

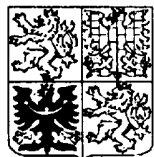
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 490

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2099-91**

(22) Přihlášeno: 08. 07. 91

(30) Právo přednosti:
17. 08. 90 DE 90/4026072

(40) Zveřejněno: 19. 02. 92

(47) Uděleno: 07. 12. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 01. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
A 61 K 31/21
A 61 K 9/12

(73) Majitel patentu:
SCHWARZ Pharma AG, Monheim/Rhld., DE;

(72) Původce vynálezu:
Klokkers-Bethke Karin, Rödermark, DE;
Münch Ulrich dr., Monheim/Rhld., DE;

(54) Název vynálezu:
**Vodný hydrofilní farmaceutický
přípravek ve formě spreje a způsob jeho
výroby**

(57) Anotace:
Přípravek obsahuje 0,15 až 0,50 % hmot. nitroglycerinu, 24,50 až 24,85 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % čištěné vody a je nastaven na pH 3 až 6. Vyrábí se tím, že se smísí 0,15 až 0,50 % hmot. nitroglycerinu, 24,50 až 24,85 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,0 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 3 až 6.

CZ 280 490 B6

Vodný hydrofilní farmaceutický přípravek ve formě spreje a způsob jeho výroby

Oblast techniky

Vynález se týká vodného hydrofilního farmaceutického přípravku ve formě spreje, obsahujícího nitroglycerin bez hnacího plynu, a způsobu jeho výroby.

Dosavadní stav techniky

Nitroglycerin, označovaný také jako glyceroltrinitrát (GTN), je účinnou látkou při léčení záchvatů, vyvolaných anginou pectoris. Mimo jiné se používá v nouzových situacích, při kterých musí forma léku umožnit rychlý nástup účinku.

Formy léků, používané při těchto speciálních indikacích, jako podjazykové tablety nebo rozkousnutelné kapsle, mají nedostatky. Mimo jiné je nevýhodné, že se u těchto forem léků musí účinná látka po užití nejdříve uvolnit a rozptýlit, dříve než je rozpuštěná k dispozici. Dále dochází ke zbytečné ztrátě času u akutního zvládnutí záchvatu, když se forma léku musí nejdříve vybalit a vyjmout.

Pro odstranění nedostatků těchto forem léků byly vyvinuty především spreje, obsahující GTN, které obsahují hnací plyn. Nastříkáním dávky, obsahující účinnou látku do úst, by se mělo umožnit přímé a rychlé nanesení roztoku účinné látky na co možná největší část sliznice úst, resorbující dobře účinnou látku GTN. Tím by se mělo dosáhnout velké plochy, která urychlí difuzi účinné látky.

Spreje, obsahující hnací plyn, mají ale řadu nedostatků. Nízké halogenalkány, používané jako hnací plyn, mají škodlivé účinky na životní prostředí. Do souvislosti je uváděno použití fluorchloruhlovodíků a zmenšení obsahu ozonu v horních vrstvách vzduchu. Řada zemí proto omezuje jejich použití jako hnacího plynu.

S ohledem na oblast použití sprejů s hnacím plynem, obsahujícím GTN, při léčení akutních záchvatů anginy pectoris, vykazují používané hnací plyny ten nedostatek, že mají vysušující účinek. Vzhledem k tomu, že ale při záchvatu anginy pectoris jsou ústa již beztoho vysušená, je vysušující účinek hnacích plynů obzvláště nepříznivý.

Na základě vlastností, specifických pro substanci GTN, je popsána řada preparátů, obsahujících nitroglycerin, které obsahují systém nosiče na bázi tuků nebo olejů.

Při tom je nevýhodné, že tyto preparáty musí obsahovat nejméně jeden konzervační prostředek, aby se triglyceridy nerozkládaly v obsažených mastných kyselinách, nebo aby se v nich neoxidovaly nebo nežlukly. Takovéto přísady jsou ale v léčivech nežádoucí nejen samy o sobě, nýbrž i s ohledem na jejich schopnost vyvolat alergie.

Dále lipofilní rozpouštědla zabraňují tomu, aby se účinná látka GTN rozptýlila v hydrofilní mukóze při akutních záchvatech anginy pectoris s požadovanou rychlostí.

V minulosti se pro zvýšení pohotovosti účinné látky u dávkovacích aerosolů, obsahujících hnací plyn, snižovalo množství použitých lipofilních rozpouštědel. Avšak doba náběhu, měřitelná pomocí maximální koncentrace v plazmě ($U_{\max}$) a časového okamžiku maximální koncentrace ($t_{\max}$) se ovlivnila jen nepatrně.

P.M. Dowland et al. (in Herz u. Gefäße, 1, 536-544 /1987/) získali sice u tří GTN-sprejů, vyrobených s lipofilními roztoky se snižujícím se množstvím lipofilních složek, receptury vyšší hodnoty $C_{\max}$ (tab. 1 na jiném místě), avšak $t_{\max}$ se nikdy významně nelišila.

Jiné východisko, jak zvýšit použitelnost účinné látky, je vysvětleno v DE 32 46 081.

U formulace, popsané v tomto dokumentu, se podíl hnacího plynu zvýší na 60 až 95 %, vztaženo na složky receptury.

Zvýšený podíl hnacího plynu působí při tom zvýšení koncentrace účinné látky v netěkavém, olejovém rozpouštědle.

Léčivo musí ale i nadále nejprve difundovat z olejového roztoku účinné látky do mukózy. Důležitý náběh působení účinné látky nemůže být tím ale v případě záchvatu nijak významně zkrácen. Z hlediska zvýšeného uvědomování si zatížení životního prostředí je zvýšený podíl hnacího plynu nepříznivý a proto je nutné se mu vyhnout.

