

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2022

Soňa Cabalová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VLASTNOSTI AKTIVNÍCH LÁTEK NA BÁZI
KONOPNÉHO OLEJE**

PROPERTIES OF ACTIVE SUBSTANCES BASED ON HEMP OIL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Soňa Cabalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hurčíková, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1648/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Soňa Cabalová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hurčíková, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vlastnosti aktivních látek na bázi konopného oleje

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na dané téma.
2. Simulace prostupu aktivních látek do kůže pomocí Francových cel a Strat–M membrán.
3. Analýza množství prošlé aktivní látky.
4. Vyhodnocení výsledků analýz a porovnání výsledků pro různé druhy emulzí.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Soňa Cabalová
studentka

Ing. Andrea Hurčíková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom bakalárskej práce bolo skúmanie transdermálneho uvoľňovania kanabidiolu a bakuchiolu ako aktívnych látok zo štyroch rôznych prostredí. Bola použitá metóda transdermálnej difúzie pomocou Franzových ciel s využitím syntetickej membrány Strat-M[®]. HPLC bola vybratá ako vhodná metóda na analýzu množstva uvoľnených aktívnych látok zo všetkých prostredí. Doplňujúcou metódou bolo stanovenie stability jednotlivých prostredí pomocou analytickej odstredivky LUMISizer[®]. Výsledkom práce je zistenie najstabilnejšieho prostredia pre aktívne látky a návrhy optimalizácie metód HPLC a transdermálnej difúzie.

ABSTRACT

The aim of bachelor thesis was to examine transdermal release of cannabidiol and bakuchiol from four different medias. Transdermal diffusion was practiced on Franz cells with the use of a synthetic membrane Strat-M[®]. HPLC was used as a suitable method for analysing quantity of released cannabidiol and bakuchiol from all used medias. As an additional method, stability of each medium was measured via analytical centrifuge LUMISizer[®]. Results of the thesis provide data of the most stable medium for cannabidiol and bakuchiol, as well as recommendations for optimalization of HPLC and transdermal diffusion.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Transdermálna difúzia, kanabidiol, bakuchiol, Franzova cela, Strat-M[®] membrána, HPLC, stabilita, analytická odstredivka LUMISizer[®]

KEYWORDS

Transdermal diffusion, cannabidiol, bakuchiol. Franz cell, Strat-M[®] membrane, HPLC, stability, analytical centrifuge LUMISizer[®]

CITÁCIE

CABALOVÁ, Soňa. *Vlastnosti aktivních látek na bázi konopného oleje*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139229>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Hurčíková.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
Soňa Cabalová

POĎAKOVANIE

Vďaka patrí vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Andrei Hurčíkovej, Ph.D., za trpezlivosť a cennú pomoc nielen počas experimentálnej časti, ale aj pri spracovávaní výsledkov. Ďalej by som sa chcela poďakovať Ing. Jaromírovi Pořízkovi, Ph.D. za poskytnutie možnosti analýzy metódou HPLC a za jeho rady pri spracovávaní. Moja vďaka patrí aj slečne Bc. Karolíne Horákovéj za vynaložený čas a pomoc pri realizácii experimentálnej časti.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Koža a kožný transport.....	8
2.2	Endokanabinoidný systém.....	9
2.2.1	Endokanabinoidný systém a ľudská koža.....	10
2.3	CBD full spectrum	10
2.4	Disperzné sústavy.....	11
2.4.1	Emulzia a jej typy	11
2.4.2	Vznik a stabilita emulzií	12
2.5	Analytická odstredivka LUMISizer	13
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	14
3.1	Používanie kanabinoidov v kozmetickom priemysle.....	14
3.1.1	Asyntra© CBD-Alt.....	14
3.2	In vitro testovanie transdermálnej absorpcie.....	16
3.2.1	Franzova difúzna cela	16
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	18
4.1	Použité chemikálie	18
4.2	Prístroje a pomôcky.....	19
4.3	Príprava disperzií na transdermálnu difúziu.....	20
4.4	Zostavenie difúzneho systému	22
4.5	Odber vzoriek z Franzových ciel	23
4.6	Meranie metódou HPLC	24
4.7	Meranie stability disperzií na analytickej odstredivke LUMISizer	24
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	25
5.1	Difúzne experimenty pomocou Franzových ciel	25
5.2	Meranie metódou HPLC	25
5.3	Návrhy optimalizácie transdermálnej difúzie a metódy HPLC	28
5.4	Stanovenie stability analytickej odstredivkou LUMISizer	29
6	ZÁVER.....	43
7	CITÁCIE	44
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	51
9	PRÍLOHY	52

1 ÚVOD

Konope siate bolo už v dávnych dobách používané nielen vďaka psychotropným vlastnostiam THC, ktoré sa v tejto rastline nachádza, ale aj ako stavebný alebo odevný materiál. V modernej dobe sme k týmto využitiam pridali aj klinický a terapeutický potenciál. Momentálne prebieha množstvo výskumov využitia kanabinoidných látok a ich previazanie s ľudským organizmom. Veľkým prelomom bolo objavenie endokanabinoidného systému v ľudskom tele a jeho účinky na organizmus. Jedným z potenciálne dôležitých prepojení endokanabinoidného systému je s ľudskou kožou. Koža ako najväčší orgán tela je neustále zaťažovaná vonkajšími faktormi. Práve využitie kanabinoidných látok v kozmetickom priemysle umožňuje rozšíriť terapeutické účinky na nielen bežné svrbenie či začervenanie kože, ale aj na klinické stavy ako je dermatitída alebo atopický ekzém.

S používaním kanabinoidných látok je vo všeobecnosti problém, najmä z pohľadu bezpečnosti pre konzumenta. Preto je snaha nielen o zmiernenie legislatívy z hľadiska využitia kanabinoidov, ale aj o alternatívy ku kanabinoidom, ktoré by vedeli ovplyvňovať endokanabinoidný systém. Jednou z najnovších alternatív je Asyntra CBD-Alt, ktorá má predstavovať alternatívu CBD v kozmetickom priemysle.

V spolupráci s nemenovanou firmou je cieľom práce preskúmať pomocou transdermálnej difúzie aké množstvo aktívnych látok, menovite kanabidiolu a bakuchiolu sa uvoľní zo štyroch rôznych prostredí. Všetky štyri prostredia ako aj oleje s aktívnymi látkami, CBD full spectrum a Asyntra CBD-Alt, boli dodané firmou. Ako difúzna aparátúra budú využité Franzové difúzne cely, ktoré sa považujú za štandard pri skúmaní transdermálnej difúzie. Difúzia bude prebiehať cez syntetickú membránu Strat-M[®], ktorá bola vyvinutá, aby simulovala ľudskú kožu pri experimentoch transdermálnej difúzie. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je citlivou metódou, preto je vhodnou voľbou pre analýzu uvoľneného množstva aktívnych látok. Doplňujúcim meraním bude stanovenie stability jednotlivých prostredí aj spolu s aktívnymi látkami.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Koža a kožný transport

Koža predstavuje najväčší orgán tela pokrývajúci 1,7 m² a predstavuje približne 10 % celkovej telesnej hmotnosti priemerného človeka. Primárna funkcia pokožky je poskytnúť bariéru medzi telom a vonkajším prostredím. Táto bariéra chráni pred prenikaním ultrafialového žiarenia, chemikálií, alergénov ako aj pred stratou vlhkosti a telesných živín. Navyše, koža má dôležitý podiel na správnom fungovaní homeostázy a regulácii telesnej teploty. Koža tiež funguje ako dôležitý zmyslový orgán v kontakte s prostredím, snímaním stimulácie vo forme teploty, tlaku a bolesti [1].

Zdravá koža je zložená z troch hlavných častí. Prvou z nich je epidermis, ktorá poskytuje funkciu bariéry, imunitu a UV ochranu. Taktiež predstavuje najvrchnejšiu vrstvu kože a nachádzajú sa v nej tri populácie buniek, a to keratinocyty, melanocyty a Langerhansove bunky. Ako sa keratinocyty stále množia a diferencujú, vytvárajú sa v epidermis tri vrstvy. Jednou z nich je stratum corneum, ktorá slúži ako hlavná funkčná bariéra [2]. Ďalšou časťou kože je dermis. Je najväčším komponentom kože a obsahuje rôzne typy buniek ako fibroblasty, makrofágy a mastocyty. Dermis poskytuje koži elasticitu, ochranu proti mechanickému poškodeniu a napomáha termoregulácii. Poslednú vrstvu predstavuje subcutis, ktorá uskladňuje cievy, nervy a nervové zakončania, potné žľazy [2].

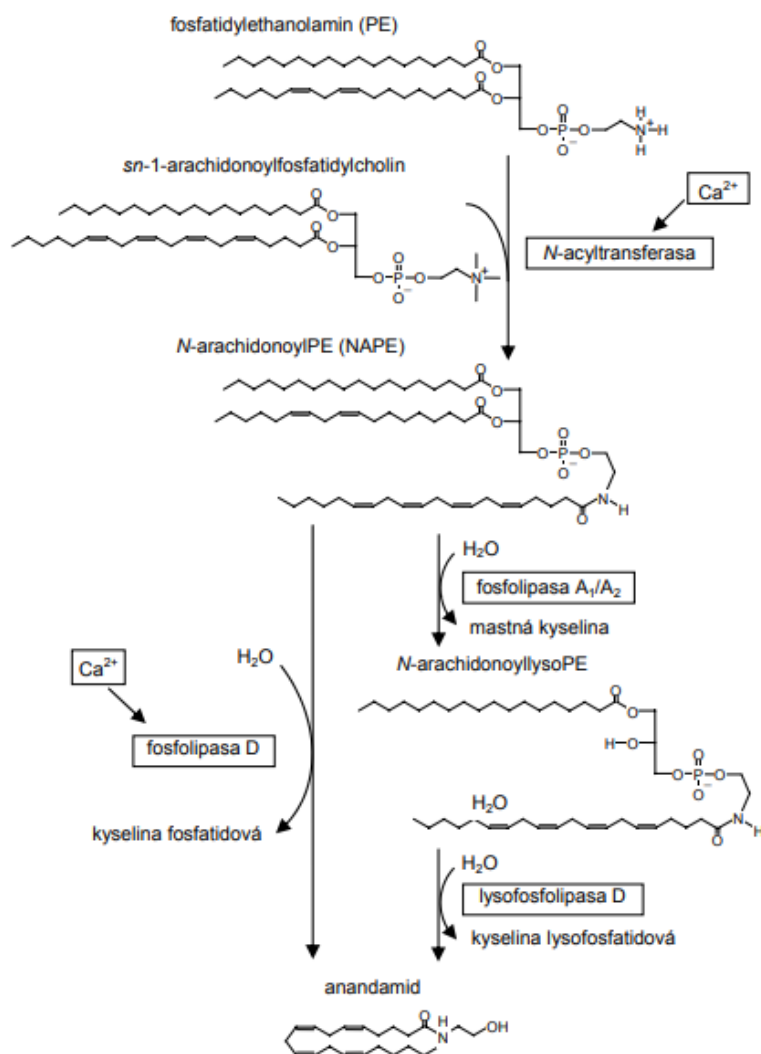
Ochranné vlastnosti epidermis sa považujú za hlavný bod pri obmedzení rýchlosti v procese difúzie aktívnych látok prenikajúcich cez kožu. Transport cez stratum corneum je do značnej miery pasívny proces, a preto sú fyzikálno-chemické vlastnosti prenikajúcej látky dôležitým ukazovateľom jej schopnosti prenikať a difundovať cez membránu. Vo všeobecnosti sú charakterizované tri cesty, ktorými môžu zlúčeniny difundovať cez stratum corneum. Prenikajúce látky teda prechádzajú cez kožu intercelulárne, transcelulárne alebo transapendageálne [3].

Intercelulárna difúzia prebieha okolo a pomedzi bunky a je najbežnejšou transportnou cestou pre hydrofóbne látky, pretože táto cesta zahŕňa rozpúšťanie prenášaných látok v extracelulárnej matrix bohatej na lipidy. Transport týmto spôsobom je však pomalý, pretože látky musia difundovať cez extracelulárnu matrix, ktorá obklopuje husto radené keratinocyty. Pri transcelulárnej difúzii je transport látok uskutočňovaný priamo cez bunky. Transcelulárnu difúziu využívajú najčastejšie hydrofilné látky, pretože difundujú cez cytosol keratinocytov. Difundujúce látky však musia prejsť ako cez lipofilnú bunkovú membránu, tak aj cez extracelulárnu matrix. Preto látky, ktoré majú nízku molekulovú hmotnosť a amfifilný charakter tzn. obsahujú hydrofóbnu aj hydrofilnú časť, sú najúčinnšie transportované transcelulárnou cestou. Transapendageálna cesta síce umožňuje rýchlu difúziu hydrofilných molekúl, ale póry, cez ktoré difúzia prebieha pokrývajú len 0,1 % celého povrchu kože [4]. Preto z hľadiska transportu látky nemá transapendageálna cesta podstatný význam.

2.2 Endokanabinoidný systém

Endokanabinoidný systém tvoria endokanabinoidy a receptory CB₁ a CB₂, ktoré patria do rodiny receptorov spriahnutých s G proteínmi [5]. CB receptory ovplyvňujú expresiu génov a to buď priamo alebo nepriamo. Priamy spôsob zahŕňa aktiváciu mitogén-aktivovaného proteínu kinázy. Nepriamy spôsob je založený na znížení aktivity proteín kinázy A, čo má za následok zníženie aktivity adenylátcyklázy [6]. Adenylátcykláza je enzým, ktorý syntetizuje cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) z adenosintrifosfátu (ATP) [7].

Receptory CB₁ a CB₂ môžu byť aktivované 3 skupinami ligandov: kanabinoidmi (Δ^9 -THC a v malom množstve kanabiol) a ich syntetické analógy; eikosanoidmi (anandamid a 2-arachidonoylglycerol) a aminoalkylindolmi [8]. Aminoalkylindoly boli vyvinuté ako analógy nesteroidných protizápalových liekov a nemajú žiadnu štruktúrnú podobnosť s kanabinoidmi [9]. Významným eikosanoidom je anandamid. Je to neurotransmitter [10], ktorý je syntetizovaný z lipidových prekursorov prítomných v plazmatickej membráne prostredníctvom enzýmov [11].



Obrázok 1- Biosyntéza anandamidu [14]

Zdá sa, že biosyntéza AEA je indukovaná v neurónoch látkami, ktoré spôsobujú tok katiónov Ca^{2+} do buniek [12]. Akonáhle je AEA uvoľnený do extracelulárneho priestoru, rýchlo podlieha difúzii či membránovým transportom a je primárne eliminovaná intracelulárnou hydrolýzou [11]. Na rozdiel od iných neurotransmiterov ako napríklad dopamín či acetylcholín, sa AEA neukladá do vezikúl, ale je produkovaný, keď je potrebný. To má za následok, že jeho biosyntéza je závislá na prekuzore a Ca^{2+} -citlivej fosfodiesterázy, ktorá podmieňuje konverziu prekuzoru na AEA [13]. Anandamid je hydrolyzovaný na kyselinu arachidonovú a ethanolamin pomocou amidhydrolázy mastných kyselín (FAAH) alebo iných vnútrobunecných amidásových enzýmov [14]. V rámci vzťahu ku kanabinoidným receptorom je AEA agonista, pričom vykazuje nižšiu afinitu k receptoru CB_2 . Afinitu k CB_1 má podobnú s Δ^9 -THC [5].

2.2.1 Endokanabinoidný systém a ľudská koža

Endokanabinoidný systém ovplyvňuje rôzne časti ľudského tela ako kardiovaskulárny systém, opornú sústavu, gastrointestinálny trakt či imunitný systém [15]. V štúdiách sa však spomína aj prepojenie ECS s kožou. Obidva receptory CB_1 aj CB_2 boli pozorované v kožných nervových vláknach, mastocytoch, pokožkových keratinocytoch či vlasových korienkoch [16]. Ich výskyt na koži môže mať vplyv na procesy, ako napríklad množenie a diferenciácia keratinocytov, produkcia kožného mazu, rast vlasov, vnímanie svrbenia a bolesti, odpoveď na zápaly [17]. Práve správne fungovanie kožných procesov chráni pokožku pred neustálymi stresovými faktormi ako alergény, vystavovanie sa UV žiareniu, mikroorganizmy. Pokiaľ je narušená rovnováha patologickými zmenami pokožky, vedie to k rozvoju rôznych klinických stavov ako je atopická dermatitída, akné, ochorenia rastu vlasov či iné kožné choroby [16]. ECS spolu s endokanabinoidmi predstavujú jednu z možností terapie pre ľudí trpiacich kožným ochorením. Agonisti kanabinoidných receptorov by sa mohli použiť na liečbu psoriázy, rakovín kože, dermatitíd. Naopak, antagonisti by našli využitie pri liečbe alopecie, seborey či akné [17].

2.3 CBD full spectrum

Vzhľadom na rôzne interpretácie legislatívy ohľadne konopy siatej *Cannabis sativa* a taktiež množstvo nových konopných produktov, sa vynárajú nejasnosti medzi konopnými a CBD olejmi. V oleji sa budú nachádzať rozdielne chemické zlúčeniny v závislosti od toho, ktorá časť rastliny je extrahovaná. Napríklad, oleje z konopných semienok obsahujú omega-6 a omega-3 mastné kyseliny, pričom sa v nich THC nenachádza vôbec a CBD je možné detegovať len v stopových množstvách. Sú využívané ako doplnky stravy [18].

V kvetoch a listoch sa vyskytujú fytoKANABINOIDY a to hlavne THC, CBD, kanabinol, kanabichromen, kanabigerol a kanabidiolová kyselina [19]. Preto sa oleje extrahované z kvetov a listov označujú ako „full spectrum“ [18]. Konope siate, označované ako „technické konope“ je v Českej republike charakterizované ako odroda, ktorej obsah látok zo skupiny tetrahydrokanabinolov nepresahuje 0,3 % [19].

2.4 Disperzné sústavy

Disperzia (disperzná sústava) je klasifikovaná ako systém, ktorý tvorí spojité disperzné prostredie, v ktorom je rozptýlený vo forme častíc disperzný podiel. Vo väčšine prípadov sú disperzné prostredie a disperzný podiel dve chemicky odlišné látky, avšak nie je to pravidlom. To, ako sa bude daná disperzia správať je určené predovšetkým vlastnosťami disperzného prostredia ako aj disperzného podielu. Jedná sa o interakcie medzi časticami a prostredím, veľkosť i tvar častíc, či rôzne iné vlastnosti, na základe ktorých bola utvorená klasifikácia [20].

Jedno z rozdelení disperzií je podľa veľkosti častíc v prostredí. Pri hrubo disperzných sa priemer častíc pohybuje nad 1 μm . Koloidne disperzné sa nachádzajú v rozmedzí 1 nm až 1 μm . Ako posledné sú analyticky disperzné, ktorých priemer častíc je pod 1 nm.

Podstatnou veličinou využívanou pri označovaní veľkosti častice v prostredí je stupeň disperzity, čo predstavuje obrátenú hodnotu lineárneho rozmeru častice. Čo sa týka určenia veľkosti, to je možné len pri disperziách s časticami rovnako veľkými v celom prostredí – tzv. monodisperzné sústavy. Pri sústavách s rôzne veľkými časticami (polydisperzné sústavy) je potrebné použiť inú metódu ako napríklad rozdeľovaciu funkciu veľkosti častíc [21].

2.4.1 Emulzia a jej typy

Emulzia sa ako disperzný systém vyskytuje voľne v prírode, napríklad mlieko, ktoré je pravdepodobne najstabilnejšou prírodne vytvorenou emulziou. Napriek tomu, nie je známy princíp či mechanizmus ako sú tukové kvapky v mlieku stabilizované [22].

Emulzia je charakterizovaná ako heterogénny systém pozostávajúci z dvoch nemiesiteľných vrstiev, pričom jedna zo zložiek je v tej druhej rozptýlená vo forme kvapiek [23]. Podľa koncentrácie, vykazujú emulzie rôzne mechanické vlastnosti a vnútornú mechaniku. Pokiaľ je emulzia silno zriedená, sú kvapky dispergovaných častíc do veľkej miery ovplyvnené Brownovým pohybom a emulzia má viskózne správanie. Na druhej strane, pri vyšších koncentráciách je vnútorná dynamika emulzie do značnej miery obmedzená a vykazuje viskoelastické správanie [24].

Vo väčšine prípadov je jedna zložka emulzie vodného charakteru a druhá zložka hydrofóbná, založená na báze oleja. Na základe ich pomeru či správania jednotlivých zložiek ich môžeme roztriediť do nasledovných skupín [25].

