

PŘÍPRAVA CERTIFIKOVANÉ METODIKY TESTOVÁNÍ TRANSDERMÁLNÍ ABSORPCE CHEMICKÝCH LÁTEK *IN VITRO*

LENKA KOTINGOVÁ^a, ZORA NÝVLTOVÁ^b,
ZDEŇKA RÖSSLEROVÁ^b, LUCIE BÍŠKOVÁ^b,
JANA VOLKOVÁ^b, ALEŠ FÍBÍR^c, JAROSLAVA
KOŘÍNKOVÁ^d, LENKA MORAVCOVÁ^e
a PETRA PLODÍKOVÁ^b

^a Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav preventivního lékařství, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové, ^b Výzkumný ústav organických syntéz, 533 54 Rybitví 296, ^c Fakultní nemocnice Hradec Králové, Chirurgická klinika, Oddělení plastické a rekonstrukční chirurgie a léčby popálenin, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, ^d Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Studentská 573, 532 10 Pardubice, ^e Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Studentská 573, 532 10 Pardubice
kotingoval@lfhk.cuni.cz

Došlo 24.3.22, přijato 12.10.22.

Klíčová slova: kožní absorpce, *in vitro*, difuzní komůrky, lidská kůže, prasečí kůže, kofein, kyselina benzoová, testosteron

• <https://doi.org/10.54779/chl20220751>

Úvod

Člověk je v životním a pracovním prostředí exponován mnoha chemickým látkám. Aplikace nástrojů ochrany veřejného zdraví v posledních letech výrazně snížila úroveň inhalačních expozic a v mnoha případech se do popředí dostává expozice chemickým látkám dermální cestou. Informace o průniku látek do organismu touto cestou jsou ale málo známé. Na význam dermální expozice např. ukázal experiment, v němž byli dobrovolníci vystaveni parám asfaltu. Někteří jedinci byli exponováni pouze dermálně (dýchali s čistícím respirátorem) a jiní zároveň inhalačně a dermálně (dýchali bez respirátoru). Vyhodnocením výsledků výskytu metabolitů polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) bylo zjištěno, že 50–60 % vstřebaných PAU pochází z dermální expozice¹.

K získávání informací o dermální absorpci je možné použít různé laboratorní testy. Vzhledem k omezenému používání *in vivo* testů z etických důvodů jsou to v poslední době hlavně testy *in vitro*. Doporučení k jejich provádění vydalo mnoho organizací (např. WHO^{2,3}, OECD^{4,5}, Ev-

ropská unie⁶), doporučení jsou však obecná a jednotná metodika provádění testů chybí. Určitý návod poskytuje práce Diembecka a spol.⁷.

Cílem této publikace je představit první v ČR certifikovanou metodiku *in vitro* testů transdermální absorpce chemických látek (certifikována v systému Správné laboratorní praxe v březnu 2022) vyvinutou ve spolupráci VUOS Rybitví a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové tak, aby umožnila zájemci její použití v praxi. Zde představené informace jsou omezeny povoleným rozsahem článku, proto jsou bližší informace rozpracovány v Doplnku, který je přístupný na internetové stránce časopisu Chemické listy. Je zde blíže popsána příprava metodiky, možnosti a doporučení týkající se testů dermální absorpce *in vitro*, naše zkušenosti a různá úskalí, která se obvykle v člancích popisujících dermální absorpce *in vitro* nezmiňují, ale pro začínající experimentátory jsou velmi důležitá.

Experimentální část

Pomůcky, materiál, přístroje

Absorpční membrány: plná prasečí kůže z uší zakoupených na lokálních jatkách nebo komerčně (Xenometrix, Svýcarsko).

Přístroje: vertikální difuzní komůrky (Franzovy cely⁸, FDC) s absorpční plochou 1,77 cm² (více v Doplnku na internetu); aparatura zajišťující teplotu systému a míchání receptorové tekutiny (více v Doplnku); elektrický holicí strojek Silver Crest (zakoupen v Lidlu); přístroj na měření TEWL (MPA-5, Courage+Khazaka, Německo), přístroj k měření TER (TECPEL LCR 612, Tecpel Co, Taiwan); dotykový teploměr Oberflächen-Thermometer DOT 150 (Voltcraft, Conrad Electronic GmbH, Německo); kapalino-
vý chromatograf Shimadzu Nexera X2 s UV/VIS detekcí (Shimadzu, Japonsko).

