superčisté vodě. 0,5 mM koncentrace je procentuálně stejně propustná jako 0,5 mM koncentrace rozpuštěná v superčisté vodě. 1 mM koncentrace má o 13 % vyšší procentuální propustnost než při použití superčisté vody jako rozpouštědla.

5.3.4 Porovnání testovaných roztoků v 5% propylenglykolu



Obrázek 46 Porovnání testovaných roztoků v 5% propylenglykolu

Tabulka 27 Porovnání liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu

koncentrace testovaného roztoku (mM)	rozpuštědlo	koncentrace po 2 hod (mM)	procentuální prostupnost po 2 hod (%)
0,4	5% PG	0,015	60
0,5	5% PG	0,020	64
1	5% PG	0,032	51

U všech testovaných roztoků rozpuštěných v 5% PG roste propuštěná koncentrace s přibývajícím časem měření. Všechny testované vzorky rostou velmi podobně v závislosti na své výchozí koncentraci. U 1 mM koncentrace jsou vidět nepravidelnosti v nárůstu koncentrace, a to především okolo 60, 90 a 110 minut. PC membrána je propustná pro všechny 3 testované koncentrace. U 0,4 mM koncentrace je propustná z 60%. U 0,5 mM koncentrace je propustná z 64% a u 1 mM koncentrace je propustná z 51%. Propustnost membrány je PG výrazně ovlivněna i při nižší koncentraci rozpuštědla. V porovnání s ostatními testovanými koncentracemi je zde zarážející především 1 mM koncentrace. Ta je v 5% PG propuštěna přes membránu pouze z 51%, což je nejmenší propuštěná hodnota ze všech měření vůbec. Další zajímavostí je, že 0,4 i 0,5 mM koncentrace se procentuální permeabilitou shodují s procentuální prostupností 0,4 a 0,5 mM koncentrací v 10% EtOH.

6. Závěr

V této diplomové práci byly sledovány liberační profily sulisobenzonu, které byly naměřeny pomocí systému SIA a UV – VIS detektoru. Sulisobenzon byl testován v několika koncentracích rozpuštěných v několika rozpouštědlech testovaných jako urychlovače liberace – voda, 10% ethanol, 10% propylenglykol, 5% propylenglykol.

Cílem práce bylo ověřit, zda vůbec bude sulisobenzon z testovaných roztoků procházet přes polykarbonátovou či STRAT – M membránu. Vzhledem k tomu, že přes polykarbonátovou membránu, která představuje pouze minimální liberační bariéru, se uvolňoval sulisobenzon ze všech testovaných roztoků, tak následným cílem bylo porovnat jednotlivé liberační profily a zjistit, jak koncentrace roztoků a typ rozpouštědla hrají velkou roli v rychlosti průchodu přes membránu a jak ovlivňují liberační profil a výslednou koncentraci sulisobenzonu v dolním kompartmentu Franzovy cely. STRAT – M membrána (model lidské kůže) byla pro všechny testované roztoky nepropustná.

Závěrem lze říci, že výsledné liberační profily jsou velmi podobné a ve všech je viditelná přímá úměrnost mezi koncentrací uvolněného sulisobenzonu a dobou měření. Nejvyšší propustnost membrány je patrná u 0,2 mM koncentrace rozpuštěné ve vodě (96%). Nejnižší propustnost membrány je zachycena u 1 mM koncentrace rozpuštěné v 5% PG (51%). V diplomové práci jsou zachyceny i různé odlišnosti jednotlivých koncentrací testovaných roztoků. Například u koncentrací 0,4 mM a 0,5 mM, které byly rozpuštěny v 5% propylenglykolu můžeme vidět, že maximální koncentrace je dosaženo již 30 min před koncem liberačního testu. Dřívějšího dosažení maximální koncentrace, než na konci dvouhodinového měření si můžeme všimnout i u 0,5 mM roztoku sulisobenzonu rozpuštěného v 10% propylenglykolu. U všech liberačních profilů můžeme vidět odchylky v jednotlivých měřeních, které byly nejspíše způsobeny rozdílnými rozpouštědly, která byla použita k přípravě testovaných roztoků. Největší odchylky v jednotlivých měřeních jsou patrné u 10% ethanolu.