V/O („voda v oleji“) – kvapky vody sú rozptýlené v olejovej spojitej zložke. Tieto emulzie sú nemiesiteľné s vodou a tým pádom sa nedajú zmyť vodou. V kozmetike sa používajú vo forme krémov, keďže udržiavajú hydratáciu pokožky [23]. Taktiež účinné látky, ktoré sú rozpustné v oleji sú v emulziách typu V/O vstrebávané rýchlejšie [25].

O/V („olej vo vode“) – kvapky oleja sú rozptýlené vo vodnej spojitej zložke. Na rozdiel od emulzií typu V/O, sú emulzie O/V miešateľné vodou a sú aj vodou zmyvateľné [25]. Vďaka väčšiemu podielu vodnej fázy majú lepšiu vodivosť ako emulzie V/O [20]. Pre lepšiu účinnosť liekov, ktoré sú rozpustné vo vode sa používajú práve emulzie typu O/V [25].

2.4.2 Vznik a stabilita emulzií

Vznik emulzií sa nazýva emulgácia. Samovoľný vznik emulzií by sme mohli sledovať v malej miere iba zmiešaním dvoch nemiešateľných kvapalín, pokiaľ by povrchové napätie medzi obidvoma fázami bolo dostatočne malé. Častejšie sa však pri príprave emulzií využíva mechanické dispergovanie. Pre stabilitu sa pridávajú tzv. emulgátory [26], [27].

Emulzie ako termodynamicky nestabilné systémy je potrebné stabilizovať, aby nedošlo k deemulgácii – rozpadu systému na dve pôvodné zložky. Takýto nestabilizovaný systém podlieha agregácii. Tá môže mať viacero podôb, ktoré sa môžu, ale nemusia vyskytovať nezávisle. Väčšina z nich sa, však, objaví spontánne s časom. Medzi typy agregácií patrí krémovanie, sedimentácia, flokulácia, koalescencia, koagulácia a Ostwaldove zrenie [28], [29].

Krémovanie je jav, pri ktorom sa jedna fáza oddelí a zhlukuje sa na povrchu emulzie. Proces je vratný, to znamená, že častice, ktoré sa zhlukujú na povrchu si zanechávajú pôvodný tvar a tak opätovným pretrepaním sa emulzia dostane do dispergovaného stavu. Krémovanie je nežiadúci len z estetického hľadiska, nakoľko nepoškodzuje trvalo štruktúru emulzie. Negatívny dopad krémovania môže mať na vstrebávanie produktu, kedy by účinná látka nemusela byť rovnomerne dispergovaná v emulzii [22].

Sedimentácia je podobný prípad ako krémovanie s tým rozdielom, že pri sedimentácii sa častice zhlukujú a usádzajú na dne nádoby s emulziou. Sedimentácia je tiež len estetický defekt, ktorý sa dá jednoduchým spôsobom napraviť rovnako ako pri krémovaní [28].

Flokulácia závisí na silách, ktoré pôsobia medzi dispergovanými časticami. Pokiaľ sú odpudivé sily medzi časticami slabšie ako príťažlivé, začnú sa vytvárať flokuly. Kvapky sa začnú k sebe priťahovať, zhromažďovať sa do väčších celkov, pričom každá z nich si ponecháva tvar aj veľkosť, vďaka vrstve surfaktantu na povrchu kvapiek [28]. Flokulácia vzniká aj ako následok prebytku surfaktantu v emulzii [25].

Koalescencia vzniká pri spojení dvoch častíc v jednu väčšiu, čo má za následok rozdelenie emulzie na dve samostatné fázy. Na rozdiel od krémovania je proces koalescencie nevratný, pretože kvapky strácajú svoj tvar kvôli narušeniu filmu surfaktantu [28]. Ku koalescencii teda dochádza vtedy, keď je tento film nedostatočný. Pri kontakte dvoch častíc, ktoré sa priblížia na malú vzdialenosť, dochádza k fluktuácii filmu na ich povrchu, a tým pádom sa dosiahne kritickej hrúbky steny filmu, ktorá sa nakoniec pretrhne [29]. Koalescencii môžeme predísť zvýšením viskozity alebo tvorbou silnejšieho povrchového filmu použitím pevných častíc (Pickering emulzia) [28].

Koagulácia je javom, pri ktorom sa vytvárajú kompaktné agregáty, v ktorých sú častice pevne spojené [26].

Ostwaldove zrenie nastáva dôsledkom rozdielnej rozpustnosti väčších a menších kvapiek. Menšie častice sa lepšie rozpúšťajú a difundujú vďaka väčšiemu zakriveniu, ktoré súvisí s voľnou povrchovou energiou. To má za následok postupné miznutie menších kvapiek

z emulzie. Väčšie kvapky tak narastajú na veľkosti práve na úkor menších kvapiek, ktorých rozpustený obsah je koncentrovaný do nich. Tento jav je nežiadúci, pretože väčšie kvapky majú tendenciu ku krémovaniu alebo sedimentácii. Predísť tomuto javu sa dá pomocou surfaktantu, ktorý je adsorpčného alebo polymérneho charakteru. Tým sa spomalí alebo zabráni vstrebávaniu iných molekúl do už existujúcich kvapiek. Ďalšou možnosťou je pridanie látok s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktoré by spomalili difúziu menších častíc [28], [26].

2.5 Analytická odstredivka LUMISizer

Prístroj využíva odstredivú sedimentáciu na urýchlenie výskytu rôznych javov nestability emulzií, ako je sedimentácia, flokulácia alebo krémovanie [30]. Využíva technológiu STEP (Space and Time Extinction Profiles) na priebežnú analýzu stavu u dvanástich vzoriek súčasne. Technológia funguje na princípe presvetlenia celej vzorky pomocou lúčov infračerveného žiarenia, pričom niekoľkotisícové detektory zaznamenávajú intenzitu žiarenia prejdeného cez vzorku pre akúkoľvek polohu a v každom dopredu nastavenom časovom intervale [31].

Výsledkom sú transmitačné profily, ktorých tvar a priebeh obsahujú informácie o kinetike separačného procesu a uľahčuje charakterizáciu častíc. Sledovaním zmien v profile v ktorejkoľvek časti vzorky alebo sledovaním pohybu fázovej hranice je možné porovnávať a analyzovať separačné správanie jednotlivých vzoriek [32].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1 Používanie kanabinoidov v kozmetickom priemysle

Veľký zlom nastal v roku 2021, keď sa Európska únia rozhodla legalizovať použitie CBD v kozmetickom priemysle vo všetkých členských štátoch. Urobila tak na základe procesu Kanavape a taktiež na podnet EIHA (European Industrial Hemp Association) ešte z roku 2019. CBD sa momentálne dá nájsť v CosIng-u (EU Cosmetic Ingredient Database) ako kanabidiol derivovaný z konopného extraktu, tinktúry alebo živice [33].

Napriek legalizovaniu CBD v kozmetike, je stále potrebné byť obozretný v kupovaní produktov s CBD. Podľa FDA (U.S. Food and Drug Administration) zavádzajúce či neoverené informácie od predajcov môžu negatívne ovplyvniť konzumentov. Taktiež sú potrebné častejšie a podrobnejšie kontroly výroby, kvôli zachovaniu kvality a bezpečnosti pre konečného spotrebiteľa. Boli zaznamenané prípady, kedy množstvo kanabinoidov nezodpovedalo uvedenému podielu na obale či sa objavili podozrenia, že produkty obsahovali okrem CBD aj kontaminanty ako ťažké kovy a THC [34].

3.1.1 Asyntra[©] CBD-Alt

Patentovaný firmou Sytheon, bol produkt Asyntra CBD-Alt[©] vytvorený ako alternatíva CBD v kozmetickom priemysle. Je zložený z kombinácie CBD-Alt a HydraSynol[©] DOI (isosorbid dikaprilát), pričom CBD-Alt zahŕňa aktívnu zložku bakuchiol a etyl linoleát v pomere 1:1. Výrobca uvádza, že Asyntra CBD-Alt[©] udržiava hodnoty anandamidu inhibovaním enzymatickej aktivity transportu enzýmu FABP5 a degradáciou enzýmu FAAH. Tým sa anamid okamžite nerozkladá a znižuje hladinu kortizolu, ktorý podporuje zápal. Taktiež posilňuje bariéru pokožky pre viditeľne hladší a hydratovanejší vzhľad.

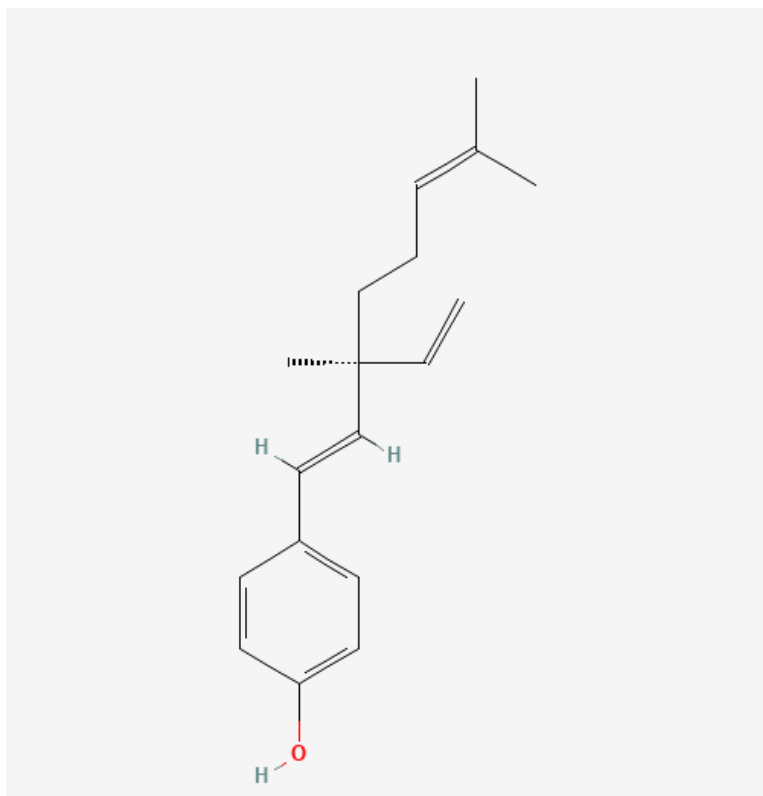
Firma Sytheon poskytuje aj údaje z klinickej štúdie ohľadom účinnosti Asyntry CBD-Alt[©] na verejnosti. Bolo vybratých 70 dobrovoľníkov vo veku 30 až 55 rokov, ktorí trpeli známkami stresu na pokožke, ako suchosť, začervenanie či mdlosť. Štúdia prebiehala počas pandemickej krízy Covid-19 v Spojených štátoch amerických. Dobrovoľníci používali emulziu s 2% obsahom Asyntry CBD-Alt[©] dvakrát denne počas 4 týždňov. Respondenti poskytovali spätnú väzbu v prvý deň užívania, po 7 dňoch a nakoniec v 4 týždni.

Vo výsledku štúdie bolo preukázané, že čo sa týka celkového zlepšenia pokožky počas celej doby, tak 52 % respondentov pociťovalo výrazné zlepšenie, 34 % mierne a 14 % nezaznamenalo žiadnu zmenu. V rámci 4 týždňov bolo pozorované najvýraznejšie zlepšenie v oblasti suchosti pokožky, mdlosti, začervenania, ale aj svrbenia, zväčšených pórov či nerovnomernosti pokožky [35].

Bakuchiol, ako dôležitá zložka Asyntry CBD-Alt[©], sa najčastejšie získava zo semien rastliny *Psoralea corylifolia*, ktorá je hojne využívaná v indickej ako aj čínskej medicíne. Štruktúrne patrí bakuchiol do skupiny meroterpénov [36]. Meroterpény sú zlúčeniny zmiešanej biosyntézy, ide najmä o chinóny a hydrochinóny viazané s terpénovou časťou zloženou z 1 až 9

isoprénových jednotiek. Okrem rastlín, sa meroterpény nachádzajú v morskom ekosystéme. Ako sekundárne metabolity sú izolované najmä z hnedých rias, mäkkých korálov a morských bezstavovcov [37].

Bakuchiol má jedno asymetrické centrum a jeho terpénové a 4-hydroxystyryl skupiny sú zodpovedné za jeho biologickú aktivitu [38].



Obrázok 2 - Chemická štruktúra bakuchiolu [57]

Napriek relatívne odlišnej štruktúre, sa bakuchiol považuje za „analog“ retinolu kvôli ich podobnosti v génovej expresii, najmä podstatných proti starnúcich génov a proteínov [39].

Vystavovanie sa slnečnému žiareniu má za následok predčasné starnutie pokožky. Dochádza nielen k zníženiu počtu melanocytov, ale aj k ich zväčšeniu. Tým sa stáva pokožka tenšia a citlivejšia. K viditeľným zmenám na koži patria vrásky, začervenanie, pigmentové škvrny, zväčšenie pórov či ovisnutie kože. Práve retinoidy, pod ktoré spadá aj retinol, podporujú bunkovú mitózu, stimulujú produkciu kolagénu, regulujú metabolizmus kožných buniek. Preto sa retinoidy používajú v boji proti starnúcej pokožke [40].

Aktívna látka bakuchiol, ktorá je podstatnou zložkou Asyntry CBD-Alt[®] má vďaka svojej podobnosti s retinolom veľké využitie v kozmetickom priemysle. V Asyntri CBD-Alt[®] je to teda práve bakuchiol, ktorý poskytuje terapeutické aj estetické účinky pre kozmetické prípravky. Vďaka jeho účinkom bol preto vybraný ako pozorovaná látka v Asyntri CBD-Alt Asyntry CBD-Alt[®] pomocou transdermálnej difúzie a následne analyzované jeho uvoľnené množstvo.

3.2 In vitro testovanie transdermálnej absorpcie

Metódy in vitro sú navrhnuté tak, aby merali prenikanie látok do pokožky a následnú permeáciu cez pokožku do rezervoáru tekutiny. Využívať sa môže už neživotaschopná koža, pri ktorej sa meria len penetrácia a permeácia alebo metabolicky aktívna koža, pri ktorej prebiehajú simultánne merania permeácie a metabolizmu kože. Experimenty in vitro sú vhodnou simuláciou dermálnej penetrácie človeka. Okrem toho in vitro metódy ponúkajú množstvo výhod oproti experimentom na ľuďoch či zvieratách, vrátane úspory času, nákladov a lepšej reprodukovateľnosti [41].

3.2.1 Franzova difúzna cela

Jednou z najrozšírenejších metód na skúmanie in vitro transdermálnej absorpcie je použitie difúzných ciel. Zvyčajne sa používajú dva typy difúzných ciel a to horizontálne a vertikálne. Franzova cela je horizontálneho typu a v metódach in vitro transdermálnej absorpcie sa využíva najčastejšie. Vo všeobecnosti sa skladá z dvoch častí, receptorová časť, ktorá obsahuje receptorovú tekutinu a donorová časť. Tieto dve časti sú oddelené membránou, ktorá je umiestnená na receptorovú časť. Aby difúzia prebiehala správne, obidve časti sú pevne prichytené svorkami. Cela obsahuje aj otvor na odber vzoriek a plášť, ktorý zabezpečuje udržiavanie teploty receptorovej tekutiny [42].



Obrázok 3 - Franzova difúzna cela

Okrem horizontálnych difúzných ciel, majú v metódach in vitro svoje zastúpenie aj vertikálne difúzne cely. Ich použitie je však bežnejšie pri hodnotení systémov podávania liekov ako je sonoforéza, ionoforéza alebo elektroforácia. Vyžaduje si taktiež ponorenie oboch povrchov membrány, čo by pri použití kožného preparátu spôsobilo jeho nadmernú hydratáciu a poškodenie [43].

Neoddeliteľnou súčasťou difúzneho systému je membrána, cez ktorú samotná difúzia prebieha. Pre Franzove cely sa ako membrány zvyčajne používajú vzorky ľudskej alebo zvieracej kože [44]. Ľudská koža sa považuje ako „zlatý štandard“ vzhľadom na vyhodnotenie uskutočniteľnosti transdermálneho a lokálneho podávania liekov. Avšak, ľudské vzorky je často obtiažne získať, sú drahšie a v neposlednom rade vynárajú na povrch etické otázky ohľadom ich použitia [45]. Preto sa pristupuje k alternatívam predovšetkým k vzorkám z kože bezsrstej myši a prasat'a. Myšacia koža sa využíva pomerne často napriek viacerým nevýhodám ako je jej tenká vrstva stratum corneum a vyššia permeabilita v porovnaní s ľudskou kožou. Vhodnejšou voľbou sa javí prasacia koža, ktorá má z hľadiska permeability a zloženia lipidov najbližšie k ľudskej koži.

V poslednej dobe sa dostáva do popredia použitie ekvivalentov živej kože a epidermálnych ekvivalentov pre štúdie transdermálnej permeácie a in vitro toxicity [46]. Vo všeobecnosti majú nižšiu bariérovú funkciu ako ľudská koža, ale pre hydrofilné látky sú kožné ekvivalenty prijateľnou voľbou pri skúmaní transportu liečiv [47]. Ekvivalenty kože používané pre permeáciu sú typicky epidermálna koža a koža skladajúca sa z epidermálnych aj dermálnych tkanív [48], pričom dermis je tvorená kolagénovou maticou. Epidermálne náhrady sú zložené z listu ľudských keratinocytov, ktoré sú kultivované na rozhraní vzduchu a vody, aby bol zabezpečený správny vývoj a koncová diferenciácia. Voľba ekvivalentov kože má mnoho výhod, vrátane eliminácie pokusov na zvieratách či odoberania vzoriek zo živých tkanív človeka alebo zvierat'a [46].

V neposlednej rade sa do Franzových ciel používajú syntetické membrány, ktoré sú navrhnuté tak, aby napodobňovali ľudskú pokožku a ponúkajú jednoduchú a reprodukovateľnú alternatívu k ľudskej a zvieracej koži. Na rozdiel od biologickej kože sa syntetické membrány dajú jednoducho zaobstaráť a uskladniť [48]. FDA navrhla použitie rôznych polymérnych membrán, ako je polysulfón, polyétersulfón, celulóza a polydimethylsiloxán [49]. Ideálna syntetická membrána na testovanie in vitro by mala byť inertná, nemala by blokovat' prienik liečiva a mala by poskytovať dobrú permeabilitu. Avšak, použitie syntetických membrán namiesto kože nemusí odrážať skutočné prenikanie liečiva, ale len jeho uvoľňovanie [48]. Jednou zo syntetických membrán je Strat-M[®] membrána. Skladá sa z dvoch vrstiev polyétersulfónu, ktoré vytvárajú mierny odpor pre permeáciu látok. Pod týmito vrstvami sa nachádza ďalšia vrstva z polyolefinu, ktorá je naopak voľnejšia a tým cez ňu látky lepšie prechádzajú. Tieto polymérne vrstvy vytvárajú pórovitú štruktúru, ktorá je impregnovaná syntetickými lipidmi. Tie zabezpečujú gradient pórov a difúznosti celej membrány [50]. Lipidy v membráne sú totožné s tými, ktoré sa nachádzajú v stratum corneum, to sú rôzne ceramidy, cholesterol či voľné mastné kyseliny [47].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

Emulzia O/V

Emulzia V/O

Hydrofilný olej

Oleogel

Asyntra CBD

Sytheon Ltd.

CBD full spectrum

Chlorid sodný (> 99,5%)

Sigma-Aldrich s.r.o.

Ultračistá deionizovaná voda

PureLab

Cannabidiol – štandard

Cerilant Corporation

Metanol (100%)

VWR Chemicals

4.2 Prístroje a pomôcky

Plastové uzatvárateľné nádoby	
Špachtľa	
Predvážky	SCALTEC SPB 52
Odmerná banka (1000 ml)	
Analytické váhy	DENVER 224A
Franzove cely (20 ml)	SES GmbH
Strat-M [©] membrána	Merck Millipore Ltd
Magnetické miešadlo	
Vatové tyčinky	
Silikónová pasta	Lučební závody a.s. Kolín
Parafilm	Bemis
Magnetická miešacia doska	Thermo-Scientific
Skúmavky typu Eppendorf	Eppendorf SE
Injekčné striekačky (5 ml a 10 ml)	Becton Dickinson S.A.
Dávkovacie ihly na injekčné striekačky	LUM GmbH
Analytická odstredivka LUMISizer [©]	LUM GmbH
Polykarbonátové kvety do LUMISizer [©]	LUM GmbH
Filtre na injekčné striekačky	Ahlstrom-Munksjö GmbH
Odmerné banky (10 ml)	
Automatická pipeta	Eppendorf SE
Špičky do pipety	Eppendorf SE
Vysokoučinný kvapalinový chromatograf	Waters 2487

4.3 Príprava disperzií na transdermálnu difúziu

Ako prvé bolo potrebné namiešať disperzie s aktívnymi látkami. Emulzia O/W, W/O, pěstící telový olej oleogel ako aj oleje s aktívnymi látkami boli dodané firmou, ktorá sa vzhľadom na utajenie práce neudáva. Zloženie všetkých disperzií vyobrazujú Tabuľka 1, Tabuľka 2, Tabuľka 3 a Príloha 1. Obidva oleje boli jednotlivo zmiešané s každou disperziou v doporučenom pomere. Pre CBD full spectrum bolo doporučené obsahové množstvo 0,5 % z celkovej hmotnosti disperzie a pre Asyntru CBD boli zvolené 4 % z doporučeného rozsahu 2-4 %.