Spotřební materiál: injekční stříkačky (Chirana 2 a 10 ml, B-Braun Inject F 1 ml), injekční jehly (Medoject 1,2 × 40 mm, B-Braun Sterican 0,80 × 120 mm), skleněné vialky (2 ml) s vloženými skleněnými inzerty (400 µl), plastovými víčky a silikon-gumovými septy (vše Agilent), chromatografické kolony Kinetex XB-C18, 2,6 µm, 100 × 4,6 mm 100 Å (Chromservis); InertClone 5 µm ODS(2) 150 Å, 150 × 4,6 mm (Phenomenex); Primesep D, 4,6 × 50 mm, 5 µm (SIELC).

Chemikálie: kofein, benzoová kyselina, testosteron, bovinní sérový albumin (BSA), trifluoroctová kyselina, acetonitril pro HPLC (vše od firmy Sigma-Aldrich); fyziologický roztok, roztok ethanol-voda 1 : 1, methanol pro HPLC (Biosolve), 98% kyselina mravenčí (Lach-Ner).

Metodika

Základem pro vytvoření certifikované metodiky byla doporučení OECD (číslo 428: Skin Absorption: *In vitro*



Obr. 1. Vzorek kůže odebraný ze zadní strany ušního boltce prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*)

method⁴ a číslo 156 – Guidance Notes on Dermal Absorption⁵), doporučení WHO (Environmental Health Criteria 235 – Dermal Absorption² a Environmental Health Criteria 424 – Dermal Exposure³), protokoly převzaté z prací Diembecka a spol.⁷ a van de Sandta a spol.⁹.

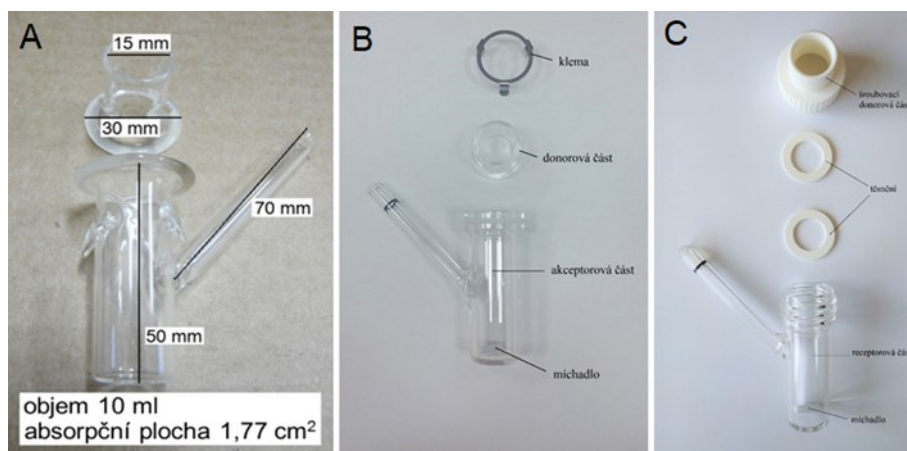
Jako testovací membrána byla použita prasečí kůže ze zadní strany ušního boltce. V laboratoři byly jednotlivé uši umyty teplou vodou a kosmetickým mýdlem, osušeny, oholeny elektrickým holicím strojkem a pomocí skalpelu a nůžek byla od chrupavky odpreparována kůže ze zevní dolní části zadní strany boltce (obr. 1). Získané kůže byly zabaleny do aluminiové folie a uskladněny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby použití. V testech byly používány kůže do 1 roku doby skladování a kůže byly používány v plné tloušťce.

K testování byly použity skleněné vertikální difuzní komůrky (tzv. Franzovy difuzní cely⁸, FDC, obr. 2) různých typů, blíže v Doplnku. Všechny měly velikost absorpční plochy $1,77\text{ cm}^2$ a v průběhu testování nebyl zjištěn žádný vliv typu komůrky na průběh absorpce, typ ko-