STRAT – M membrána byla pro roztoky sulisobenzonu rozpuštěných v 5% a 10% propylenglykolu, který byl testován jako potenciálně efektivní urychlovač liberace sulisobenzonu, nepropustná. Naměřené koncentrace byly po dobu 2 hod liberačního testu na úrovni šumu. Při zpětném odebrání vzorku z povrchu STRAT – M membrány bylo ověřeno, že roztok zůstal na povrchu membrány v téměř nepozměněné koncentraci, což znamená, že sulisobenzon v běžných podmínkách neprostupuje kůží a působí pouze jako UV ochrana na jejím povrchu.

7. Seznam použité literatury

- [1] RUZICKA, J., MARSHALL, G. Flow Injection Tutorial, <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20Programming.html> (20.2.2023)
- [2] U.S. Food and drug administration – sulisobenzone, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=352.50> (6.3.2023)
- [3] Allergy to benzophenone, <https://dermnetnz.org/topics/allergy-to-benzophenone> (6.3.2023)
- [4] MORITA, H., ABE, I., NOGUCHI, H. Plant type III PKS. In: Comprehensive natural products ii: chemistry and biology. Elsevier Ltd, 2010. p. 171-225.
- [5] SCHNEIDROVÁ, M. Automatizace liberačních testů pro uvolňování biologicky aktivních látek z nanovláken. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2020.
- [6] ERNEST, R. Monitorování liberačních testů pro uvolňování klotrimazolu z nanovláken. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2021.
- [7] MUKAŘOVSKÁ, S. Automatizace liberačních testů pro uvolnění klotrimazolu z různě sycených polymerních nanovláken. Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, 2022.
- [8] KURUL, E., HEKIMOĞLU, S. Skin permeation of two different benzophenone derivatives from various vehicles. International journal of cosmetic science, 2001, 23.4: 211-218.
- [9] Fyzikálně-chemické vlastnosti sulisobenzonu <https://go.drugbank.com/drugs/DB11185> (6.3.2023)
- [10] Benzophenone <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzophenone> (6.3.2023)
- [11] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 3102, Benzophenone. Retrieved March 3, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzophenone>.
- [12] <https://www.medchemexpress.com/Sulisobenzone.html> (20.2.2023)
- [13] SEMONES, M. C., et al. Photodegradation of UV filters oxybenzone and sulisobenzone in wastewater effluent and by dissolved organic matter. Applied Geochemistry, 2017, 83: 150-157.
- [14] COLÁS-RUIZ, N. R., et al. Multi-omic approach to evaluate the response of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) exposed to the UV filter sulisobenzone. Science of the Total Environment, 2022, 803: 150080.
- [15] KIM, D.-H., et al. Comprehensive investigation of persistent and mobile chemicals and per- and polyfluoroalkyl substances in urine of Flemish adolescents using a suspect screening approach. Environmental Pollution, 2022, 312: 119972.
- [16] BRATKOVICS, S., et al. Baseline monitoring of organic sunscreen compounds along South Carolina's coastal marine environment. Marine Pollution Bulletin, 2015, 101.1: 370-377.