Pre disperzie s CBD bolo na predvážkach odvážených 9,95 g z každej disperzie do štyroch uzatvárateľných plastových nádob. Do každej disperzie bolo následne pridaných 0,05 g oleja CBD full spectrum do celkovej hmotnosti 10,0 g. Zmesi boli dôkladne ručne premiešané špachtľou, aby sa zaistila inkorporácia oleja do disperzie. Obdobný spôsob bol použitý na prípravu disperzií s Asyntrou CBD, pričom bolo na predvážkach odvážených 9,6 g z každej disperzie a pridaných 0,4 g Asyntry CBD.



Obrázok 4 - Zľava: pěstící telový olej, emulzia O/V, emulzia V/O, oleogel; horná rada obsahuje Asyntru CBD-Alt, spodná rada obsahuje CBD full sprectrum

Tabuľka 1 - Zloženie dodanej emulzie V/O

Složka	INCI názov
Demineralizovaná voda	Aqua
Slunečnicový olej	Helianthus Annuus Seed Oil
Máslo karité	Butyrospermum Parkii Butter
Vegelight	Coconut Alkanes
Glycerin	Glycerin
Ovesný olej	Avena Sativa Kernel Oil
Isolan	Polyglyceryl-4 Diisostearate/Polyhydroxystearate/Sebacate
D-Panthenol	Panthenol
Měsíček v oleji	Calendula Officinalis Flower Extract and Helianthus Annuus Seed Oil
Síran hořečnatý	Magnesium Sulfate
Stearát hořečnatý	Magnesium Stearate
Vitamin E	Tocopheryl Acetate and Glycine Soja Oil
Hydrogenovaný ricinový olej	Hydrogenated Castor Oil
Včelí vosk	Cera Alba
Anisát sodný	Sodium Anisate
Levulinát sodný	Sodium Levulinate
Kyselina citronová 30 %	Citric Acid

Tabuľka 2 - Zloženie dodanej emulzie O/V

Složka	INCI názov
Demineralizovaná voda	Aqua
Máslo karité	Butyrospermum Parkii Butter
Sojový olej	Glycine Soja Oil
Glycerin	Glycerin
Skvalan	Squalane
Tego care	Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate
D-Panthenol	Panthenol
Vegelight	Coconut Alkanes
Ovesný olej	Avena Sativa Kernel Oil
Cutina	Glyceryl Stearate
Dermofeel	Sodium Stearoyl Lactylate
Lanette	Cetyl Alcohol
Měsíček v oleji	Calendula Officinalis Flower Extract and Helianthus Annuus Seed Oil
Xanthanová guma	Xanthan Gum
Dermosoft	Glyceryl Caprylate
Vitamin E	Tocopheryl Acetate and Glycine Soja Oil
Vitamin A	Retinyl Palmitate
Anisát sodný	Sodium Anisate
Levulinát sodný	Sodium Levulinate
Kyselina citronová 30 %	Citric Acid

Tabuľka 3 - Zloženie dodaného oleogelu

Složka	INCI názov
Konopný olej	Cannabis Sativa Seed Oil
Slunečnicový olej	Helianthus Annuus Seed Oil
Glycerin	Glycerin
Pupalkový olej	Oenothera Bienis Oil
Laurát sacharózy	Sucrose Laurate
Ovesný olej	Avena Sativa Kernel Oil
Měsíček v oleji	Calendula Officinalis Flower Extract and Helianthus Annuus Seed Oil
Vitamin E	Tocopheryl Acetate and Glycine Soja Oil
D-Panthenol	Panthenol
Palmitát sacharózy	Sucrose Palmitate
Stearát sacharózy	Sucrose Stearate

4.4 Zostavenie difúzneho systému

Franzove cely, ktoré sa používajú na skúmanie prestupu aktívnych látok boli hlavným bodom experimentálnej časti. V celom experimente boli používané tri Franzove cely, pričom bolo dôležité, aby receptorová a donorová časť cely k sebe veľkostne pasovali. Preto boli jednotlivé časti popísané číslami, aby sa dali pri zostavovaní k sebe priradiť.

Dôležitým prvkom pri difúzii vo Franzových celách je receptorová tekutina. Ako receptorová tekutina bol v experimente vybraný fyziologický roztok, aby simuloval vnútorné prostredie človeka. Bolo pripravených 1000 ml 0,15M roztoku NaCl, ktorý predstavoval fyziologický roztok. Tento roztok bol používaný ako receptorová tekutina pre všetky difúzie vo Franzových celách.

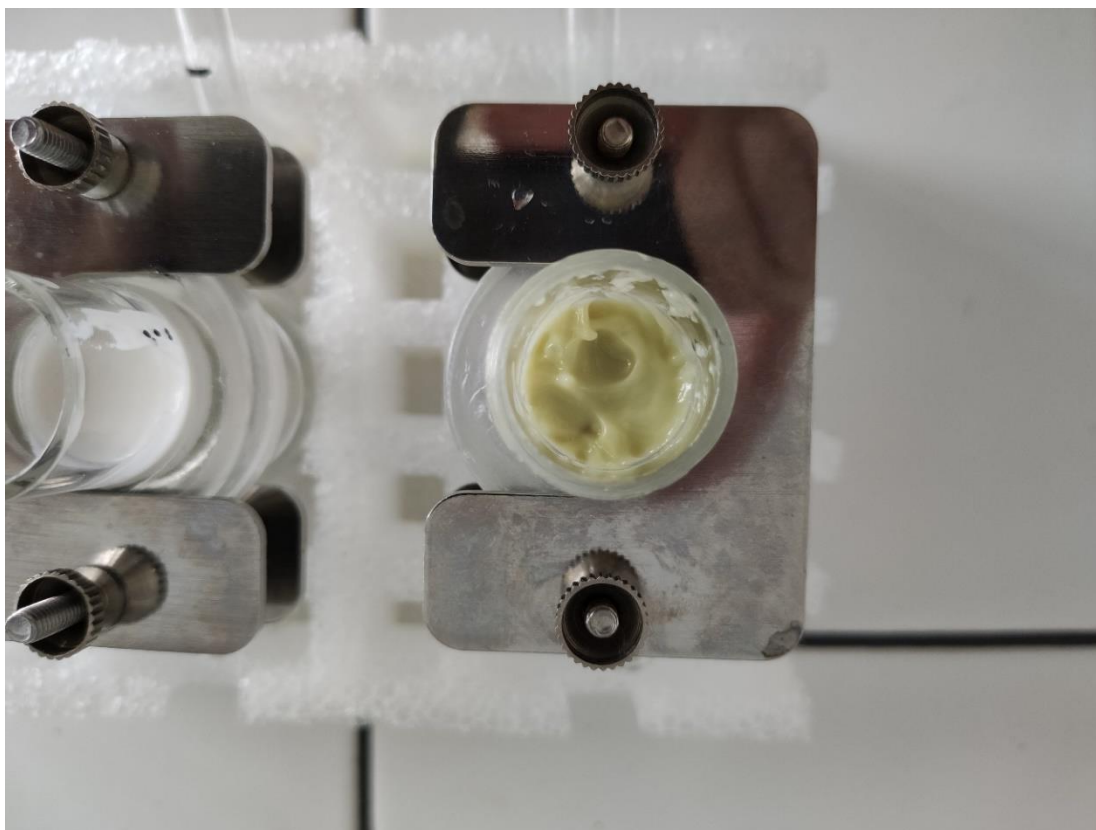
Začiatok práce s celami začal dôkladným umytím a usušením jednotlivých kusov. Do donorovej časti bolo uložené magnetické miešadlo a pridaných 15 ml 0,15M roztoku NaCl automatickou pipetou. Ako ďalší krok bolo natretie styčných plôch donorovej a receptorovej časti cieľ silikónovou pastou. Vatovou tyčinkou bola nanosená pasta na styčné plochy, tak aby keď sa na receptorovú časť uloží membrána, nebude sa dotýkať pasty. Je dôležité, aby tento krok nebol opomenutý, pretože pasta napomáha súdržnosti jednotlivých komponent a zabraňuje pretečeniu vzorky do receptorovej tekutiny.

V ďalšom kroku bola opatrne uložená Strat-M[®] membrána na prijímací otvor receptorovej časti lesklou stranou nahor, pričom je podstatné, aby sa pri uložení nepoškodila či nekontaminovala. Po uložení membrány bola donorová časť spojená s receptorovou časťou postupom, aby sa zamedzilo poškodeniu alebo posunutiu membrány. Po spojení boli časti dodatočne obalené parafilmom a uchopené do svorky.

Nasledujúci krok zahŕňal dopĺňanie 0,15M NaCl do receptorovej časti. Pomocou 10ml injekčnej striekačky s ihlou bolo cez otvor na odber vzoriek pridaných chýbajúcich 5 ml 0,15M NaCl. Pri pokuse je dôležité, aby sa receptorová tekutina úplne dotýkala membrány a difúzia mohla prebiehať správne. Preto sa pri pridávaní posledných 5 ml roztoku cela nakloní,

tak aby bubliny z prijímacieho otvoru prešli k otvoru na odber vzoriek. Tým sa zabezpečí naplnenie celého objemu Franzovej cely.

Posledným krokom bolo nanosenie disperzie s aktívnou látkou na donorovú časť s membránou. Pred každým dávkovaním boli disperzie s aktívnymi látkami dôkladne premiešané. Do 5ml injekčnej striekačky s dávkovacou ihlou bola špachtľou prenesená daná disperzia. Striekačkou boli nanosené 2 ml disperzie na membránu v donorovej časti. Vonkajší prijímací otvor donorovej časti aj otvor na odber vzoriek boli prekryté parafilmom, aby sa do disperzie alebo receptorovej kvapaliny nedostali nečistoty. Pripravené Franzove cely boli uložené na magnetickú miešaciu dosku v polystyrénovom nosiči a rýchlosť miešania nastavená na 300 RPM.



Obrázok 5 - Nanesený oleogel s CBD na membránu Franzovej cely

4.5 Odber vzoriek z Franzových ciel

Aby bolo možné zachytiť plynulosť uvoľňovania aktívnych látok, prebehlo päť odberov vzoriek po 3 hodinách, pričom posledný odber bol po 24 hodinách od nanosenia disperzie. Vzhľadom k časovej náročnosti bol každý experiment začatý v čase 7:30, čo zahŕňalo zostavenie difúznej aparatury a nanosenie vzorky na membránu.

Proces odberu vzoriek začal odstránením parafilmu z otvoru na odber vzoriek. Vzhľadom na vlastnosti aktívnych látok, bolo potrebné pred odberom celu párkrát prevrátiť hore dnom, aby sa zaistilo premiešanie s receptorovou tekutinou. Injekčná striekačka o objeme 5 ml s dlhou ihlou bola vložená cez otvor na odber až ku dnu. Bol odobratý 1 ml vzorky

a prenesený do dopredu označenej skúmavky typu Eppendorf, ktorá bola následne uzatvorená, obalená parafilmom a uložená do chladničky. Čistou injekčnou striekačkou s dlhou ihlou bol cez otvor doplnený chýbajúci 1 ml roztoku NaCl, otvor prekrytý parafilmom a cela uložená naspäť na miešaciu dosku. Postup bol zopakovaný pri všetkých odberoch.

4.6 Meranie metódou HPLC

Na stanovenie množstva prejdenej aktívnej látky cez membránu bola vybratá metóda HPLC. Ako prvé boli pripravené kalibračné roztoky zo štandardu kanabidiolu a metanolu. Do štyroch 10ml odmerných baniek boli namiešané roztoky o koncentráciách 1, 5, 10 a 50 mg/l. Kým začala analýza, boli kalibračné roztoky ponechané v chladničke.

Po analyzovaní kalibračnej závislosti, prišli na rad vzorky aktívnych látok z Franzových ciel. S pomocou filtra na striekačky bol prefiltrovaný obsah Eppendorfy do označenej kyvety. Rovnako ako kalibračné roztoky boli do začiatku analýzy pripravené vzorky uložené v chladničke.

Kvantitatívna analýza bola realizovaná na vysokoúčinnom kvapalinovom chromatografe Waters 2487 s použitím diódového detektoru Dual Lambda Absorbance. Bola využitá metóda izokratickej elúcie cez kolónu Kinetex C18 s rozmermi 100x4,6 mm a veľkosťou častíc 2,6 μm . Ako mobilná fáza bola vybratá zmes metanolu a vody (80:20) s prietokom 0,6 ml/min a pri konštantnej teplote 25 °C. Na nástriek bolo použitých 5 μl vzorky. Vzorky boli analyzované pri vlnovej dĺžke 220 nm.

4.7 Meranie stability disperzií na analytickej odstredivke LUMISizer

Meranie prebiehalo na analytickej odstredivke LUMISizer, ktorá umožňuje rýchle vyhodnotenie stability použitých disperzií. Bola meraná stabilita nielen čistých disperzií, ale aj disperzií s aktívnymi látkami pri teplote 25 °C a 45 °C.

Prvý krok zahŕňal dávkovanie disperzie do polykarbonátových kyviet. Do kyvety bola pomocou 5ml injekčnej striekačky s dávkovacou ihlou nadávkovaná disperzia po rysku na kyvete. Dávkovanie prebiehalo opatrne, aby sa disperzia nadávkovala presne, bez prítomnosti bublín, ktoré by mohli skresľovať výsledky. Následne sa kyveta uzatvorila vrchnákom a uložila do prístroja. V prístroji je možné merať až 12 vzoriek naraz, preto sa pri každom meraní zaplnila celá kapacita prístroja.

Boli nastavené parametre pre meranie, a to počet otáčok na hodnotu 4000 za minútu a teplotu na hodnotu 25 °C, respektíve 45 °C. Merania prebiehali po dobu 17 hodín. Po skončení merania boli výsledné transmittančné profily vyhodnotené v programe SepView.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V nasledujúcich kapitolách sú popísané výsledky všetkých použitých metód a rozvedená diskusia. Metódy zahŕňali difúzne experimenty s Franzovými celami, meranie HPLC a stanovenie stability disperzií pomocou analytickej odstredivky LUMISizer.

5.1 Difúzne experimenty pomocou Franzových ciel

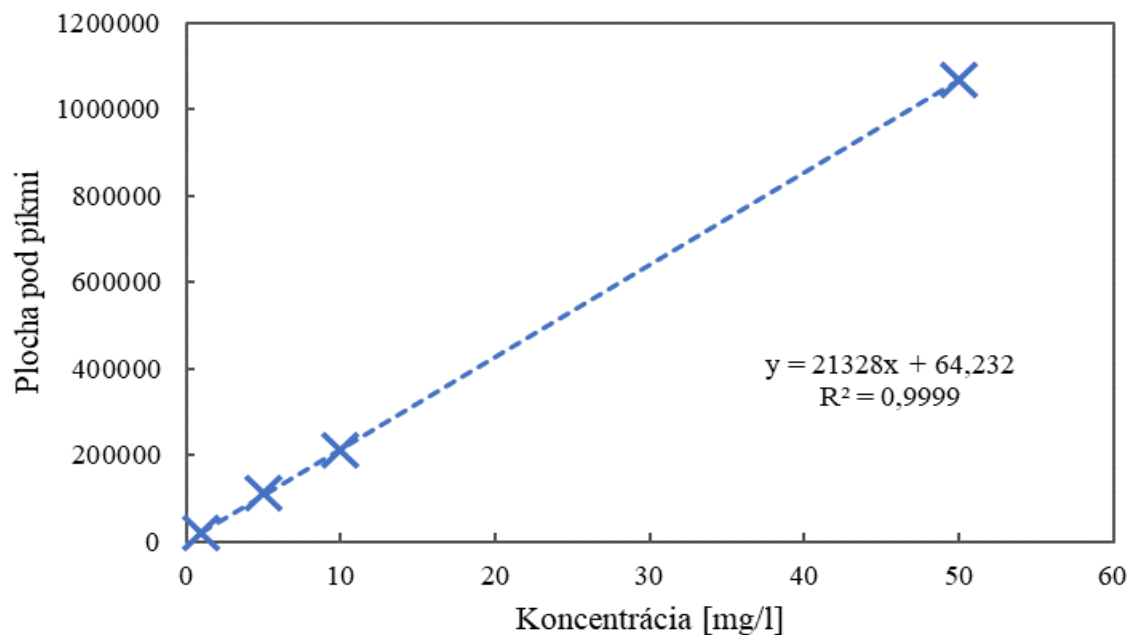
Hlavnú časť práce predstavovali difúzne experimenty, ktoré prebiehali vo Franzových difúzných celách. Difúzia vo Franzových celách je jednou z metód in vitro na skúmanie transdermálnej difúzie.

Dodané oleje s aktívnymi látkami, menovite CBD full spectrum a Asyntra CBD-Alt, boli miešané so štyrmi druhmi disperzií, ktoré boli nanosené na membránu, aby mohla prebehnúť difúzia. Vzorky boli odoberané v trojhodinových intervaloch a posledný odber prebehol 24 hodín po nanosení disperzie na membránu. To znamená, že ak začiatok merania začal o 7:30, odbery prebiehali o 10:30, 13:30, 16:30, 19:30 toho istého dňa a 7:30 nasledujúceho dňa. Meranie so všetkými štyrmi disperziami pre jeden olej prebehlo dvakrát. Bolo teda uskutočnených šesťnásť meraní, z ktorých osem bolo pre vzorky s CBD full spectrum a ostatných osem pre vzorky s Asyntrou CBD-Alt. Konečný počet vzoriek pre obidva oleje bol 80.

5.2 Meranie metódou HPLC

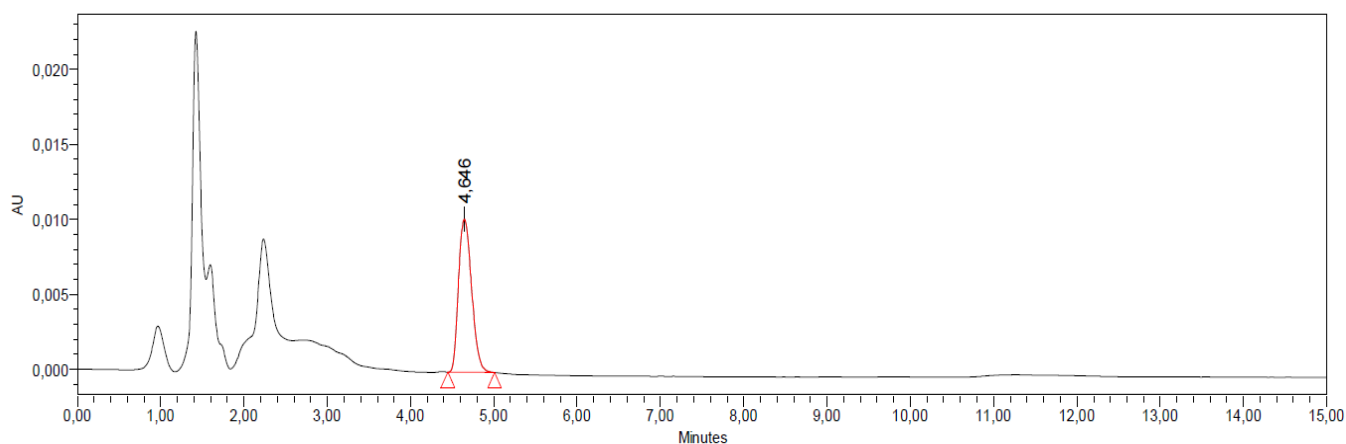
Pomocou metódy HPLC boli analyzované kalibračné roztoky a vzorky odobratých Franzových ciel. Jednou z najdôležitejších častí pri stanovení metódou HPLC sú kalibračné roztoky, z ktorých je potom určená presná koncentrácia prejdených aktívnych látok vo vzorkách.

Pre kalibračné roztoky kanabidiolu boli pripravené koncentrácie 1, 5, 10 a 50 mg/l. Pri výbere koncentrácií roztokov sa bralo do úvahy, že v disperziách sa CBD full spectrum nachádzalo len 0,5 % z celkovej hmotnosti disperzie a predpokladalo sa, že z každej disperzie sa uvoľní iné množstvo kanabidiolu. Preto boli zvolené relatívne nízke koncentrácie kalibračných roztokov, aby bolo možné metódou HPLC stanoviť aj stopové množstvo uvoľneného kanabidiolu. Po zmeraní kalibračných roztokov bol v programe MS Excel vytvorený graf závislosti plochy pík na známej koncentrácii. Bola vynesena spojnice trendu a rovnica priamky, z ktorej je možné vypočítať presnú koncentráciu uvoľneného kanabidiolu vo vzorkách z Franzových ciel.