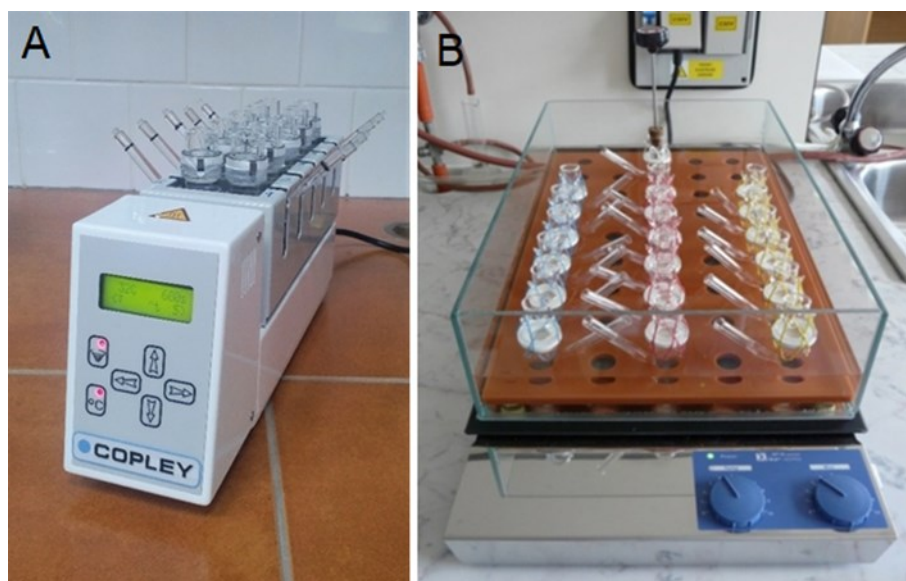
můrky spíše ovlivňoval manipulaci s kůží a náročnost hodnocení výsledků.

Před začátkem testu byly vzorky kůže šetrně rozmrazeny při pokojové teplotě, byla vybrána část bez poškození (oděrky, stroupky) a kožní membrány byly umístěny (nataženy) mezi donorovou a akceptorovou část epidermální stranou nahoru (do donorové části). Akceptorová část cely byla naplněna receptorovou tekutinou (RT; pro testy absorpce kofeinu a benzoové kyseliny byl použit fyziologický roztok, v testu s absorpcí testosteronu fyziologický roztok s přidávkem 5 % BSA) a bylo do ní vloženo magnetické míchadlo zajišťující pohyb receptorové tekutiny během experimentu (rychlost 600 rpm). Cely s vloženou kůží byly umístěny do aparatury (obr. 3) a ponechány 30–60 min hydratovat, aby se odstranilo mírné vysušení kůží vzniklé během skladování a plně obnovila kožní bariéra.

Následně byla integrita kůže hodnocena pomocí vizuální kontroly (kůže má být na povrchu mírně oschlá) a pomocí vyšetření transepidermální ztráty vody (TEWL) a transkutánní elektrické rezistence (TER). Vylučovacím kritériem byl TEWL vyšší než $15\text{ g/m}^2/\text{h}$ (cit.¹⁰) a TER nižší než $1,57\text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ (cit.¹¹), blíže viz Doplněk. Nevhovující vzorky byly vyměněny. Po kontrole přítomnosti vzduchových bublin pod membránou (přítomné bublinky odstraněny polohováním cely) bylo na povrch kůže (rovnoměrně po celém povrchu kůže) aplikováno $45\text{ }\mu\text{l}$ testovaného roztoku (kofein, benzoová kyselina nebo testosteron v koncentraci 4 mg ml^{-1} , rozpouštědlo voda/ethanol 1 : 1; aplikovaná dávka $25\text{ }\mu\text{l cm}^{-2}$), kontrolní cely byly ponechány bez aplikace testované látky. Všechny komůrky byly umístěny do temperované vodní lázně, která udržovala teplotu na povrchu kůže $32 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cit.⁴). Z akceptorové části cely bylo pak po celou dobu trvání pokusu odebíráno $0,5\text{ ml}$ RT (stříkačky B-Braun, jehla Sterican $0,80 \times 120\text{ mm}$, pro každou komůrku byla použita jiná stříkačka a jehla) v předem stanovených intervalech (základní intervaly byly 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 20 h, 24 h). Odebraná RT ve skleněných vialkách byla



Obr. 2. Difuzní komůrky (cely); A – vyrobená sklářem; B – cela s klipem od firmy Copley Scientific; C – cela se šroubením od firmy Copley Scientific



Obr. 3. Testovací aparatura; A – temperovaný magnetický míchací blok (Copley Scientific) s celami Copley; B – aparatura sestávající z temperované míchací magnetické desky (IKAMAG-RT 15) a sklářem vyrobené nádoby s držákem FDC (v zadní komůrce dotykový teploměr)

zamrzena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odebrané množství RT bylo vždy nahrazeno stejným množstvím nové (čisté) RT. Doba trvání pokusu byla pro certifikaci stanovena na doporučených 24 h (cit.⁴). Po ukončení pokusu byly jednotlivé části aparatury rozebrány, omyty a usušeny.