- [17] DO, T. K. T., et al. Development of the first universal mixture for use in system suitability tests for high-performance thin layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1638: 461830.
- [18] ISSA, S., MOSTAFA, A. M. A., AUDA, S. H. Radio-protective properties of some sunblock agents against ionizing radiation. *Progress in Nuclear Energy*, 2018, 107: 184-192.
- [19] SCHMID, M., et al. Applicability of the Universal Mixture for describing system suitability and quality of analytical data in routine normal phase High Performance Thin Layer Chromatography methods. *Journal of Chromatography A*, 2022, 1666: 462863.
- [20] Application Note: Strat-M[®] Membranes and Sunscreen Substituting Strat-M[®] membrane for human skin in evaluating effect of encapsulation on diffusion on sunscreen formulations, Merck Millipore, https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Strat-M-Membrane-Transdermal-Diffusion-Test-Model-47mm,MM_NF-SKBM04760?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_BRO (6.3.2023)
- [21] Merck Millipore, https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Strat-M-Membrane-Transdermal-Diffusion-Test-Model-47mm,MM_NF-SKBM04760?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_BRO (6.3.2023)
- [22] ZAGATTO, E.A.G., VIDA, A.C.F., WORSFOLD, P.J. Flow Analysis: Overview☆. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering [online]. Elsevier, 2016, 2016. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12202-4
- [23] KLIMUNDOVÁ, J. Aplikace sekvenční injekční analýzy ve farmaceutické analýze. Hradec Králové, 2006. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Solich, P.
- [24] SKLENÁŘOVÁ, H. Automatizace-terminologie, průtokové techniky prezentace k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (12.3.2023)
- [25] SKLENÁŘOVÁ, H. Neseparační průtokové metody česky přednáška k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové (8.3.2023)
- [26] PASEKOVA, H., POLASEK, M., SOLICH, P. Sequential injection analysis. *Chemické listy*, 1999, 93.6.
- [27] LAIWATTANAPAISAL, W., et al. Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria. *Talanta*, 2009, 79.4: 1104-1110.
- [28] ŠATÍNSKÝ, D., et al. Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets. *Journal of Separation Science*, 2004, 27.7-8: 529-536.

- [29] DURÁN, A., et al. Virtual instrument for an automated potentiometric e-tongue employing the SIA technique. *Sensors*, 2005, 6.1: 19-29.
- [30] TÓTH, I. V., SEGUNDO, M. A., RANGEL, A. OSS. Food, beverages and agricultural applications. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 2008. p. 513-558.
- [31] TODA, K., DASGUPTA, P. K. Environmental Applications: Atmospheric Trace Gas Analyses. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 2008. p. 639-683.
- [32] WORSFOLD, P. J., MCKELVIE, I. D., HANRAHAN, G. Environmental applications: Waters, sediments and soils. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 2008. p. 685-760.
- [33] Český lékopis 2017, GRADA Publishing a.s., kapitola 2.9.4 zkouška disoluce transdermálních přípravků, str. 380.
- [34] UCHIDA, T., et al. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 67: 113-118.
- [35] HAQ, A., et al. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International journal of pharmaceutics*, 2018, 539.1-2: 58-64.
- [36] SOLICH, P., SKLENÁŘOVÁ, H., HUCLOVÁ, J., ŠATÍNSKÝ, D., SCHAEFFER, U.F. Fully automated drug liberation apparatus for semisolid preparations based on sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 499 (2003) 9–16.
- [37] KLIMUNDOVÁ, J., MERVARTOVÁ, K., SKLENÁŘOVÁ, H., SOLICH, P., POLÁŠEK, M. Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation. *Analytica Chimica Acta* 2006, 573–574, 366–370.

8. Přílohy

8.1 Program k promytí systému před monitorováním

'1 waste
'2 solution
'3 carrier
'4solution
'5-7 solutions
'8 detector

Loop Start (#) 2

Multiposition Valve port 7
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000
Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve port 3
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 2000
Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve port 4
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000
Syringe Pump Delay Until Done

Multiposition Valve port 8
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Dispense (microliter) 4000
Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