Graf 1 – Kalibračná závislosť pre štandard kanabidiolu

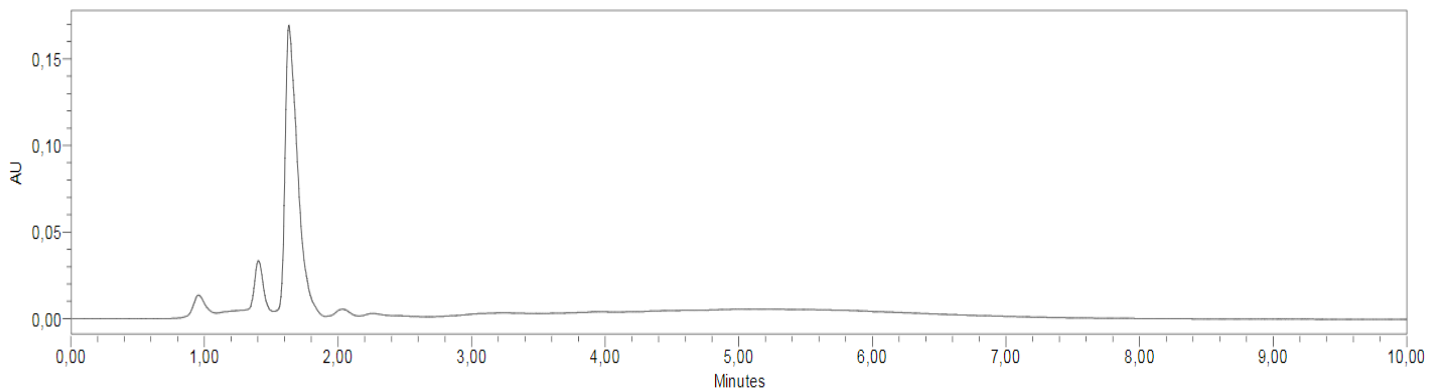
Na grafe 1 je vynesená kalibračná závislosť pre kanabidiol. Z grafu možno vyčítať, že hodnota korelačného koeficientu R^2 sa blíži k hodnote 1. Taktiež čím je hodnota korelačného koeficientu R^2 bližšie k hodnote 1, tým je výsledná koncentrácia z rovnice priamky presnejšia.



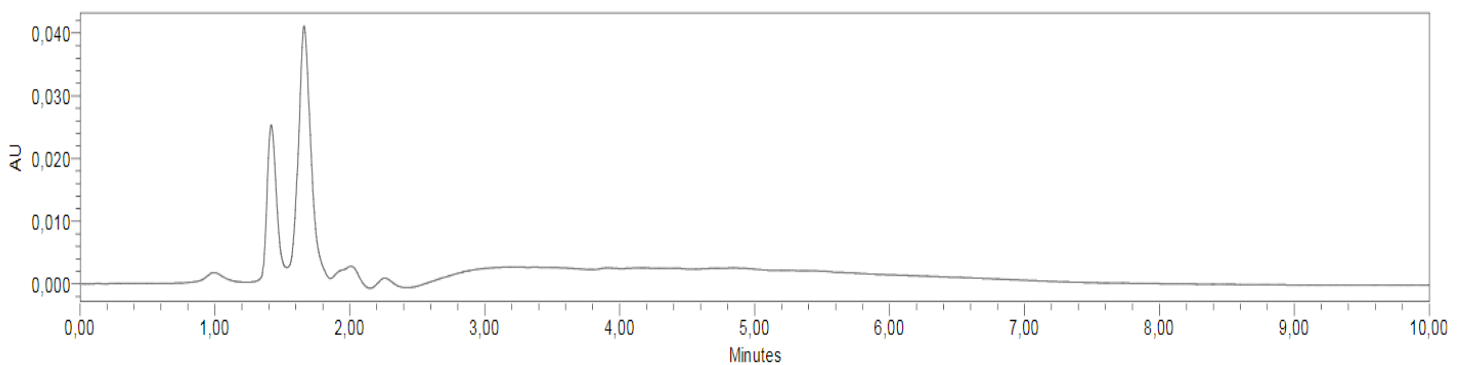
Obrázok 6 - Výstup z HPLC pre kalibračný bod v koncentrácii 5 mg/l

Obrázok 6 predstavuje graf kalibračného bodu pre koncentráciu 5 mg/l. Ohraničená červená krivka zobrazuje zónu, v ktorej sa kanabidiol nachádza a označuje sa ako pík. Z grafu je tiež možné vyčítať retenčný čas kanabidiolu, ktorý je 4,646 minút. Retenčný čas predstavuje čas od nástreku vzorky až po jeho vyplavenie z kolóny [51]. V porovnaní s inými štúdiami je retenčný čas v našom experimente pozitívnym aspektom. Napríklad, v štúdií z roku 2020 bol od autorky Madej stanovený retenčný čas kanabidiolu na približne 13 minút, pričom ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu a kyseliny octovej v pomere 66:34 [52]. Dá sa teda tvrdiť, že mobilná fáza použitá v našom experimente je dobrým riešením pre nízky retenčný čas kanabidiolu.

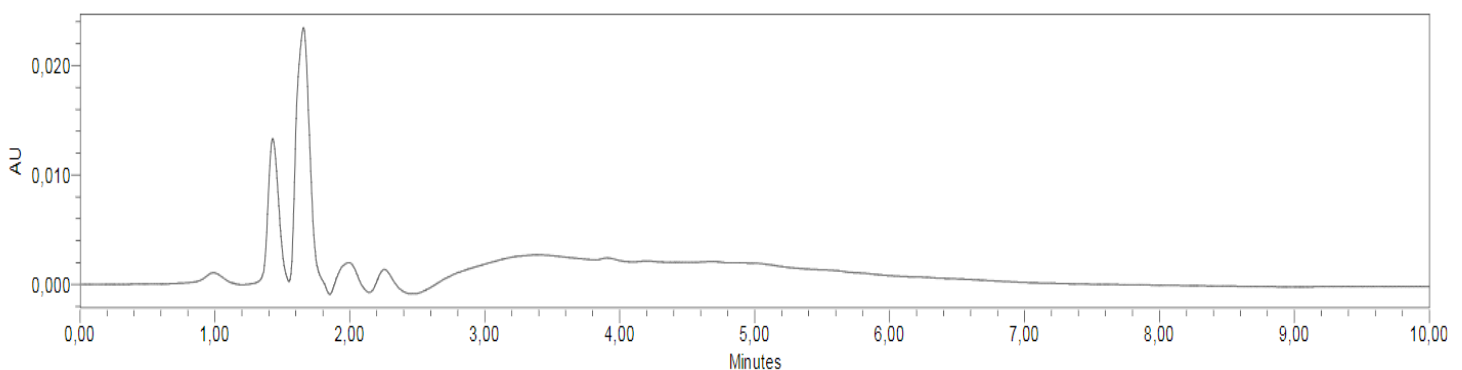
Vzhľadom na vyt'azenosť vysokoúčinného kvapalinového chromatografu bolo analyzovaných 24 vzoriek s CBD full spectrum. Analyzované vzorky boli z odberov po 6, 12 a 24 hodinách a pre každú disperziu sa analyzovali dve vzorky z rovnakého času odberu. Bohužiaľ sa na žiadnom chromatograme nepotvrdila prítomnosť ani stopového množstva kanabidiolu. Obrázky 7, 8, 9 sú výstupy z HPLC pre emulziu O/V, ktorej vzorky boli odberané po 6, 12 a 24 hodinách.



Obrázok 7 - Výstup z HPLC pre vzorku emulzie O/V s CBD full spectrum



Obrázok 8 - Výstup z HPLC pre vzorku emulzie V/O s CBD full spectrum



Obrázok 9 - Výstup z HPLC pre vzorku oleogelu s CBD full spectrum

Z výstupov je možné vypočítať, že v čase medzi štvrtou a piatou minútou analýzy sa nenachádza pík v porovnaní s obrázkom 6, kde je viditeľný pík. To naznačuje, že vo vzorkách nebol prítomný kanabidiol vôbec alebo sa v nich nachádzal v množstvách, ktoré boli pod medzou detekcie, ktorou je v tomto prípade koncentrácia 1 mg/l. Veľmi podobný priebeh výstupu mali všetky analyzované vzorky. V žiadnej nebolo detekovateľné množstvo uvoľneného kanabidiolu.

Analýza bakuchiolu prítomného v Asyntre CBD-Alt neprebehla, pretože štandard potrebný pre jeho analýzu nebol ani po dvoch objednávkach doručený v stanovenom termíne.

5.3 Návrhy optimalizácie transdermálnej difúzie a metódy HPLC

Ako jeden z návrhov na optimalizáciu pri stanovení kanabidiolu metódou HPLC je použitie ešte menších koncentrácií kalibračných roztokov, z ktorých je možné určiť množstvo uvoľneného kanabidiolu vo vzorke. I keď na výstupoch z HPLC nie je viditeľný pík, ktorý značí prítomnosť kanabidiolu, nemôžeme vylúčiť možnosť, že sa vo vzorke nachádza v koncentráciách pod medzou detekcie.

Ďalšie návrhy sa týkajú optimalizácie samotnej difúzie vo Franzových celách. Je pravdepodobné, že absencia kanabidiolu vo vzorkách súvisí priamo s prevedením samotnej difúzie. Jedným z problémov mohlo byť vytvorenie bublín na rozhraní membrány a receptorovej tekutiny. Keby sa pri odoberaní vzoriek a následným dopĺňaním receptorovej tekutiny zabudlo na naklonenie cely, mohli by na rozhraní zostať bubliny. Je možné, že ak by bola vzniknutá bublina na rozhraní dostatočne veľká, mohla by negatívne ovplyvniť difúziu, dokonca by nemusela prebiehať vôbec. Tým pádom by sa do receptorovej tekutiny nemuseli uvoľniť aktívne látky.

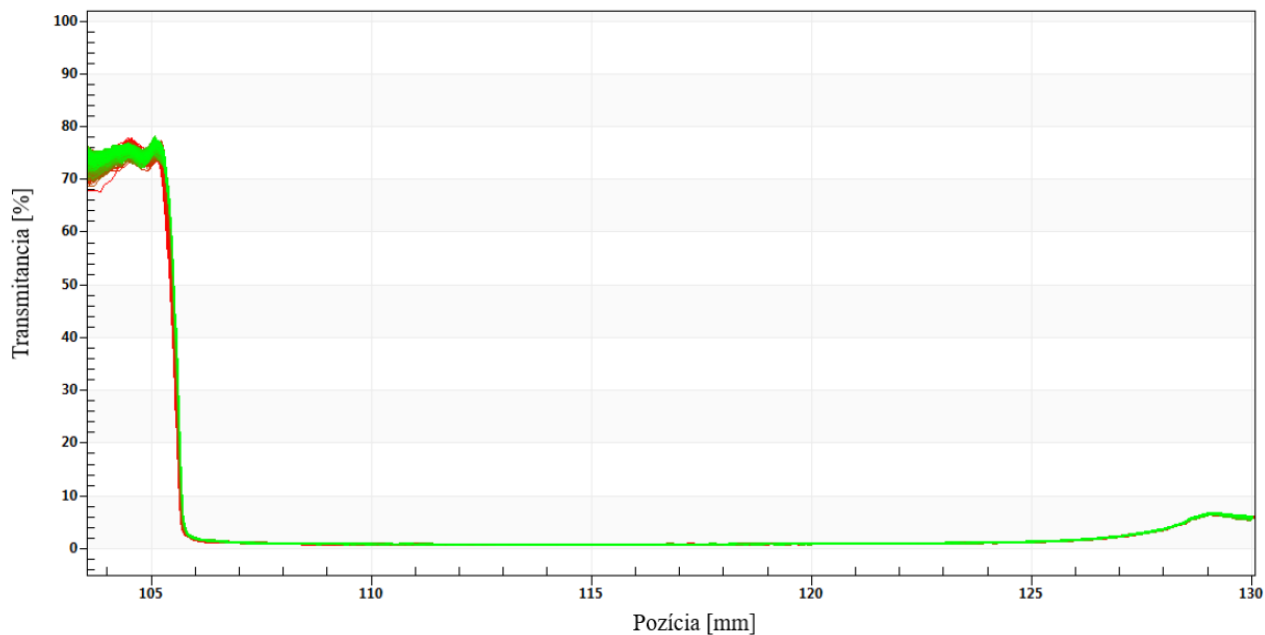
V našom experimente sa vždy po skončení meraní a pri otváraní cely dali pozorovať „mastné oká“, ktoré plávali na povrchu receptorovej tekutiny. To značí, že niečo sa cez membránu uvoľnilo avšak nevieme s určitosťou povedať, že sa predifundoval aj kanabidiol. Difúziou sa mohli uvoľniť aj iné zložky oleja, v ktorom sa kanabidiol pôvodne nachádzal. Mohla by nastať situácia kedy sa kanabidiol síce uvoľnil z danej disperzie, ale predifundoval len do určitej vrstvy membrány a nie do receptorovej tekutiny. Tu sa naskytuje možnosť analýzy kanabidiolu zachyteného v membráne. Pokiaľ by sa z membrány vyextrahoval kanabidiol vhodným rozpúšťadlom, dala by sa extrahovaná zmes analyzovať. Tento prístup bol použitý v štúdiu od autorky Sharkawy, v ktorej analyzovali nielen množstvo kanabidiolu uvoľneného cez prasačiu kožu, ale aj množstvo zachytené v nej. Ako disperzia, z ktorej bol uvoľňovaný kanabidiol bola použitá Pickering emulzia. Po ukončení difúzie vo Franzovej cele, bola pomocou metódy stripping oddelená vrstva prasačej kože, ktorá obsahovala stratum corneum. Následne bola vrstva extrahovaná v metanole a ultrazvuku. Výsledkom analýzy na HPLC bol fakt, že množstvo kanabidiolu zachyteného vo vrstve stratum corneum bol podstatne vyšší ako množstvo uvoľnené v receptorovej tekutine [53]. Tento jav je pravdepodobne daný tým, že lipofilné látky často difundujú cez kožu horšie ako hydrofilné látky, pretože majú väčšiu afinitu k stratum corneum [54].

V neposlednej rade mohla byť difúzia ovplyvnená výberom receptorovej tekutiny. Napriek tomu, že sme chceli zanechať simuláciu vnútorného prostredia ľudského tela, z výsledkov vyplýva, že 0,15M roztok NaCl nie je vhodnou voľbou pre transdermálnu difúziu lipofilných látok ako je kanabidiol a bakuchiol. Pokiaľ chceme použiť lipofilné látky na transdermálnu difúziu Franzovými celami, je teda potrebné tomu prispôsobiť aj prostredie. Rozpustnosť lipofilných látok sa dá v receptorovej tekutine zvýšiť pridaním surfaktantov alebo hovädzieho sérového albumínu. Je ale nutné si overiť či pridané látky podporujúce rozpustnosť neovplyvňujú negatívne štruktúru membrány alebo potom následnú analýzu receptorovej tekutiny. Ďalšou možnosťou je pridanie organických rozpúšťadiel, v ktorých majú lipofilné látky vyššiu rozpustnosť. Avšak aj pri tejto alternatíve, je potrebné brať do úvahy zachovanie integrity membrány [55].

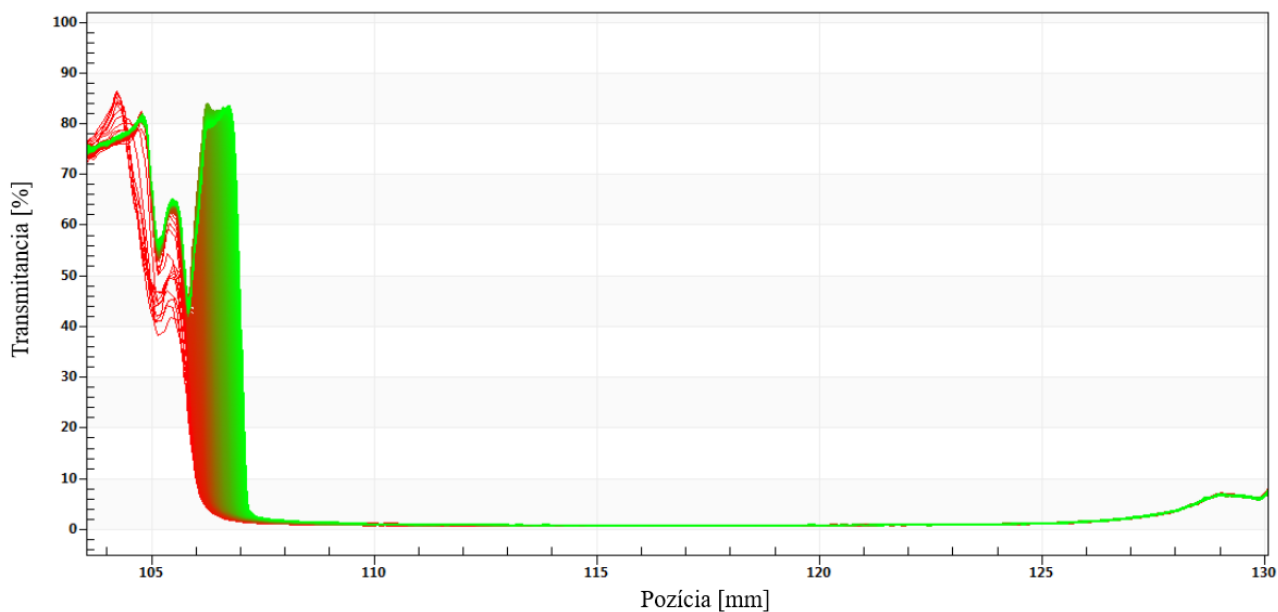
5.4 Stanovenie stability analytickou odstredivkou LUMISizer

Na uvoľňovanie aktívnych látok z disperzií má do istej miery vplyv aj stabilita danej disperzie. Nestabilita disperzie môže ovplyvňovať správanie molekúl aktívnych látok v danej disperzii. Preto boli uskutočnené merania stability dodaných disperzií.

Merania prebiehali pomocou analytickej odstredivky LUMISizer, ktorá urýchľuje tvorbu nestabilných javov disperzií. Disperzie boli odstredené v polykarbonátových kyvetách, pri 4 000 otáčkach za minútu, teplote 25 °C a 45 °C po dobu 17 hodín. Merané boli samotné disperzie aj s aktívnymi látkami. Výsledkom bol vizuálny stav vzorky v kyvete a transmittačné profily vytvorené počas merania stability.



Obrázok 10 – Vyhodnotenie stability vzorky emulzie O/V pri 25 °C

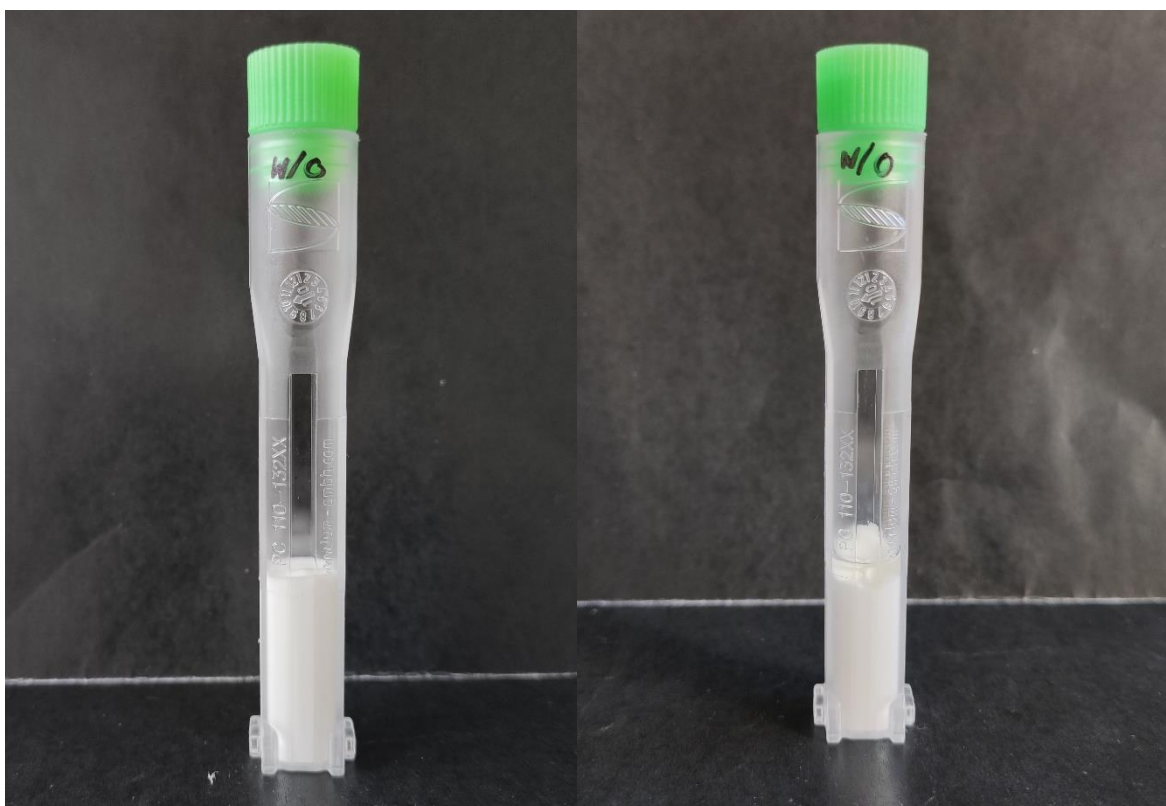


Obrázok 10 – Vyhodnotenie stability emulzie V/O pri 25 °C

Na obrázku 10 je vyobrazená emulzia O/V pri 25 °C. Je možno vidieť, že sa jedná o stabilnú emulziu a nedošlo k žiadnemu oddeľovaniu fáz emulzie. Zato na obrázku 11 je viditeľný transmittačný profil, ktorý naznačuje oddelenie jednotlivých fáz emulzie V/O. Stabilitu bolo možné určiť zo indexov stability aj z vizuálnej kontroly vzoriek. Obrázok č. 12 predstavuje vzorky pre emulziu O/V, kde nebola pozorovaná žiadna zmena. Emulzia V/O z obrázku 13 prešla značným oddelením fáz. Taktiež z tabuľky 4 sa dá vyčítať, že index stability u emulzie O/V je nižší ako u emulzie V/O.