Experimenty probíhaly za běžné laboratorní teploty a tlaku v laboratořích Ústavu preventivního lékařství Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a na Oddělení analytiky Výzkumného ústavu organických syntéz (VUOS) Rybitví a byl při nich uplatněn stejný postup. Všechny odebrané vzorky receptorové tekutiny byly hodnoceny na jednom pracovišti (VUOS – Oddělení analytiky) metodou HPLC (kapalinový chromatograf Shimadzu Nexera X2 s UV/VIS detekcí).

Chromatografické podmínky stanovení kofeinu: kolona Kinetex XB-C18, $2,6\text{ }\mu\text{m}$, $100 \times 4,6\text{ mm}$ 100 \AA + předkolona; teplota $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; mobilní fáze A 25 % methanol; mobilní fáze B 75 % ultračistá voda; průtok 1 ml min^{-1} ; objem nástřiku $30\text{ }\mu\text{l}$; detekce 272 nm ; retenční čas $3,5\text{ min}$.

Chromatografické podmínky stanovení kyseliny benzoové: kolona InertClone $5\text{ }\mu\text{m}$ ODS(2) 150 \AA , $150 \times 4,6\text{ mm}$ + předkolona; teplota $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; mobilní fáze A/B = 50/50 (mobilní fáze A: 10 mM trifluoroctová kyselina/ultračistá voda; mobilní fáze B: 10 mM trifluoroctová kyselina/acetonitril); průtok $1,5\text{ ml min}^{-1}$; objem nástřiku $20\text{ }\mu\text{l}$; vlnová délka 240 nm ; retenční čas $1,78\text{ min}$.

Chromatografické podmínky stanovení testosteronu: kolona Primesep D, $4,6 \times 50\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ + předkolona; teplota $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; mobilní fáze 30/70/0,2 acetonitril/voda/kyselina mravenčí; průtok 1 ml min^{-1} ; objem nástřiku $30\text{ }\mu\text{l}$; detekce 243 nm ; retenční čas $5,5\text{ min}$. Chromatografické záznamy jednotlivých látek jsou prezentovány

v Doplnku na internetových stránkách časopisu Chemické listy (obr. 1–3 v Doplnku).

Ze získaných hodnot koncentrací testovaných látek v receptorové tekutině v daných časových intervalech byla spočtena absorpce látky v daných intervalech a podíl vstřebaného množství látky v poměru k aplikované dávce (použit počítačový program MS-Excel) a pomocí programu SAMPA¹² stanoveny základní parametry absorpce – flux (množství látky absorbované jednotkou plochy kůže za jednotku času v ustáleném stavu) a lag time (čas nutný k vytvoření ustáleného stavu).

Výsledky

Pro testování byly použity 3 látky s odlišnými absorpčními vlastnostmi – kyselina benzoová, kofein a testosteron.

První testovanou látkou byla kyselina benzoová. Vzhledem k jejím vlastnostem (molární hmotnost $122,12\text{ g mol}^{-1}$, $\log K_{O/W} = 1,87$; blíže viz Doplněk) probíhala její absorpce nejrychleji z námi testovaných látek. Celkem bylo provedeno 7 sérií pokusů absorpce této látky přes kůži prasečího ucha *in vitro*. Výsledky experimentů s absorpcí kyseliny benzoové (flux, lag time a množství vstřebané látky) jsou v tab. I, průběh absorpce (křivka z pokusů série 1) je vidět na grafu v obr. 4.

Druhou testovanou látkou byl kofein (molekulová hmotnost $194,19\text{ g mol}^{-1}$, $\log K_{O/W} = -0,07$). Celkem byly provedeny 3 série pokusů, výsledky ukazují tab. II a obr. 5.

Poslední testovanou látkou byl testosteron (molekulová hmotnost $288,42\text{ g mol}^{-1}$, $\log K_{O/W} = 3,32$).