8.2 Program pro monitorování liberace sulisobenzonu

'1 waste

'2 solution

'3 carrier

'4 solution

'5-7 solutions

'8 detector

Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 280

Hardware Settings Wavelength 4 (nm) 400

Hardware Settings Use Wavelength 4 as Reference

Loop Start (#) 24

'Washing port

Multiposition Valve port 3

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate (microliter) 400

Syringe Pump Delay Until Done

'Aspiration of sample

Multiposition Valve port 2

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate (microliter) 50

Syringe Pump Delay Until Done

'Discharge to waste

Multiposition Valve port 1

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Dispense (microliter) 500

Syringe Pump Delay Until Done

'Fill syringe pump partly

Multiposition Valve port 3

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate (microliter) 650

Syringe Pump Delay Until Done

Sample Description

'Aspiration of sample

Multiposition Valve port 2

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Aspirate (microliter) 50 '***

Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 1

'Push solution towards detection cell

Multiposition Valve port 8
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30 '***
Syringe Pump Dispense (microliter) 700

'Start measuring

Delay (sec) 1
Spectrometer Reference Scan
Spectrometer Absorbance Scanning
Analyte New Sample
Analyte Name sulisobenzon
Delay (sec) 20
Syringe Pump Delay Until Done
Spectrometer Stop Scanning

'Fill syringe pump partly

Multiposition Valve port 3
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 650
Syringe Pump Delay Until Done
Sample Description

'Aspiration of sample

Multiposition Valve port 2
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 50 '***
Syringe Pump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Push solution towards detection cell

Multiposition Valve port 8
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30 '***
Syringe Pump Dispense (microliter) 700

'Start measuring

Delay (sec) 1
Spectrometer Reference Scan
Spectrometer Absorbance Scanning
Analyte New Sample
Analyte Name sulisobenzon
Delay (sec) 20
Syringe Pump Delay Until Done
Spectrometer Stop Scanning

'Filling back the port

Multiposition Valve port 3
Syringe Pump Aspirate (microliter) 500
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 4
Syringe Pump Aspirate (microliter) 300
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 2
Syringe Pump Dispense (microliter) 200
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Dispense (microliter) 600
Syringe Pump Delay Until Done

Delay (sec) 56

Multiposition Valve port 1
Syringe Pump Empty
Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

8.3 Program pro spektrofotometrické měření kalibrace sulisobenzonu

'1 waste

'2 solution

'3 carrier

'4 solution

'5-7 solutions

'8 detector

Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 280

Hardware Settings Wavelength 4 (nm) 400

Hardware Settings Use Wavelength 4 as Reference

Loop Start (#) 3

'Aspiration of sample

Multiposition Valve port 3
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000
Syringe Pump Delay Until Done
Multiposition Valve port 7
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60
Syringe Pump Delay Until Done
Syringe Pump Aspirate (microliter) 50 '***
Syringe Pump Delay Until Done

'Push solution towards detection cell

Multiposition Valve port 8
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30 '***
Syringe Pump Empty

'Start measuring

Spectrometer Reference Scan
Spectrometer Absorbance Scanning
Analyte New Sample
Analyte Name kalibracka
Delay (sec) 20
Syringe Pump Delay Until Done
Spectrometer Stop Scanning

Loop End

9. Seznam obrázků

Obrázek 1 Vzorec sulisobenzonu [12]	11
Obrázek 2 Jednotlivé principy systému SIA [1]	17
Obrázek 3 Schéma SIA systému [25]	18
Obrázek 4 Franzova cela s držákem.....	19
Obrázek 5 Strat – M membrána	20
Obrázek 6 Porovnání propustnosti oktokrylenu přes STRAT – M membránu a lidskou kůži [20]	20
Obrázek 7 Systém SIA	24
Obrázek 8 Polykarbonátová membrána	25
Obrázek 9 Schéma použitého SIA systému	26
Obrázek 10 Záznam měření	27
Obrázek 11 Závislost absorbance na koncentraci sulisobenzonu ve vodném prostředí.....	29
Obrázek 12 Závislost absorbance na koncentraci sulisobenzonu v tlumivém roztoku o pH 7,4 ...	30
Obrázek 13 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM	33
Obrázek 14 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM	34
Obrázek 15 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,3 mM	36
Obrázek 16 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,3 mM	36
Obrázek 17 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,4 mM	38
Obrázek 18 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,4 mM	38
Obrázek 19 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,5 mM	40
Obrázek 20 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,5 mM	40
Obrázek 21 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 1 mM	42
Obrázek 22 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 1 mM	42
Obrázek 23 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,4 mM	44
Obrázek 24 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,4 mM	44
Obrázek 25 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,5 mM	46
Obrázek 26 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 0,5 mM	46
Obrázek 27 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 1 mM ...	48