Obrázok 11 - Na ľavej strane emulzia O/V pred odstredení; na pravej strane emulzia O/V po odstredení

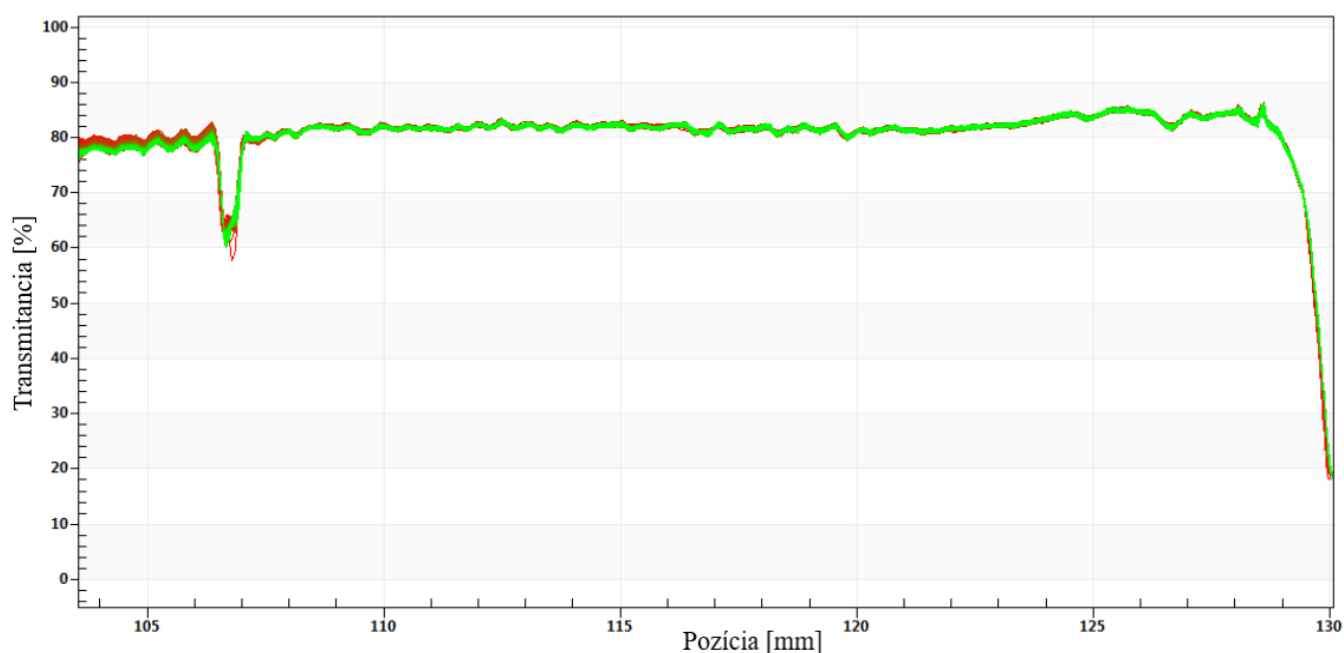


Obrázok 12 - Na pravej strane emulzia V/O pred odstredení; na ľavej strane emulzia V/O po odstredení

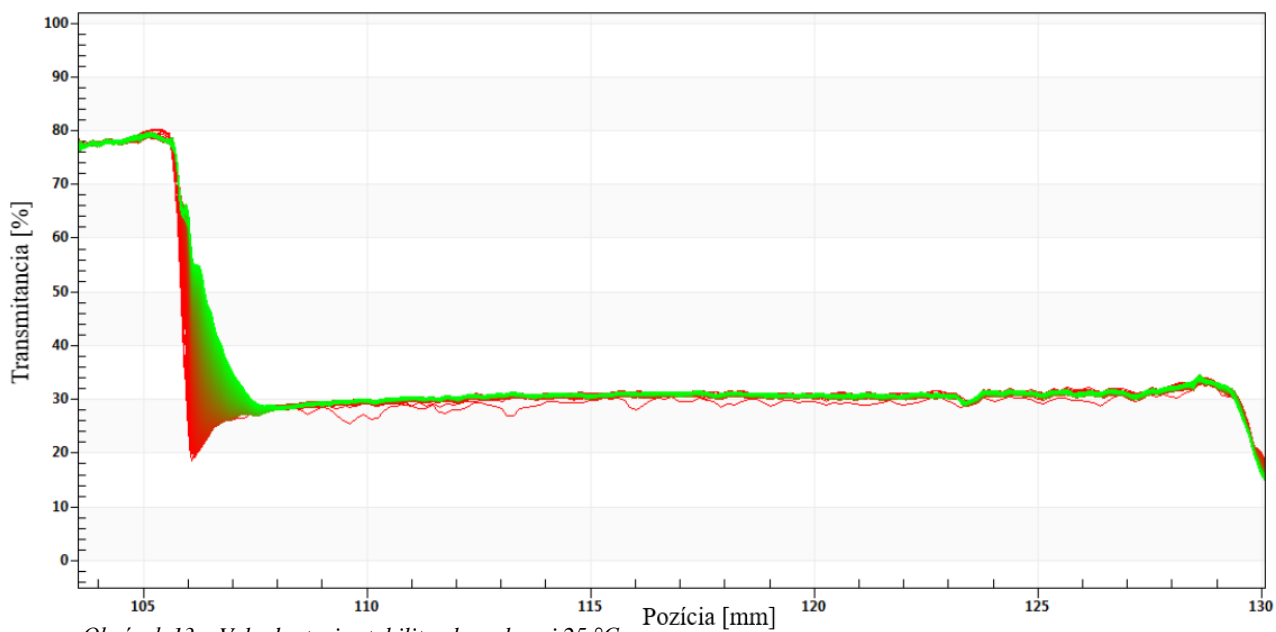
Tabuľka 4 - Indexy nestability pri 25 °C, 3x z každej disperzie

Typ disperzie	Emulzia O/V	Emulzia V/O	Pěstící telový olej	Oleogel
Index nestability	0,004	0,042	0,041	0,029
	0,003	0,045	0,038	0,038
	0,004	0,044	0,036	0,030

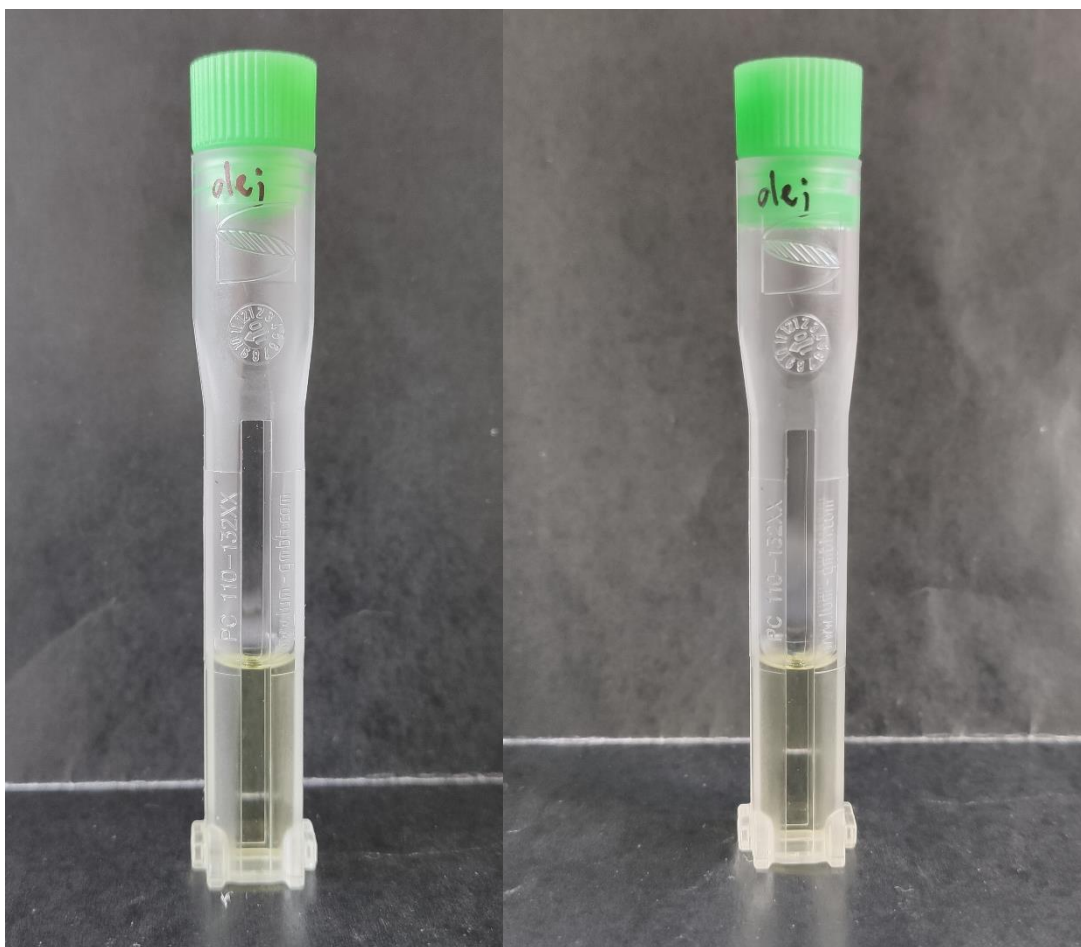
Okrem emulzií boli merané vzorky pěstícího telového oleja a oleogelu. Keďže sa olej neskladá z dvoch fáz, tak bol predpoklad, že tento systém bude stabilný. To môžeme vidieť z obrázku 14. Zloženie pěstícího oleja je vyobrazené v Prílohe 1. Výsledok po odstredení je zaznamenaní na obrázku 16. Jeho relatívne vysoký index nestability z tabuľky 4 je pravdepodobne spôsobený jeho viskozitou. Z tabuľky 3, ktorá zobrazuje zloženie oleogelu je možné vidieť, že sa skladá prevažne z olejových látok. Pravdepodobnosť výskytu dvoch fáz je preto minimálna. Z obrázku 15 je viditeľné, že oleogel je ako systém relatívne stabilný, napriek vzniknutému transmitačnému profilu, ktorý je pravdepodobne výsledkom vyplavovania bublín z oleogelu počas odstredovania. Podobne ako pri oleji aj pri oleogele boli namerané vyššie hodnoty indexu nestability. Tieto hodnoty nie sú spôsobené nestabilitou, ale skôr vyplavovaním bublín ako to bolo pri transmitačnom profile. Konzistencia oleogelu bránila rovnomernému dávkovaniu do kyvety a tak sa v kyvete nachádzalo pomerne veľa bublín. Tento jav bol pozorovaný aj vizuálne a je možné ho detegovať aj na obrázku 17.



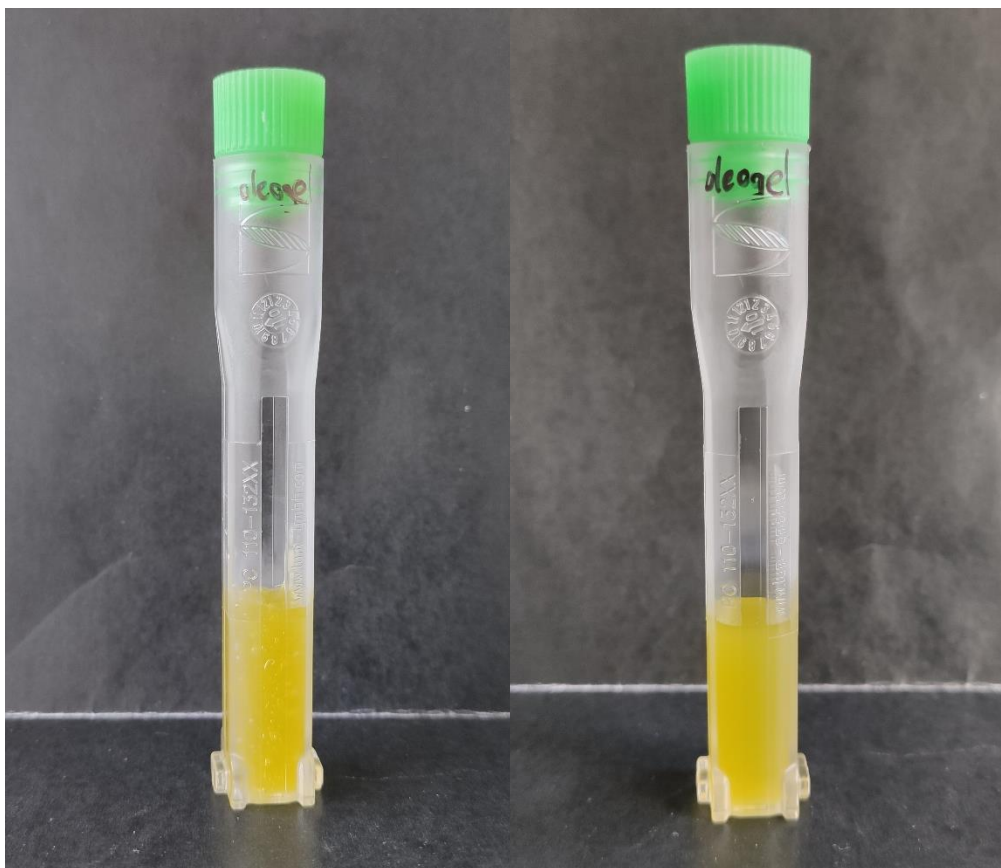
Obrázok 14 – Vyhodnotenie stability pěstícího oleja pri 25 °C



Obrázok 13 – Vyhodnotenie stability oleogelu pri 25 °C

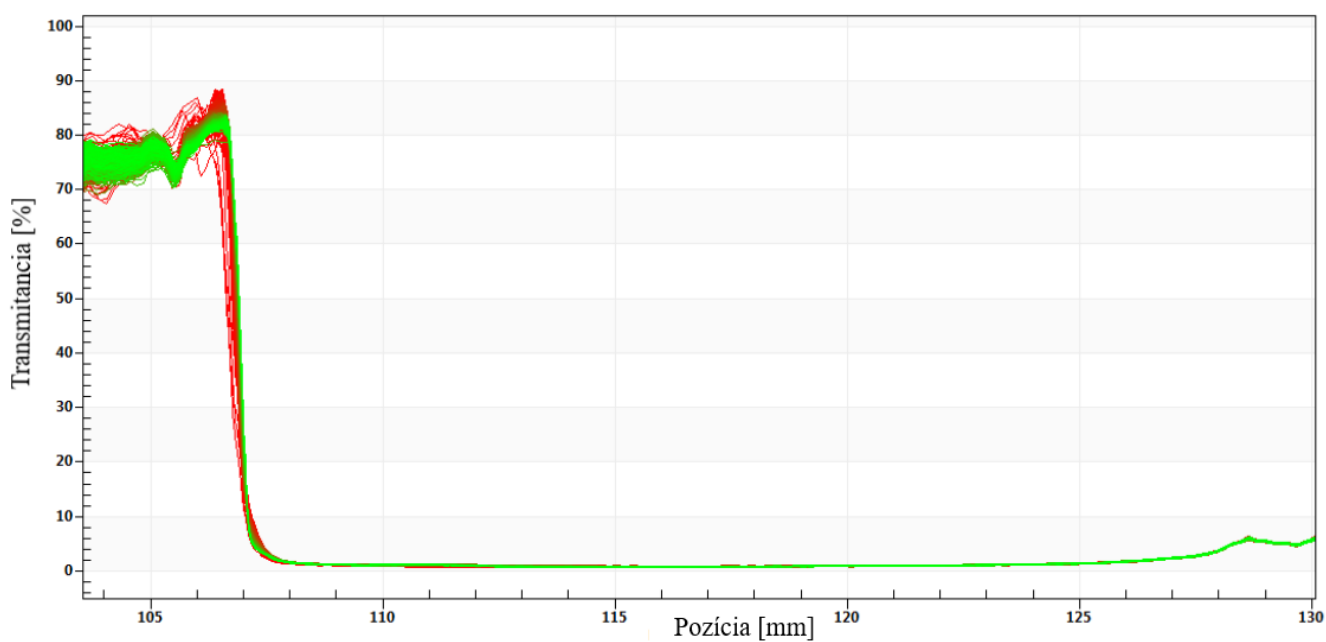


Obrázok 16 - Na ľavej strane pěstíci olej pred odstredení; na pravej strane pěstíci olej po odstredení

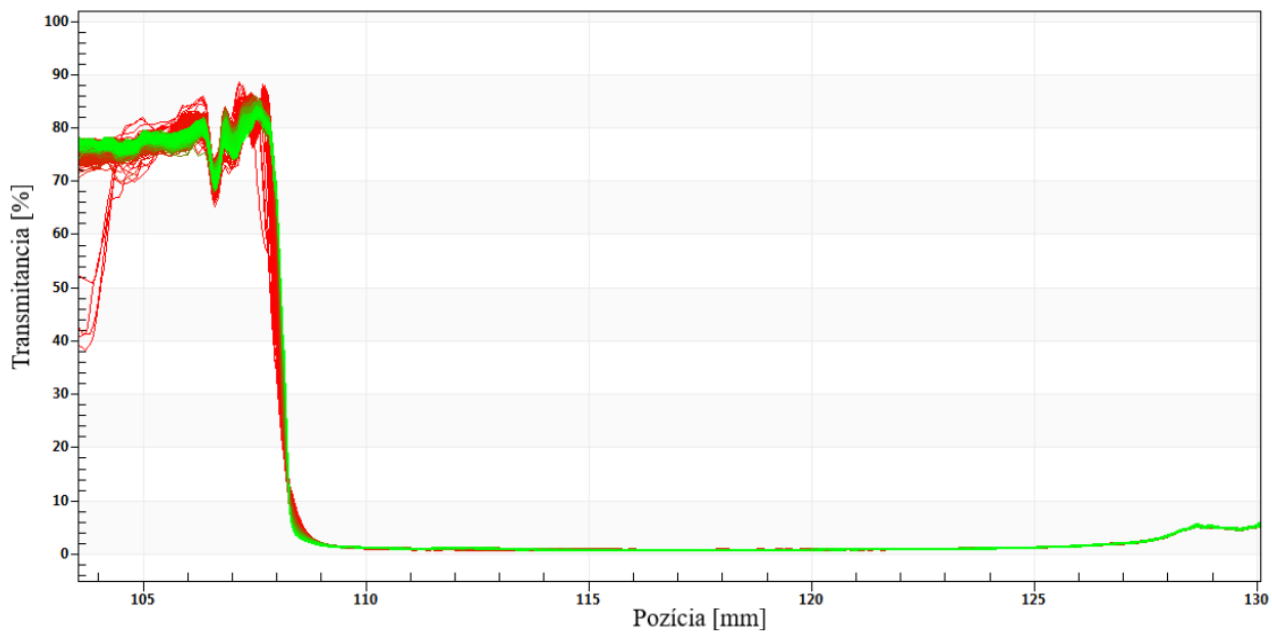


Obrázok 17- Na ľavej strane oleogel pred odstredení; na pravej strane oleogel po odstredení

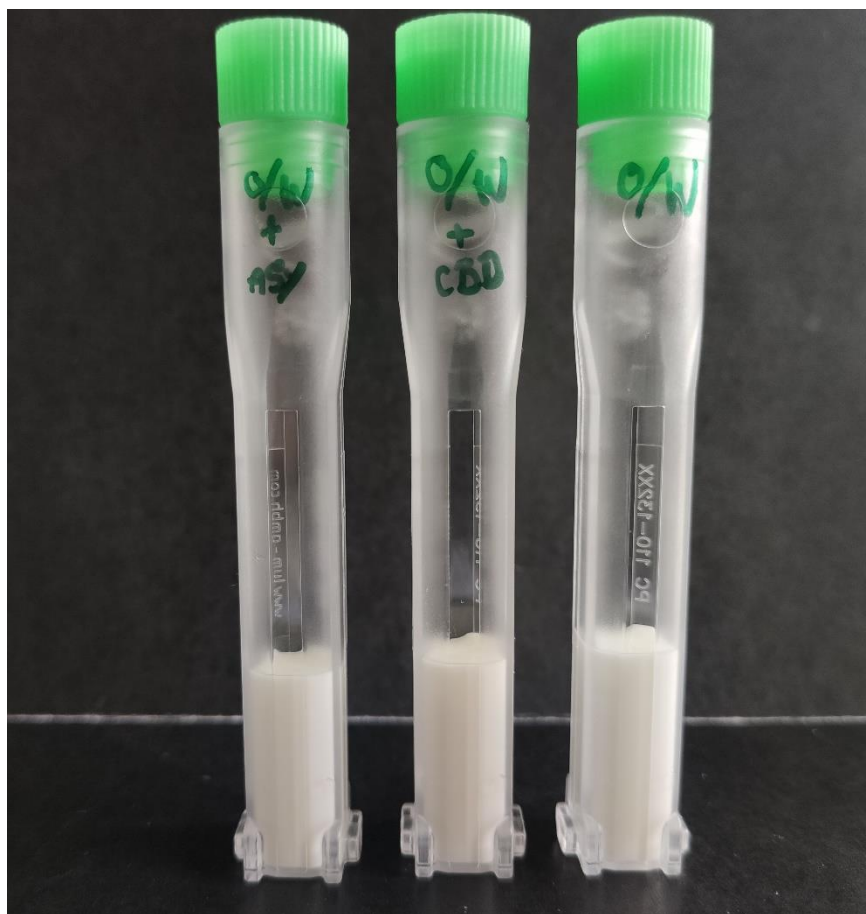
Okrem samotných emulzií boli merané aj s CBD full spectrum a Asyntrou CBD-Alt. Na nasledujúcich obrázkoch 18 a 19 je vyobrazená stabilita emulzie O/V z merania pomocou LUMISizer-u. Vizualný stav vzoriek predstavuje obrázok 20.