Tabulka I
Výsledky transdermální absorpce kyseliny benzoové *in vitro* přes plnou kůži prasečího ucha

Pokus	n	Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]			Lag time [h]			Množství vsítěbané látky [%]					
		Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí	Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí	Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí
Série 1	8	39,7	38,7	13,4	20,1–60,5	0,3	0,4	0,1	0–0,5	94,8	97,3	11,5	75,6–108,6
Série 2	8	36,9	37,8	9,32	20,4–49,6	0,6	0,5	0,2	0,4–0,9	84,7	86,7	7,1	69,7–93,2
Série 3	8	13,4	14,3	3,78	8,66–18,4	0,1	0,1	0,1	0–0,3	20,4	20,8	2,6	16,2–24,0
Série 4	9	9,88	9,56	2,76	5,86–12,8	0,9	0,9	0,2	0,6–1,2	65,6	72,8	13,4	40,0–82,8
Série 5	8	4,37	4,33	1,56	2,31–6,39	1,8	1,8	0,6	1,2–2,8	56,2	58,1	12,8	40,0–75,0
Série 6	10	19,8	15,1	13,3	4,63–44,3	0,7	0,7	0,5	0–1,5	30,6	31,4	11,1	12,8–44,4
Série 7	8	17,9	18,8	8,31	7,21–30,9	1,6	0,9	2,4	0,1–7,3	73,3	81,7	15,8	48,3–90,6

^a Aritmetický průměr, ^b výběrová směrodatná odchylka

Tabulka II
Výsledky transdermální absorpce kofeinu *in vitro* přes plnou kůži prasečího ucha

Pokus	n	Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]			Lag time [h]			Množství vsítěbané látky [%]					
		Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí	Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí	Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí
Série 1	8	1,16	0,75	0,95	0,26–2,67	0,7	0,7	0,7	0–1,8	4,7	4,0	3,0	1,5–10,9
Série 2	9	6,33	6,72	3,99	1,27–11,5	0,9	1,0	0,7	0–1,9	34,7	36,0	15,9	7,6–61,2
Série 3	8	3,05	2,63	1,87	1,22–7,03	1,5	1,6	0,5	0,6–2,0	15,6	14,8	8,6	6,8–32,5

^a Aritmetický průměr, ^b výběrová směrodatná odchylka

Na kůži prasečího ucha byl proveden jen jeden pokus (dáno omezením činnosti laboratoří vzhledem k restriktivním opatřením v souvislosti s neplánovanou epidemií nemoci covid-19 a omezenou dobou trvání grantu). Vzhledem k jeho vlastnostem byla transdermální absorpce nejpomalejší, hodnoty vyšší než mez stanovitelnosti analytické metody byly pouze v posledních dvou odběrových časech, což neumožnilo sestavení křivky absorpce a výpočet charakteristik absorpce fluxu a lag time. Byly však též provedeny pokusy s absorpcí testosteronu přes jiné typy membrány (plná kůže prasečího břicha, plná lidská kůže), více viz Diskuse.

Důležitou podmínkou absorpce je zachování „sink conditions“ (viz Doplněk, kap. 3). Experimentálně zjištěná rozpustnost kyseliny benzoové ve fyziologickém roztoku byla $2,47 \text{ g l}^{-1}$, rozpustnost kofeinu $20,1 \text{ g l}^{-1}$ a rozpustnost testosteronu $0,23 \text{ g l}^{-1}$. Maximální naměřená koncentrace kyseliny benzoové v RT byla $24,9 \text{ mg l}^{-1}$, kofeinu $8,6 \text{ mg l}^{-1}$ a testosteronu $0,5 \text{ mg l}^{-1}$. „Sink conditions“ tudíž byly zachovány ve všech experimentech.

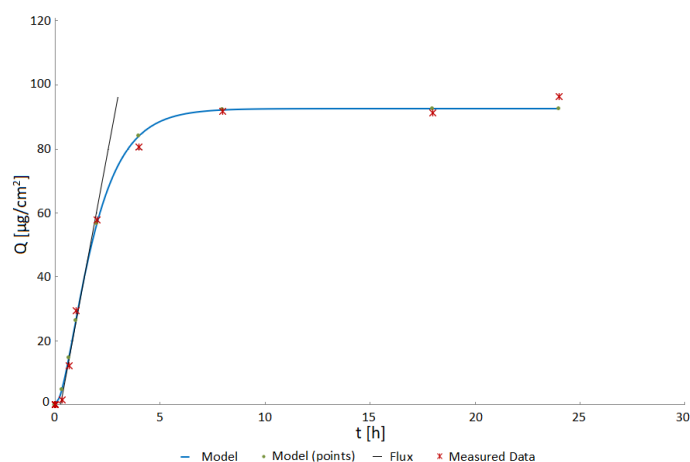
Diskuse

V současné době nejsou známy bližší informace o dermální absorpci většiny chemických látek, proto se při hodnocení zdravotních rizik posuzuje celých 100 % aplikované dávky za absorbovatelné (tzv. „konzervativní scé-

nář“)⁴, což v mnoha případech neodpovídá realitě. Vzhledem k omezenému používání zvířat v experimentech většina těchto informací (ať už pro pracovní nebo životní prostředí, kosmetický a farmaceutický průmysl) bude v budoucnu pocházet z testů *in vitro*. Jejich velký rozvoj začal v 90. letech minulého století, ale bohužel dodnes chybí jednotná metodika k provádění těchto testů, což bylo důvodem i této práce.