Obrázek 28 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% ethanolu při koncentraci 1 mM	48
Obrázek 29 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM	50
Obrázek 30 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM.....	50
Obrázek 31 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM	52
Obrázek 32 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM.....	52
Obrázek 33 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 1 mM	54
Obrázek 34 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 1 mM.....	54
Obrázek 35 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM	56
Obrázek 36 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,4 mM	56
Obrázek 37 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM	58
Obrázek 38 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 0,5 mM	58
Obrázek 39 Jednotlivé liberační profily sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 1 mM	60
Obrázek 40 Směrodatné odchylky při liberaci sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 1 mM	60
Obrázek 41 Liberační profil sulisobenzonu v 5% propylenglykolu při koncentraci 1 mM na STRAT – M membráně	61
Obrázek 42 Liberační profil sulisobenzonu v 10% propylenglykolu při koncentraci 1 mM na STRAT – M membráně.....	62
Obrázek 43 Porovnání testovaných roztoků ve vodném médiu	63
Obrázek 44 Porovnání testovaných roztoků v 10% ethanolu.....	64
Obrázek 45 Porovnání testovaných roztoků v 10% propylenglykolu.....	65
Obrázek 46 Porovnání testovaných roztoků v 5% propylenglykolu.....	66

10. Seznam tabulek

Tabulka 1 Fyzikálně chemické vlastnosti sulisobenzonu	11
Tabulka 2 Výsledky rešerše dříve publikovaných prací o stanovení sulisobenzonu a jeho účincích	13
Tabulka 3 Příprava vodných standardních roztoků sulisobenzonu	22
Tabulka 4 Parametry měření v systému SIA	23
Tabulka 5 Kalibrace ve vodném roztoku	28
Tabulka 6 Kalibrace v tlumivém roztoku o pH 7,4	29
Tabulka 7 Podmínky liberace sulisobenzonu	30
Tabulka 8 Výsledky prvního testu liberace sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM	31
Tabulka 9 Výsledky druhého testu liberace sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM	32
Tabulka 10 Výsledky třetího testu liberace sulisobenzonu ve vodném médiu při koncentraci 0,2 mM	32
Tabulka 11 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,3 mM	35
Tabulka 12 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,4 mM	37
Tabulka 13 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 0,5 mM	39
Tabulka 14 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu z vodného roztoku o koncentraci 1 mM	41
Tabulka 15 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu o koncentraci 0,4 mM	43
Tabulka 16 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu o koncentraci 0,5 mM	45
Tabulka 17 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu o koncentraci 1 mM	47
Tabulka 18 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu o koncentraci 0,4 mM	49
Tabulka 19 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu o koncentraci 0,5 mM	51
Tabulka 20 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu o koncentraci 1 mM	53
Tabulka 21 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu o koncentraci 0,4 mM	55
Tabulka 22 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu o koncentraci 0,5 mM	57

Tabulka 23 Souhrn výsledků měření liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu o koncentraci 1 mM	59
Tabulka 24 Porovnání liberace sulisobenzonu z vodných roztoků	63
Tabulka 25 Porovnání liberace sulisobenzonu v 10% ethanolu.....	64
Tabulka 26 Porovnání liberace sulisobenzonu v 10% propylenglykolu	65
Tabulka 27 Porovnání liberace sulisobenzonu v 5% propylenglykolu	66