Obrázok 18 – Vyhodnotenie stability emulzie O/V s CBD full spectrum pri 25 °C



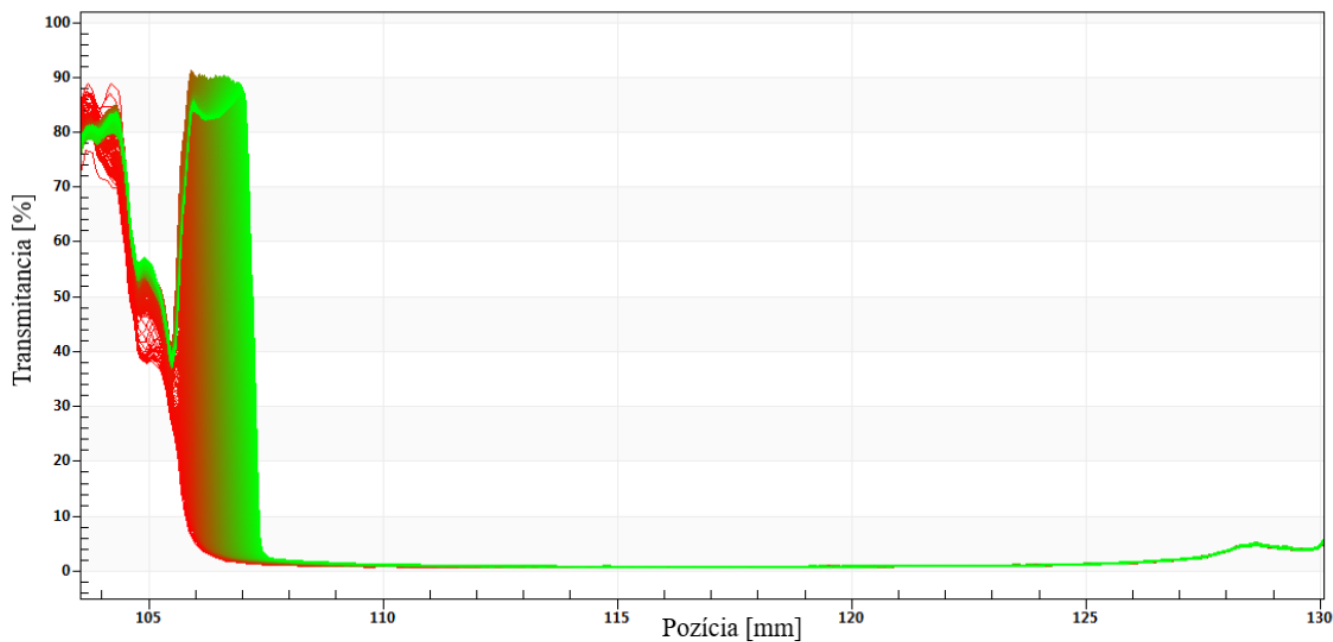
Obrázok 19 - Vyhodnotenie stability emulzie O/V s Asyntrou CBD-Alt pri 25 °C



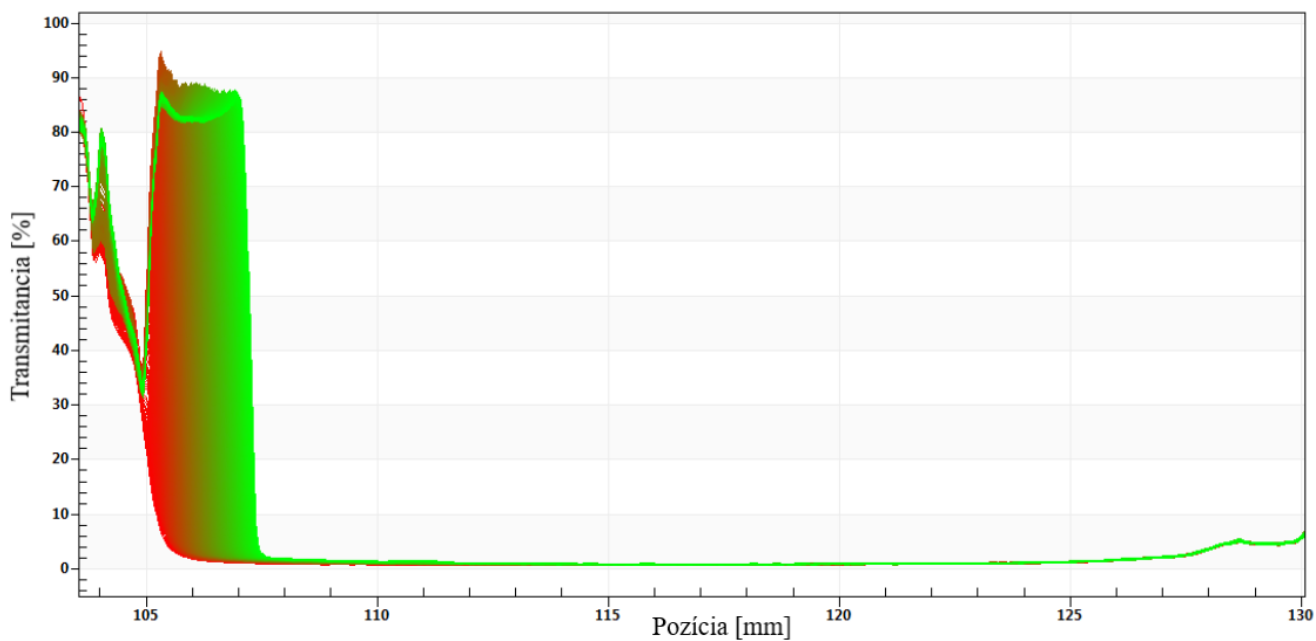
Obrázok 20 - Vzorok emulzie O/V po odstredení pri 25 °C; zľava doprava - Asyntra CBD-Alt, CBD full spectrum, emulzia O/V

Bolo pozorované, že prídavkom CBD full spectrum a Asyntry CBD-Alt sa stabilita celého systému nezmenila. Tento fakt potvrdzujú dáta z obrázkov 18 a 19, ako aj obrázok 20, z ktorého je vidieť, že po odstredení nedošlo k oddeleniu fáz.

Nasledujúce obrázky poukazujú na stabilitu emulzií V/O s pridaným CBD full spectrum a Asyntrou CBD-Alt. Trend v stabilite emulzie V/O pokračoval aj po pridaní olejov s aktívnymi látkami. Na obrázkoch 21 a 22 sa nachádzajú transmittančné profily, ktoré jasne poukazujú na nestabilitu systému. Oddelenie fáz je viditeľné aj na obrázku 23, kde sú vyobrazené vzorky po odstredení.



Obrázok 14 - Vyhodnotenie stability emulzie V/O s CBD full spectrum pri 25 °C

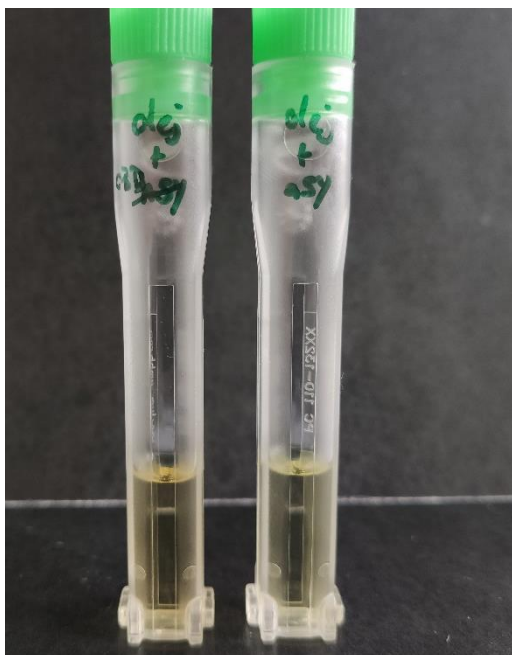


Obrázok 22 - Vyhodnotenie stability emulzie V/O s Asyntrou CBD-Alt pri 25 °C

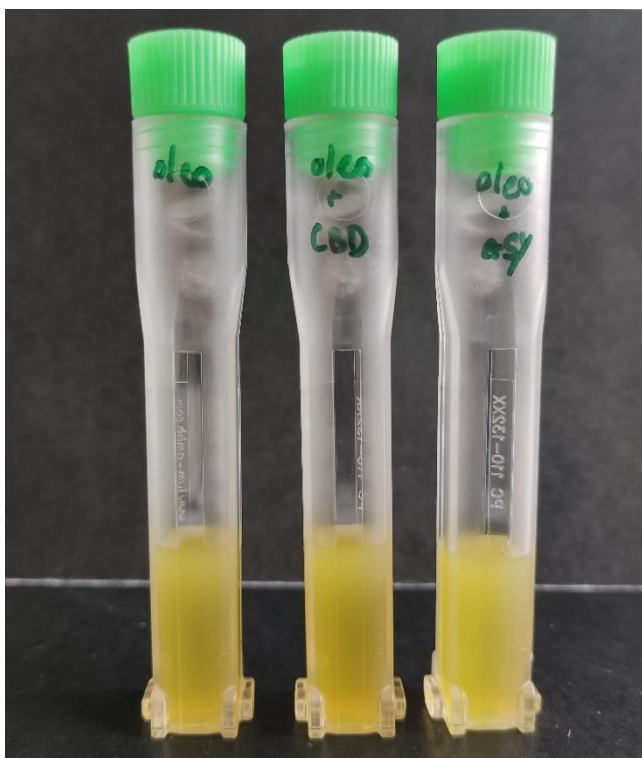


Obrázok 15 - Vzorky emulzií V/O po odstredení; zľava doprava - čistá emulzia V/O, Asyntra CBD-Alt, CBD full spectrum, emulzia V/O

Stabilita pesticídneho telového oleja a oleogelu po pridaní CBD full spectrum a Asyntry CBD-Alt sa v porovnaní so stabilitou disperzií nezmenila. Na obrázkoch 24 a 25 je viditeľné, že po odstredení nenastali žiadne zmeny okrem odbublinkovania oleogelu.

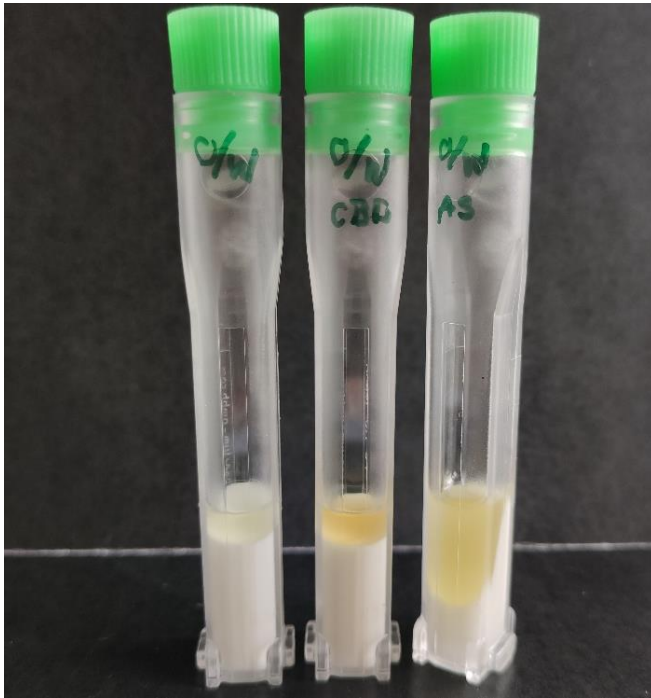


Obrázok 24 - Vzorky pesticídneho oleja po odstredení pri 25 °C; zľava – CBD full spectrum, Asyntra CBD-Alt

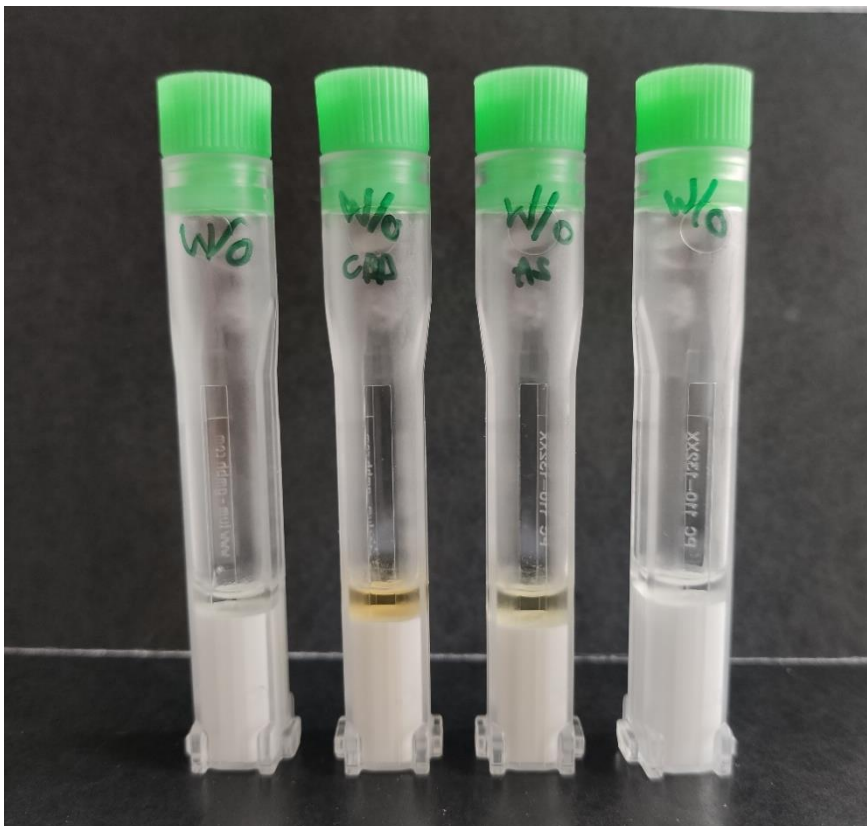


Obrázok 16 - Vzorky oleogelu po odstredení pri 25 °C; zľava - oleogel, CBD full spectrum, Asyntra CBD-Alt

Ako ďalším meraním bolo určenie stability disperzií pri 45 °C, ktoré obsahujú oleje s aktívnymi látkami a aj tie bez. Predpokladalo sa, že pri 40 °C bude v emulziách dochádzať k narušeniu rovnováhy medzi fázami a dôjde k ich oddeleniu. Tento predpoklad sa potvrdil, čo ukazujú nasledujúce obrázky č. 26 a 27. Došlo k oddeleniu fáz ako pri emulzii O/V, tak aj pri emulzii V/O. Nestabilitu systémov je možné pozorovať v prílohe 2, 3, 4 pre emulziu O/V a v prílohe 5, 6 a 7 pre emulziu V/O. Čo sa týka pesticídneho telového oleja a oleogelu, tým zvýšená teplota nespôsobila žiadne zmeny v štruktúre vzhľadom na to, že nemajú rozhranie fáz, ktoré by sa mohlo narušiť.



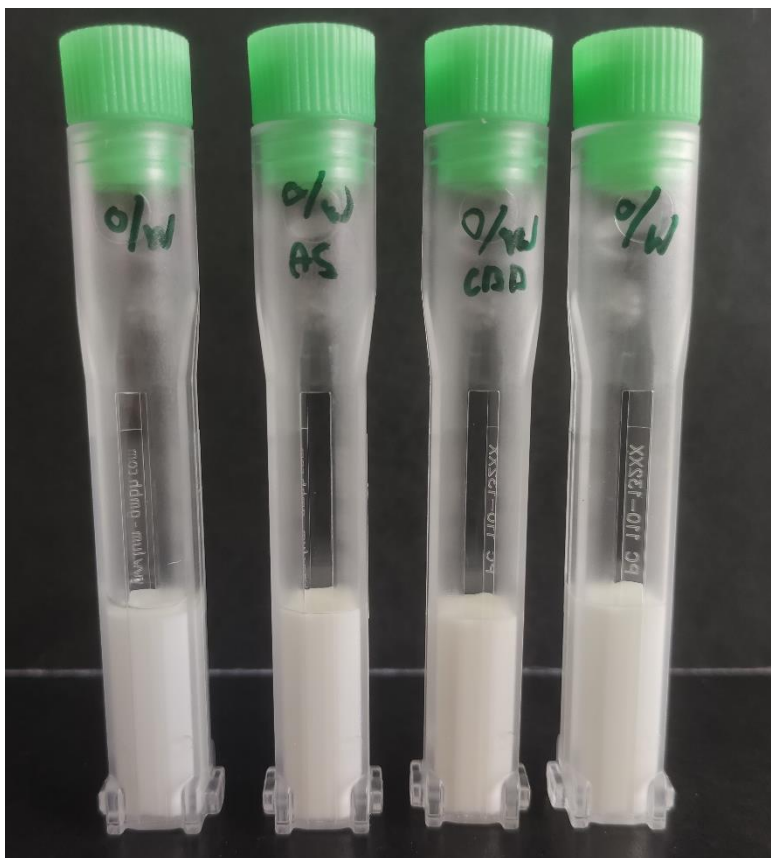
Obrázok 26 - Vzorky emulzie O/V po odstredení pri 45 °C; zľava - emulzia O/V, CBD full spectrum, Asyntra CBD-Alt



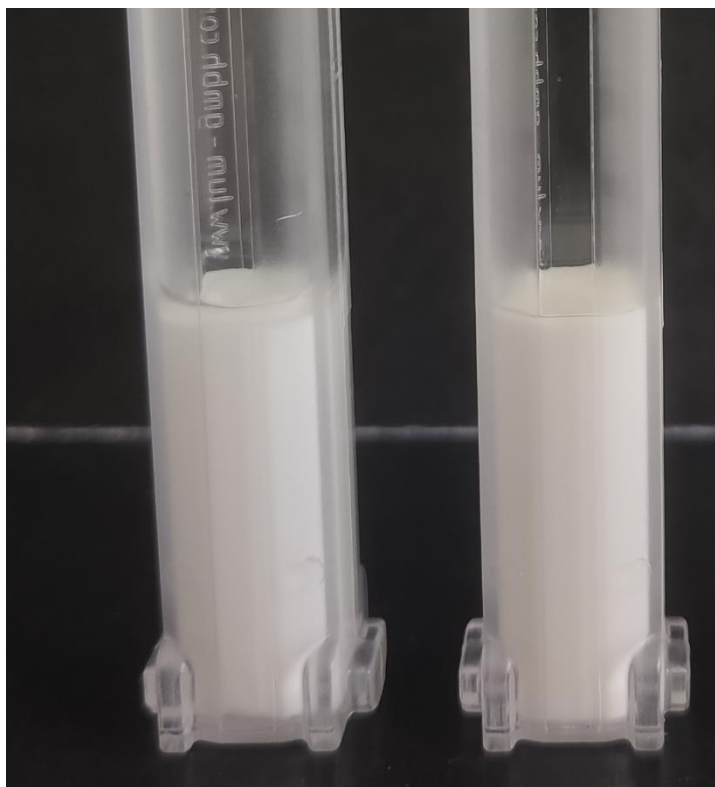
Obrázok 27 - Vzorky emulzie V/O po odstredení pri 45 °C; zľava - emulzia V/O, CBD full spectrum, Asyntra CBD-Alt, emulzia V/O

Obrázky 28, 29 a 30 predstavujú vizuálny stav z merania stability disperzií s CBD full spectrum a Asyntrou CBD-Alt s tým rozdielom, že tieto vzorky boli odležané v chladničke po dobu 5 mesiacov. Bolo pozorované či má čas vplyv na stabilitu vzoriek. Pri emulziách O/V bolo pozorované jemné oddelenie fáz len pri jednej čistej emulzii O/V, ktorá bola odležaná približne po dobu 7 mesiacov. Toto oddelenie je viditeľné na obrázku 29. Ostatné vzorky sa javili ako stabilné aj po odležaní, čo je znakom, že emulzia O/V dodaná firmou má vhodné zloženie, ktoré by malo byť aj po dlhšom čase zostať stabilné. Vzorky emulzií V/O boli nestabilné už v predchádzajúcich meraniach a nie je tomu inak ani pri odležaných vzorkách. Je viditeľné, že došlo k výraznému oddeleniu fáz. V tomto prípade sa nedá posúdiť či má čas vplyv na stabilitu vzhľadom na to, že emulzie V/O boli stanovené ako nestabilné už v predchádzajúcich meraniach. Vzorky pesticího telového oleja a oleogelu rovnako ako v minulých meraniach zostali stabilné.