Aby bylo možné porovnat výsledky našich experimentů s jinými autory, byla jako vzor pro průběh testu zvolena mezilaboratorní studie provedená van de Sandtem a spol.⁹, která porovnávala absorpci benzoové kyseliny, kofeinu a testosteronu v 10 laboratořích používajících stejný protokol. Ve všech laboratořích byla používána koncentrace testovaných látek 4 mg ml^{-1} (stejná koncentrace byla použita v našich experimentech). Jednotlivá pracoviště používala různé difuzní komůrky (typ, velikost), získané vzorky RT byly hodnoceny centrálně. Doba trvání jejich pokusů byla 24 h (stejně jako v našich experimentech) a byly přesně dané intervaly odběrů RT. V 9 laboratořích používali lidskou kůži (různé tloušťky), v 1 laboratoři kůži potkana. Stručné výsledky studie van de Sandta a spol.⁹ na lidské kůži uvádí tab. III.

Použití lidské kůže pro komerční testování je problematické (z různých důvodů, blíže viz Doplněk, kap. 1), proto byla v námi vyvíjené metodice vybrána jako testovací membrána kůže prasečího ucha, která je lidské kůži

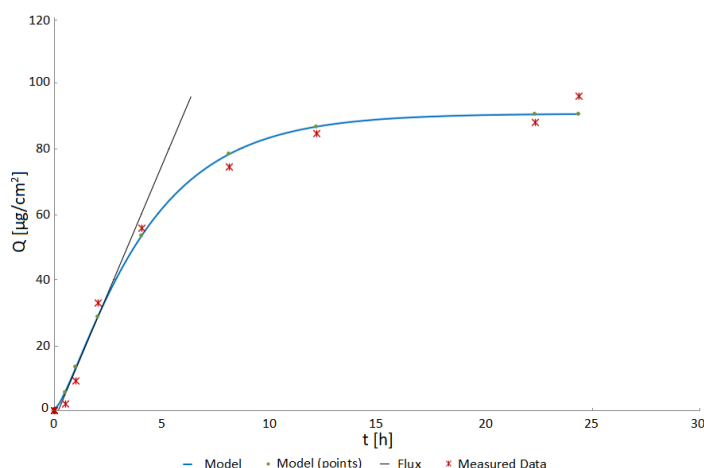


Obr. 4. Graf znázorňující průběh absorpce kyseliny benzoové přes plnou kůži prasečího ucha (pokus série 1, graf vytvořený programem SAMPA¹²; graf z aritmetických průměrů absorpce v jednotlivých FDC v daných časových intervalech)

Tabulka III

Výsledky transdermální absorpce kyseliny benzoové, kofeinu a testosteronu přes lidskou kůži dle van de Sandt a kol.⁹ (rozpětí výsledků získaných při testování transdermální absorpce *in vitro* přes lidskou kůži v 9 laboratořích)

Testovaná látka	Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]	Lag time [h]	Množství vstřebané látky [%]
Kyselina benzoová	2,87–38,2	0–3,5	30,1–102,5
Kofein	0,31–10,4	0,8–6,4	6,5–58,5
Testosteron	0,08–7,82	0,4–9,7	1,3–44,3



Obr. 5. Graf znázorňující průběh absorpce kofeinu přes plnou kůži prasečího ucha (pokus série 1, graf vytvořený programem SAMPA¹²; graf z aritmetických průměrů absorpce v jednotlivých FDC v daných časových intervalech)

svými vlastnostmi nejpodobnější¹³.

V našich experimentech na prasečí kůži byla v souladu s prací van de Sandt a spol.⁹ (na lidské kůži; viz tab. III) nejrychlejší absorpce kyseliny benzoové – v receptorové tekutině byla detekována již při prvním odběru RT (po 20 min) ve všech vzorcích a po zhruba 6–8 h se již její koncentrace v RT nezvyšovala, jak je dobře vidět na obr. 4. Průměrný lag time v našich jednotlivých experimentech byl v rozmezí 0,1–1,8 h (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 0–3,5 h). Průměrný flux v našich testech se pohyboval v rozmezí 4,37–39,67 µg/cm²/h (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 2,87–38,25 µg/cm²/h). Také absorpce do RT byla nejvyšší, v průměru bylo v RT nalezeno 17,6–94,8 % aplikované dávky (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 30,1–102,5 %). Kyselina benzoová tedy představuje model dobře penetrující hydrofilní látky s malou molekulovou hmotností. Při testování podobných látek lze potom dobu experimentu zkrátit (je doporučováno před vlastním testem látky s neznámými absorpčními vlastnostmi provést pilotní studii a podle jejích výsledků modifikovat dobu trvání testu a intervaly odběrů RT).

Detekovatelná množství kofeinu se v receptorové tekutině objevovala většinou po 1 h trvání absorpce a zvyšování koncentrace probíhalo po celých 24 h trvání pokusu, jak je vidět na obr. 5. Lag time byl v průměru 0,7–7,0 h (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 0,8–6,4 h), průměrný flux se v jednotlivých experimentech pohyboval v rozmezí 0,39–6,33 µg/cm²/h (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 0,31–10,4 µg/cm²/h) a v průměru bylo v RT nalezeno 3,9–34,7 % podané dávky kofeinu (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 6,5–58,5 %). Kofein tedy představuje model látky vhodný pro dobu trvání experimentu 24 h.

Nejpomalejší a nejnižší byla absorpce testosteronu. Při testu na kůži prasečího ucha po 24 h nedošlo k jeho absorpci do RT (resp. hodnoty koncentrace testosteronu nalezené pouze v posledních 1–2 odběrech RT neumožňovaly sestavení křivky absorpce). Testosteron tudíž předsta-

vuje model látky, která při použití plné kůže prasečího ucha vyžaduje delší dobu trvání testu než 24 h.

V našich experimentech byly též z důvodů testování vhodnosti a porovnání různých typů membrán provedeny testy s plnou kůží prasečího břicha a plnou lidskou kůží z břicha (tab. IV). V testech na prasečím břichu byla absorpce o něco vyšší, detekovatelná množství umožňující výpočet fluxu a lag time byla nalezená ve 4 komůrkách z 8 použitých. Při testech na lidské kůži byl testosteron nalezen ve všech 8 komůrkách. Detekovatelná množství se začínala objevovat po cca 6–8 h trvání absorpce a zvyšovala se po celou dobu trvání experimentu. Námí zjištěný průměrný lag time pro lidskou a prasečí kůži byl 2,5–3,8 h (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 0,04–9,7 h), flux 0,22–3,15 µg/cm²/h (van de Sandt a spol.⁹ uvádí 0,08–7,82 µg/cm²/h). Do RT se vstřebalo pouze mezi 1,4–2,4 % aplikované dávky (van de Sandt a spol.⁹ uvádí rozpětí 1,3–44,3 %). Námí zjištěné výsledky transdermální absorpce testosteronu *in vitro* na lidské a prasečí kůži korespondovaly s výsledky publikace van de Sandta a spol. pro lidskou kůži. Proto byly výsledky zjištěné v testu na kůži prasečího břicha a na lidské kůži zahrnuty do hodnocení a uznány při certifikaci metodiky jako důkaz funkčnosti modelu.

Rozšířená diskuse pojednávající o vlivu jednotlivých součástí testů transdermální absorpce chemických látek *in vitro* je náplní Doplňku na webových stránkách časopisu Chemické listy.

Závěr

Výstupem námí provedených experimentů je metodika pro provádění testů dermální absorpce chemických látek *in vitro*, která bude používána ve VUOS Rybitví a na Lékařské fakultě UK v Hradci Králové k získávání informací o penetraci různých látek v pracovním nebo životním prostředí a při testování kosmetických nebo léčivých pří-

Tabulka IV
Výsledky transdermální absorpce testosteronu *in vitro* přes plnou kůži prasečího břicha a plnou kůži lidského břicha

Membrána	n	Flux [$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$]		Ar. průměr ^a		Lag time [h]		Množství vsťebrané látky [%]					
		Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí	Ar. průměr ^a	Medián	VSO ^b	Rozpětí				
Prasečí břicho	4	3,15	2,62	1,76	1,67–5,70	2,5	2,4	0,4	2,1–3,0	2,4	2,8	1,5	0,2–3,6
Lidská plná	8	0,22	0,21	0,05	0,18–0,32	3,8	4,1	1,2	1,0–5,0	1,4	1,4	0,2	1,2–1,8

^a Aritmetický průměr, ^b výběrová směrodatná odchylka

pravků. Tato metodika – používající neznačené chemické látky a HPLC detekci – byla v systému Správné laboratorní praxe certifikována v březnu 2022.