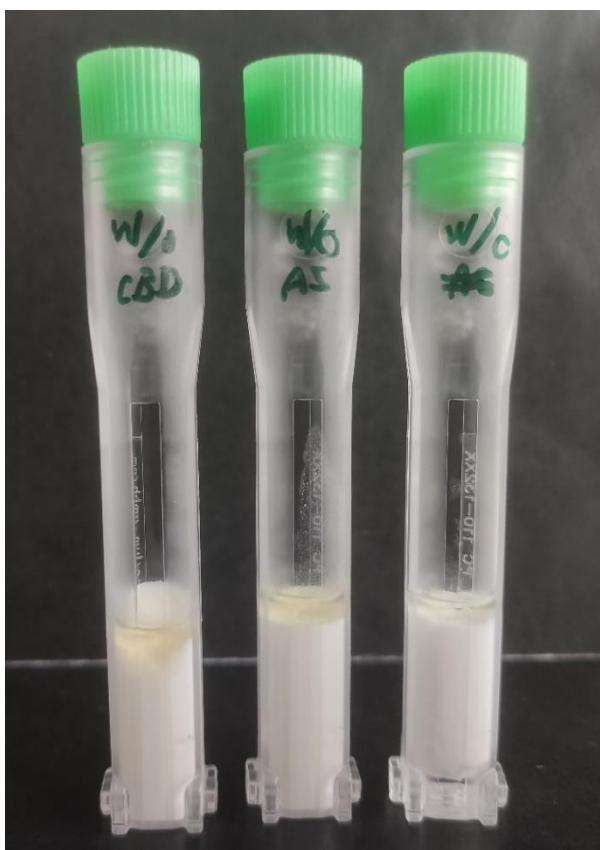
Odležané vzorky boli merané ako pri 25 °C, tak aj pri 45 °C. Meranie odležaných vzoriek dopadlo rovnako ako meranie disperzií priamo namiešaných pri 45 °C. V emulziách O/V aj V/O bolo pozorované výrazné oddelenie fáz, vzorky pesticího telového oleja a oleogelu zostali bez väčšej zmeny vo vzhľade.



Obrázok 17 - Vzorky odležaných emulzií O/V po odstredení pri 25 °C ; zľava - emulzia O/V, Asyntra CBD-Alt, CBD full spectrum, emulzia O/V



Obrázok 29 - Priblíženie na oddelené fázy v ľavej kvete s emulziou O/V



Obrázok 18 - Vzorok odležaných emulzií V/O po odstredení pri 25 ; zľava - CBD full spectrum, Asyntra CBD-Alt, emulzia V/O

Záverom meraní stabilität disperzií je, že z poskytnutých emulzií sa bola viac stabilná emulzia O/V. Tá si ponechala stabilitu aj po odležaní niekoľkých mesiacov a neovplyvnil ju ani prídavok olejov s aktívnymi látkami. Narozdiel od emulzie O/V, sa emulzia V/O v každom meraní javila ako nestabilný systém bez ohľadu na to či bola zmiešaná s olejmi obsahujúce aktívne látky alebo bola emulzia čistá. Nestabilita emulzie mohla byť spôsobená nevhodným zložením emulzie alebo nevhodnou voľbou surfaktantu či jeho pomerom v emulzii. Takáto nestabilita a oddeľovania fáz emulzií môže mať z dlhodobého hľadiska negatívny vplyv na transdermálnu difúziu aktívnych látok z emulzií. Aj keď pri difúzných experimentoch s Franzovými celami sa javili emulzie V/O ako stabilné, analytickou odstredivkou sa preukázala nestabilita. Stanovená nestabilita pomocou odstredivky je spoľahlivou indikáciou toho, že by postupom času emulzia podliehala nestabilným javom samovoľne bez vonkajšieho podnetu. Príkladom nestabilného javu, ktorý bol pozorovaný v meraní je krémovanie. Jedna fáza sa zhlukovala na povrchu emulzie, čo mohlo byť pozorované na viacerých vzorkách emulzie V/O. Tu hrozí, že ak sa fázy oddelia, aktívne látky sa budú nachádzať v tej fáze, v ktorej sú lepšie rozpustné a tým sa znemožní správne fungovanie difúzie cez kožu. Napriek tomu, že krémovanie je vratný dej, je taktiež prekurzorom pre koalescenciu, ktorá už vratná nie je a môže viesť až k úplnému oddeleniu jednotlivých fáz emulzie [56]. Čo sa týka stability, tak z meraní vyšiel najlepšie pesticíd telový olej a oleogel. Tie zostali stabilné napriek zvýšenej teplote a ich stabilita nebola ovplyvnená pridanými olejmi s aktívnymi látkami.

6 ZÁVER

Cieľom práce bolo uskutočniť transdermálnu difúziu pomocou Franzových ciel so syntetickými membránami Strat-M[®] a analýzu uvoľnených aktívnych látok touto difúziou. Difúzia prebiehala v dvoch opakovaníach pre všetky štyri dodané disperzie. Vzorky boli odoberané v trojhodinových intervaloch počas jedného dňa, pričom posledný odber prebehol 24 hodín od začatia experimentu.

Analýza množstva uvoľneného kanabidiolu bola stanovená metódou HPLC s diódovým detektorom. Množstvo uvoľneného bakuchiolu nebolo stanovené pre absenciu štandardu, ktorý nebol dodaný v stanovený termín. Keďže z výstupov HPLC pre kanabidiol nebola zaznamenaná jeho prítomnosť vo vzorkách, bolo potrebné pristúpiť k návrhom optimalizácie metód, ktoré sú popísané v kapitole 5.3. Medzi návrhmi bola zahrnutá možnosť zníženia koncentrácie kalibračných roztokov pre meranie HPLC, extrakcia zachytených aktívnych látok priamo z membrány a zmena receptorovej tekutiny pre Franzove cely.

Z merania stability pomocou analytickej odstredivky LUMISizer boli stanovené stability pre jednotlivé čisté disperzie a aj s aktívnymi látkami. Merania prebiehali pri teplote 25 °C a 45 °C. Z výsledkov boli oleogel a pesticídny telový olej stanovené ako najstabilnejšie disperzie. Ako najmenej stabilnou disperziou bola určená emulzia V/O, ktorej každé meranie ukazovalo vysokú nestabilitu. Nestabilita sa prejavovala na transmittančných profiloch a oddelením jednotlivých fáz po skončení merania. Bol skúmaný aj časový faktor na stabilitu disperzií, ten sa však iba čiastočne potvrdil na jednej vzorke emulzie O/V, ktorá bola odležaná po dobu 5 mesiacov.

Vzhľadom k neúspešnej analýze kanabidiolu a bakuchiolu, nie je možné porovnať výsledky z hľadiska uvoľneného množstva týchto látok pre jednotlivé disperzie. Avšak je možné spraviť toto porovnanie na základe ich stabilit a ich vzťahu k jednotlivým disperziám. Vzhľadom na stanovenú nestabilitu emulzie V/O, by sa dalo predpovedať, že by sa z tejto disperzie z dlhodobého hľadiska uvoľňovalo menej aktívnej látky. Tento jav by spôsobovali deje ako krémovanie či koalescencia. Oleogel aj pesticídny telový olej sa skladajú z lipidových látok, čo lipofilnými látkami ako kanabidiol a bakuchiol vyhovuje, pretože to zvyšuje ich rozpustnosť v prostredí. Môžeme predpokladať, že čím je lepšia distribúcia molekúl v prostredí, tým lepšie bude difúzia prebiehať.

Tým, že sa nepodarilo zrealizovať úspešnú transdermálnu difúziu a nebol k dispozícii štandard pre bakuchiol, záverom práce je odporúčenie na dodatočnú analýzu bakuchiolu a prevedenie optimalizovanej transdermálnej difúzie pomocou Franzových ciel.

7 CITÁCIE

- [1] BENSON, Heather. Skin Structure, Function, and Permeation. BENSON, Heather a Adam WATKINSON. *Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice*. 1st edition. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2012, s. 3-23. ISBN 978-0-470-45029-1.
- [2] HONARI, Golar. Skin Structure and Function. HONARI, Golar. *Sensitive skin syndrome*. Second Edition. Florida: CRC Press, 2017, s. 16-22. ISBN 978-1-4987-3734-0.
- [3] ROBERTS, Michael a Sheree CROSS. Skin Transport. WALTERS, Kenneth. *Dermatological and Transdermal Formulations* [online]. United States of America: Marcel Dekker, Inc., 2002, s. 102-192 [cit. 2022-04-22]. ISBN 0-8247-9889-9. Dostupné z: <https://oasis.iik.ac.id:9443/library/repository/805776fbfdf4324a49d1adb76baf11be.pdf>
- [4] STEVENS, Natalie a Allison COWIN. Overcoming the challenges of topical antibody administration for improving healing outcomes: a review of recent laboratory and clinical approaches. *Wound Practice and Research* [online]. 2017, **25**(4), 188-194 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/322517447_Overcoming_the_challenges_of_topical_antibody_administration_for_improving_healing_outcomes_a_review_of_recent_laboratory_and_clinical_approaches
- [5] PERTWEE, Roger. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews* [online]. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010, **62**(4), 588–631 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:0031-6997/10/6204
- [6] RITTER, James a Rod FLOWER. *RANG AND DALE'S PHARMACOLOGY* [online]. 9th edition. Elsevier, 2020 [cit. 2022-03-18]. ISBN 978-0-7020-7448-6. Dostupné z: https://www.academia.edu/44514656/RANG_AND_DALES_Pharmacology
- [7] SADANA, Rachna a Carmen DESSAUER. Physiological Roles for G Protein-Regulated Adenylyl Cyclase Isoforms: Insights from Knockout and Overexpression Studies. *Neurosignals* [online]. 2009, **17**(1), 5–22 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: doi:10.1159/000166277
- [8] IANNOTTI, Fabio, Vincenzo DI MARZO a Stefania PETROSINO. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and

- role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research* [online]. 2016, **62**, 107-128 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.002>
- [9] THAKUR, Ganesh. Methods for the synthesis of cannabinergic ligands. ONAIVI, Emmanuel. *Marijuana and Cannabinoid Research: Methods and Protocols* [online]. Second Edition. New Jersey: Humana Press Inc., 2006, s. 128-129 [cit. 2022-04-09]. ISBN 978-1-59259-999-8. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=Sc--9JeVUCwC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Marijuana+and+Cannabinoid+Research:+Methods+and+Protocols&ots=1gt6bIvwIN&sig=KHODWJod8KVpxR0eophlAUkaYpo&redir_esc=y#v=onepage&q=Marijuana%20and%20Cannabinoid%20Research%3A%20Methods%20and%20Protocols&f=false
- [10] DI SCALA, Coralie. Anandamide-ceramide interactions in a membrane environment: Molecular dynamic simulations data. *Data in Brief* [online]. 2017, **14**, 163-167 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.07.024>
- [11] FONSECA, B.M. Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* [online]. 2013, **102-103**, 13-30 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.02.002>
- [12] DIMARZO, Vincenzo. Anandamide: some like it hot. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2001, **22**(7), 346-349 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01712-0](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01712-0)
- [13] VAN DER STELT, Mario. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* [online]. 2005, **77**(1-4), 111-122 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.09.007>
- [14] FIŠAR, ZDENĚK. *ENDOKANABINOIDY* [online]. In: . [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_05_314-322.pdf
- [15] AIZPURUA-OLAIZOLA, Oier. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(1), 105-110 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.005>
- [16] BÍRÓ, Tamás. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2009, **30**(8), 411-420 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.004>

- [17] BUCHVALD, Dušan. Endokannabinoidný systém kože – nové poznatky a perspektívy terapeutického využitia. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2013, **7**(3), 123–126 [cit. 2022-04-12]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2013/03/05.pdf>
- [18] VANDOLAH, Harrison. Clinicians' Guide to Cannabidiol and Hemp Oils. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 2019, **9**(94), 1840-1851 [cit. 2022-05-16]. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.003](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.003)
- [19] KARLÍČKOVÁ, Jana. Potenciální léčebné využití kanabidiolu (CBD) z konopí setého. *PRAKTICKÉ LÉKÁRENSTVÍ* [online]. Solen, s.r.o, 2019, **15**(4), 227–230 [cit. 2022-05-16]. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2019/04/08.pdf>
- [20] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. 5. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2022-05-16]. ISBN 80-7080-579-X.
- [21] NOVÁK, Josef. Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz [online]. 2016, 1-696 [cit. 2021-06-23]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.view.pdf>
- [22] CHRISTOPHER, A.L. a B. DAWN. Pharmaceutical compounding and dispersing. 2nd edition. Cambridge: Pharmaceutical Press, 2008. ISBN 978-0-85369-912-5.
- [23] SARATHCHANDRAPRAKASH, N.K. Emulsions and emulsifiers. *The Asian Journal of Experimental Chemistry* [online]. 2013, **8**(1-2), 30-45 [cit. 2021-06-18]. Dostupné z: http://researchjournal.co.in/upload/assignments/8_30-45.pdf
- [24] BIBETTE, J. a F. LEAL CALDERON. Emulsions: Basic principles. *Reports on Progress in Physics* [online]. 1999, **62**(6), 969-1033 [cit. 2022-05-16]. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/62/6/203>
- [25] KHAN, Barkat Ali. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. Academic Journals, 2011, **5**(25), 2715-2725 [cit. 2021-06-18]. Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/AJPP>
- [26] SCHRAMM, Laurier. Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and application. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 35-273-0743-5.

- [27] CHAPPAT, M. Some applications of emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1994, 91, 57-77 [cit. 2022-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/0927-7757(94)02976-8
- [28] MANOHARAN, Chandrasekar a Ashwin BASARKAR. Various Pharmaceutical Disperse Systems. *Pharmaceutical Suspensions*. *New York: Springer New York*, 2010, s. 1-37. ISBN 978-1-4419-1086-8.
- [29] YAMASHITA, Yuji, Reiko MIYAHARA a Katuzami SAKAMOTO. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. 1st edition. USA: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-802005-0.
- [30] XU, Duoxia. The influence of flaxseed gum on the microrheological properties and physicochemical stability of whey protein stabilized β -carotene emulsions. *Food & Function* [online]. 2017, 8(1), 415-423 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.1039/C6FO01357K
- [31] LERCHE, D. a T. SOBISCH. MEASURING SOLID/LIQUID SEPARATION OF VISCOUS POLYDISPERSE SUSPENSIONS AT GRAVITY AND IN CENTRIFUGAL FIELD. *Particle and Slurry Characterization* [online]. 2019 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/337195470_MEASURING_SOLIDLIQUID_SEPARATION_OF_VISCOUS_POLYDISPERSE_SUSPENSIONS_AT_GRAVITY_AND_IN_CENTRIFUGAL_FIELD
- [32] ZIELIŃSKA, Aleksandra. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 553(1-2), 428-440 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.10.065
- [33] KOUROS, Alexis. CBD in cosmetics are now legal in the European Union. In: *Helsinki Times* [online]. Finland: Abyz Ou, 2021 [cit. 2022-04-21].
- [34] What You Need to Know (And What We're Working to Find Out) About Products Containing Cannabis or Cannabis-derived Compounds, Including CBD. In: *U.S. Food and Drug Administration* [online]. 2020 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/what-you-need-know-and-what-were-working-find-out-about-products-containing-cannabis-or-cannabis>
- [35] Materiály poskytnuté firmou [online]. [cit. 2022-05-16].
- [36] CHAUDHURI, Ratan. *Bakuchiol: A Retinol-Like Functional Compound, Modulating Multiple Retinol and Non-Retinol Targets*. *Cosmeceuticals and Active*

- Cosmetics [online]. Third Edition. Boca Raton, FL: Taylor and Francis Group, 2016, s. 1-15 [cit. 2022-03-08]. ISBN 978-1-4822-1417-8. Dostupné z: <https://rudiapt.files.wordpress.com/2017/11/cosmeceuticals-and-active-cosmetics-3rd-ed-2016.pdf>*
- [37] SIMON-LEVERT, Annabel. Marine Natural Meroterpenes: Synthesis and Antiproliferative Activity. *Marine Drugs [online]. 2010, 8(2), 347–358 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: doi:10.3390/md8020347*
- [38] JAFERNIK, Karolina. Characteristics of bakuchiol - the compound *with* high biological activity and the main source of its acquisition - *Cullen corylifolium* (L.) Medik. *Natural Product Research [online]. 2022, 35(6) [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2020.1837813*
- [39] CHAUDHURI, Ratan. Bakuchiol: a retinol-like functional compound revealed by gene expression profiling and clinically proven to have anti-aging effects. *International Journal of Cosmetic Science [online]. 2014, 36(3), 221-230 [cit. 2022-03-08]. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12117*
- [40] MCDANIEL, David. Efficacy and tolerability of a double-conjugated retinoid cream vs 1.0% retinol cream or 0.025% tretinoin *cream in subjects with mild to severe photoaging*. *Journal of Cosmetic Dermatology [online]. 2017, 16(4), 542-548 [cit. 2022-03-10]. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12381*
- [41] BARTOSOVA, a BAJGAR. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry [online]. 2012, 19, 4671-4677 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/230767581_Transdermal_Drug_Delivery_In_Vitro_Using_Diffusion_Cells*
- [42] SUDAM, Kharat. A Comprehensive Review on: Transdermal drug delivery systems. *International Journal of Biomedical and Advance Research [online]. 2016, 7(4), 147-159 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: doi:10.7439/ijbar*
- [43] PENDLINGTON, Ruth. In vitro percutaneous absorption measurements. CHILCOTT, Robert. *Principles and Practice of Skin Toxicology. Chichester: John Wiley & Son, 2008, s. 129-147. ISBN 978-0-470-51172-5.*
- [44] ZHANG, Yanling a Jennifer ROUSE. A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian *skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model*. *International Journal of Pharmaceutics [online]. 2019, (556), 142-149 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.11.065*

- [45] ZHANG, Yanling. A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian skin and in *the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay* (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2019, (556), 142-149 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.11.065
- [46] EL-KATTAN, Ayman. Transdermal testing: practical aspects and methods. *Pharmaceutical Science & Technology Today* [online]. 2000, 3(12), 426-430 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/S1461-5347(00)00316-3
- [47] PULSONI, Ilaria. Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Microphysiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. *SLAS Technology* [online]. 2022 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.slast.2021.12.006
- [48] NEUPANE, Rabin. Settings Open Access Review Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(2), 152-154 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12020152
- [49] Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation* [online]. Food and Drug Administration, 1997 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/media/71141/download>
- [50] HAQ, Anika. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 539(1-2), 58-64 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.01.029
- [51] BARKOVICH, Matthew. High Performance Liquid Chromatography. In: LibreTexts [online]. 2020 [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography)
- [52] MADEJ, Katarzyna a Gabriela KÓZKA. A Simple, Fast, and Green Oil Sample Preparation Method for *Determination of Cannabidioloic Acid and Cannabidiol* by HPLC-DAD. *Microextraction Techniques for Sample Preparation* [online]. 2020, 7(4), 60 [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: doi:10.3390/separations7040060
- [53] SHARKAWY, Asma. Pickering emulsions stabilized with chitosan/collagen peptides nanoparticles as green topical delivery vehicles for *cannabidiol* (CBD). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2021,

- (631) [cit. 2022-05-14]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775721015466#bib46>
- [54] FRELICHOWSKA, Justyna. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions. *International Journal of Pharmaceutics [online]*. 2009, 371(1-2), 56-63 [cit. 2022-05-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.12.017
- [55] BRONAUGH, Robert, ed. In Vitro Diffusion Cell Studies. RIVIERE, Jim. Dermal Absorption Models in *Toxicology and Pharmacology [online]*. First Edition. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006, s. 21-26 [cit. 2022-05-14]. ISBN 0-415-70036-1. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=QB5XbHAVUYAC&oi=fnd&pg=PA21&dq=franz+cell+diffusion+of+lipophilic+compounds&ots=yOo1FSrhb3&sig=vbJgDqS6cBIYmpPuP5E6sEX6JV8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [56] MAPHOSA, Yvonne, ed. Factors Affecting the Stability of Emulsions Stabilised by Biopolymers. KARAKUŞ, Selcan. *Science and Technology Behind Nanoemulsions [online]*. London: IntechOpen, 2018 [cit. 2022-05-15]. ISBN 978-1-78923-571-5. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/60140>
- [57] PubChem Compound Summary for CID 5468522, Bakuchiol. In: National Center for Biotechnology Information [online]. 2022 [cit. 2022-04-2]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bakuchiol>.

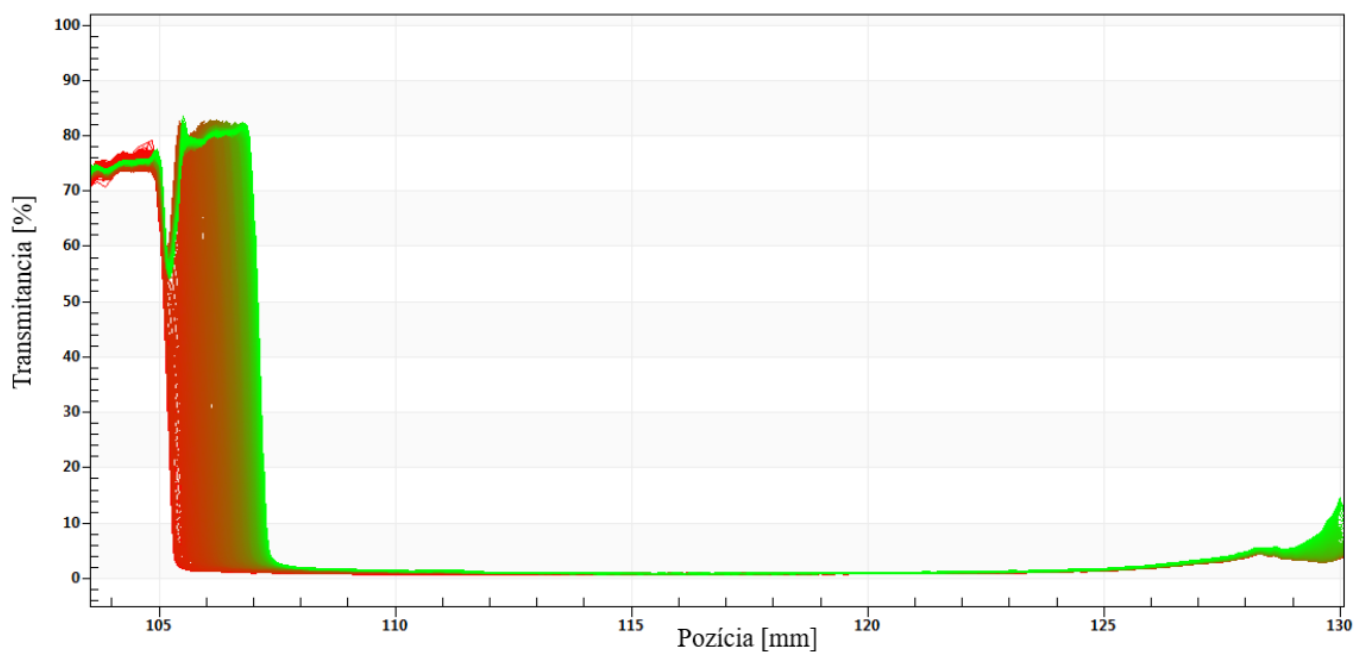
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

CB ₁	kanabinoidný receptor 1
CB ₂	kanabinoidný receptor 2
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
ECS	endokanabinoidný systém
O/V	emulzia typu olej vo vode
V/O	emulzia typu voda v oleji
AEA	anandamid
Δ^9 -THC	tetrahydrokanabionol
CBD	kanabidiol
UV	ultrafialové žiarenie
EIHA	Európska asociácia priemyselného konope
CosIng	Európska kozmetická databáza ingrediencií
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv v USA
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
FABP5	Proteín 5 spájajúci mastné kyseliny
FAAH	Amidhydroláza mastných kyselín

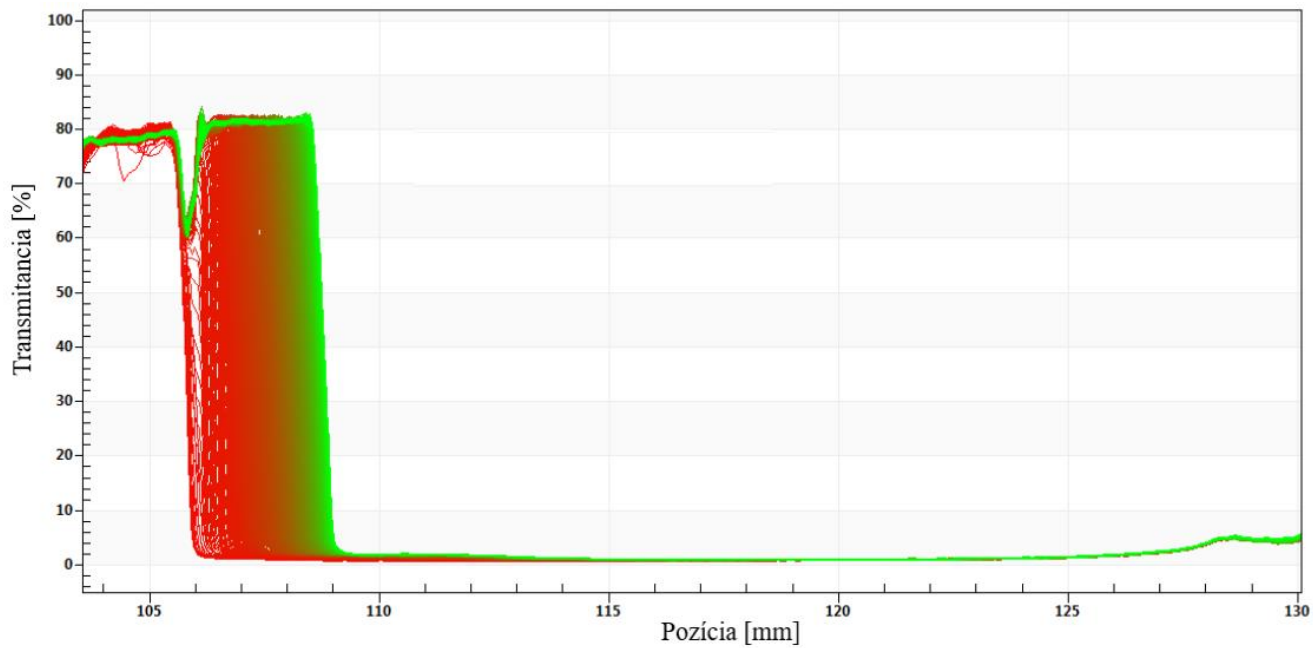
9 PRÍLOHY

Príloha 1 - Zloženie dodaného pěstičiho telového oleja

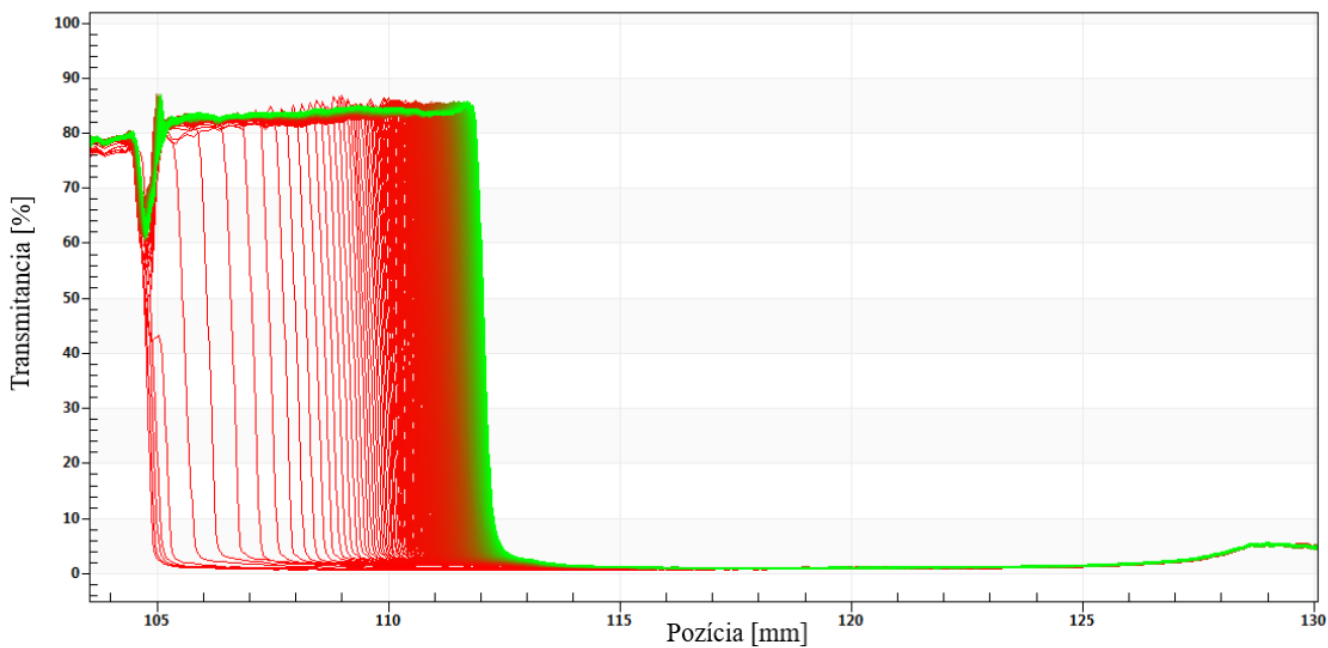
Složka	INCI názov
Slunečnicový olej	Helianthus Annuus Seed Oil
Vegelight	Coconut Alkanes
S-FACE	
Pupalkový olej	Oenothera Bienis Oil
Ovesný olej	Avena Sativa Kernel Oil
Měsíček v oleji	Calendula Officinalis Flower Extract and Helianthus Annuus Seed Oil
Vitamin E	Tocopheryl Acetate and Glycine Soja Oil
Vitamin A	Retinyl Palmitate
Lecitin	Lecithin



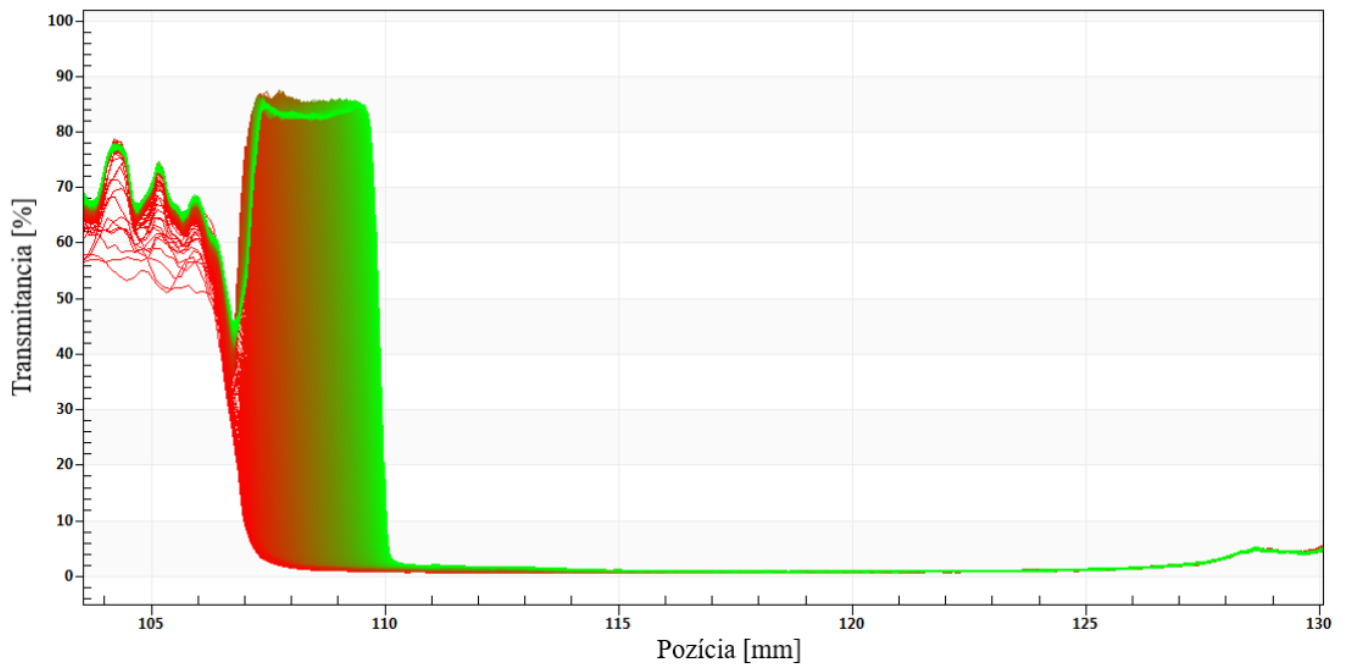
Príloha 2 - Vyhodnotenie stability emulzie O/V pri 45 °C



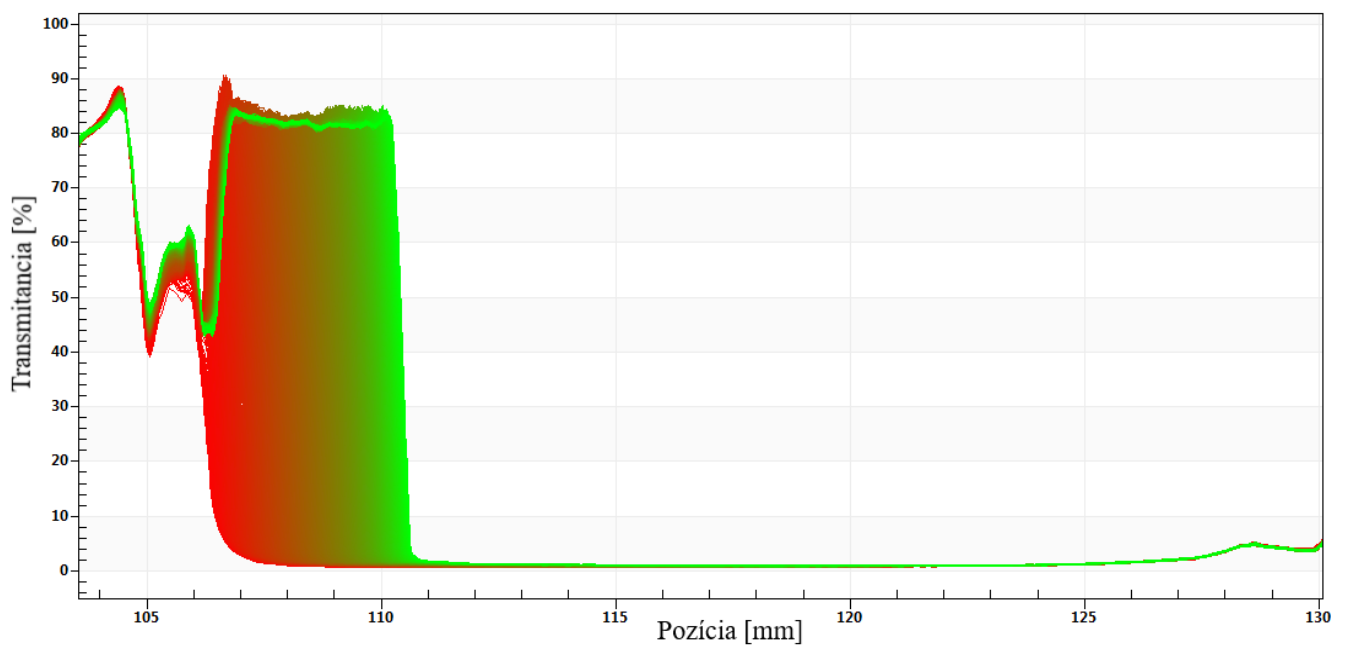
Priloha 19 – Vyhodnotenie stability emulzie O/V s CBD pri 45 °C



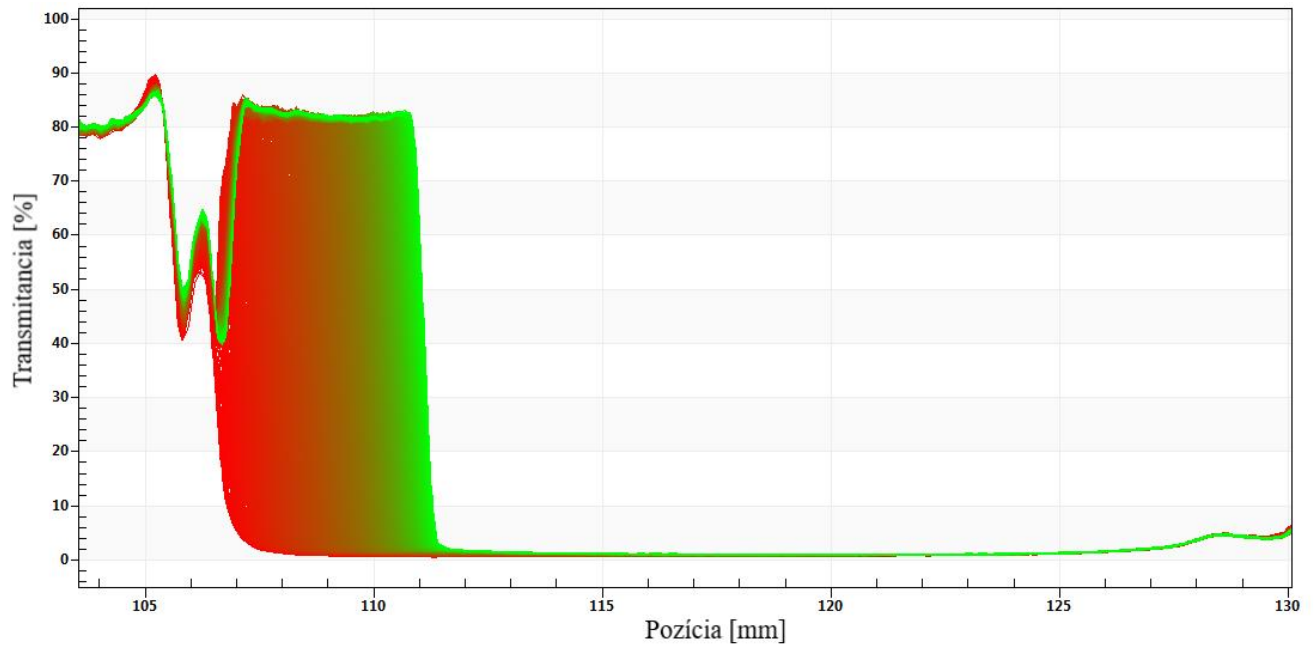
Priloha 20 - Vyhodnotenie stability emulzie O/V s Asyntrou CBD-Alt pri 45 °C



Príloha 21 - Vyhodnotenie stability emulzie V/O pri 45 °C



Príloha 22 - Vyhodnotenie stability emulzie V/O s CBD pri 45 °C



Príloha 23 - Vyhodnotenie stability emulzie V/O s Asyntrou CBD-Alt pri 45 °C