Internetová verze této práce obsahuje navíc doplňující část. Pro vyhledání plné verze článku včetně příslušného *supplementu* je třeba otevřít aktuální webovou stránku Chemických listů.

Experimenty byly podpořeny grantem Technologické agentury ČR TH03010279 – In vitro kožní penetrace – optimalizace testovacích metod.

Seznam zkratek

BSA	bovinní sérový albumin
FDC	difuzní komůrky (Franz diffusion cells)
RT	receptorová tekutina
TER	elektrický odpor kůže (Transcutaneous Electrical Resistance)
TEWL	transepidermální ztráta vody (Transepidermal Water Loss)
VB	Velká Británie

LITERATURA

- Walter D., Knecht U.: *J. Occup. Environ. Hyg.* 4, 144 (2007).
- WHO, Environmental Health Criteria 235 – Dermal Absorption: 1. vyd., WHO Press, Geneva 2006.
- WHO, Environmental Health Criteria 424 – Dermal Exposure: 1. vyd., WHO Press, Geneva 2014.
- OECD (2004), Test No. 428: Skin Absorption: In vitro method: OECD Publishing, Paris.
- OECD (2019), OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 156 – Guidance Notes on Dermal Absorption: Draft Second Edition. https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/Guidance%20Notes%20Dermal%20Absorption%20156_Oct2019_clean.pdf, staženo 8. 3. 2022.
- EFSA a 12 spoluautorů: *EFSA Journal* 15, 4873 (2017).
- Diembeck W., Beck H., Benech-Kieffer F., Courtellemont P., Dupuis J., Lovell W., Paye M., Spelenger J., Steiling W.: *Food. Chem. Toxicol.* 37, 191 (1999).
- Franz T. J.: *J Invest Dermatol* 64, 190 (1975).
- van de Sandt a 17 spoluautorů: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 39, 271 (2004).
- Duracher L., Blasco L., Hubaud J. C., Vian L., Marti-Mestres G.: *Int. J. Pharmacol.* 374, 39 (2009).
- Davies D. J., Ward R. J., Heylings J. R.: *Toxicol. In Vitro* 18, 351 (2004).
- Bezrouk A., Fiala Z., Kotingová L., Krulichová I. S., Kopečná M., Vávrová K.: *Toxicol. In Vitro* 44, 361 (2017).
- Jacobi U., Kaiser M., Toll R., Mangelsdorf S., Audring H., Ostberg N., Sterry W., Lademann J.: *Skin. Res. Technol.* 13, 19 (2007).

L. Kotingová^a, Z. Nývltová^b, Z. Rösslerová^b, L. Bíšková^b, J. Volková^b, A. Fibír^c, J. Kořínková^d, L. Moravcová^e, and P. Plodíková^c (^a Charles University, Medical Faculty in Hradec Králové, Department of Preventive Medicine, ^b VUOS Rybitví, ^c University Hospital Hradec Králové, ^d University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Institute of Environmental and Chemical Engineering, ^e University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology): **Preparation of Certified Methodology for Testing Transdermal Absorption of Chemicals *in vitro***

This publication presents the preparation of a certified methodology for *in vitro* transdermal absorption testing of chemicals and highlights the various pitfalls in their implementation. Vertical diffusion cells (Franz cells) were used to test the dermal absorption of caffeine, benzoic acid, and testosterone across a penetration membrane (porcine ear skin), while the receptor fluid samples were evaluated by HPLC. The designed methodology was certified in 2022 in the Good Laboratory Practice system and will be used at the VUOS Rybitví and at the Medical Faculty of the Charles University in Hradec Králové to assess the dermal absorption of various substances in the environment and occupational surroundings.

Keywords: skin absorption, *in vitro*, diffusion cells, human skin, pig skin, caffeine, benzoic acid, testosterone

- Kotingová L., Nývltová Z., Rösslerová Z., Bíšková L., Volková J., Fibír A., Kořínková J., Moravcová L., Plodíková P.: Chem. Listy 116, 751–758 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220751>

Acknowledgements

This work was supported by grant from the Technology Agency of the Czech Republic (TA CR), Grant number: TH03010279.