Kvalitativně zřetelné zlepšení sprejů při záchvatu není při zachování lipofilních rozpouštědel v dávkovacích aerosolů, obsahujících hnací plyn, možné.

Dalším východiskem, týkajícím se rychlého rozptýlení účinné látky v hydrofilní mukóze, je použití rozpouštědla, které se směšuje s vodnou mukózou. Při formulaci tohoto spreje se musí dbát na to, aby toto rozpouštědlo dostatečně flegmatizovalo účinnou látku a aby se i technicky dalo při podmínkách výroby bezpečně ovládat.

US-PS 3,155 574 popisuje nitroglycerinovou formulaci spreje, obsahující hnací plyn, pro inhalaci na bázi hydrofilního rozpouštědla, obsahující účinnou látku GTN, 1,2-propandiol a bezvodý ethanol.

Inhalace je zbytečná, neboť se GTN dostatečně resorbuje sliznicí úst, což zvyšuje stejně jako resorpce redukcí first pass biopohotovost. Dále je pro pacienty velice obtížné při záchvatu inhalovat.

Zkoumání H. Laufena et al. v Therapiewoche 34, 963-970 /1994/ dospěla k výsledku, že v případě hydrofilní receptury je ve srovnání s GTN sprejem na lipofilní bázi jak objevení se účinné látky v krvi, tak i množství resorbované látky rychlejší,

popřípadě větší. Složení přípravku a dávkovací systém ale nebyly publikovány.

EP 0 310 910 popisuje hydrofilní formulaci GTN spreje, který neobsahuje fluoruhlovodíky a kromě účinné látky obsahuje jen ethanol a vodu jako rozpouštědlo.

Nevýhodou u této formulace je chybějící flegmatizace GTN. Jestliže se rozpouštědlo odpaří, přičemž zejména se sníží obsah ethanolu, pak se GTN vyloučí jako olejová fáze ve formě kapek na dnu lahve. Současně je u výše popsané formulace nezbytné použití GTN, rozpuštěného v ethanolu, a nevýhodou hořlavost a nebezpečnost této látky.

DE-OS 39 22 650 popisuje jako předmět vynálezu aerosolový preparát, obsahující nitroglycerin, prostý hnacího plynu, sestávající z účinné látky GTN a 51 až 90 % jednoho nebo více alifatických alkoholů se 2 až 4 atomy uhlíku, a 10 až 49 % polyalkylenglykolů, nebo 1 až 3mocných alkoholů, vykazujících 2 až 8 atomů uhlíku. Použitý dávkovací systém nebyl uveden.

U této formulace je dále nevýhodný vysoký obsah jednoho nebo více alifatických alkoholů se 2 až 4 atomy uhlíku. Stupeň odpaření alkoholu a těkavost složek receptury z běžně prodávaných dávkovacích čerpadel je vysoká, takže po delším nepoužívání spreje se složení mění a v případě záchvatu se nepoužívá složení, odpovídající farmaceutické formulaci, přítomné původně v zásobní nádobě. Konečně je vysoký rozdíl alkoholů nepříznivý i z ekonomických hledisek, neboť alkohol je drahá surovina.

Ve formulaci se používá také až 49 % polyalkylenglykolů. Ve farmaceutických přípravcích by se ale mělo, vždy když je to možné, upustit od polymerních nosičů, neboť obsahují nečistoty, jako molekuly urychlovače, dipolymery a tripolymery, jakož i zbytky katalyzátoru. Tyto nečistoty nejsou ve svém fyziologickém účinku zanedbatelné.

Dále vykazují formulace sprejů, obsahujících uvedený GTN podle stavu techniky ten nedostatek, že vydávají při výstřiku nejednotné množství a koncentrace účinných látek.

Vynález si klade za základní úlohu vytvořit při odstranění nedostatků stavu techniky, vodný, hydrofilní sprej, obsahující nitroglycerin, který neobsahuje žádný hnací plyn a zaručuje i po dlouhém stání v co nejkratší době dosažení terapeuticky účinné hladiny léčiva v krvi, a to i po opakovaném použití, jakož i způsob jeho výroby.

Podstata vynálezu

S překvapením bylo nyní zjištěno, že přípravek ve formě spreje, který podle vynálezu sestává z 0,15 až 0,50 % hmot. nitroglycerinu, 24,50 až 24,85 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a je nastaven na pH 3 až 6, vykazuje pro léčení záchvatu anginy pectoris co nejpríznivější farmaceutické chování s rychlým náběhem a vysokou biopohotovostí, přičemž přípravek je chemicky nanejvýš stabilní. I použití, prováděné po dlouhé prodlevě, nebo v krátkých časových

odstupech opakované použití zaručuje složení, odpovídající farmaceutickému přípravku. S ohledem na jeho definovaný obsah alkoholů nemusí být složení, přestože obsahuje vodu, konzervováno.

Z důvodů zvyšujících se alergií představuje tato forma další výhodu.

S výhodou obsahuje sprejový přípravek 0,30 % hmot. nitroglycerinu, 24,70 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody, a je nastaven na pH 6,0.

V dalším výhodném provedení obsahuje vodný hydrofilní farmaceutický přípravek podle vynálezu 0,40 % hmot. nitroglycerinu, 24,60 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,0 % hmot. čištěné vody a je nastaven na pH 6,0.

Přípravek podle vynálezu se může na základě svého definovaného, relativně nízkého tlaku páry, daného složením složek podle vynálezu, používat se systémy pro dávkování pomocí čerpadlového rozprašovače. Při tom bylo konstatováno, že o sobě známá výhoda nitroglycerinových sprejů, obsahujících PCKW, jako je nezávislost na prostoji po posledním použití s ohledem na spolehlivé dávkování, se neztratí.

Předmětem vynálezu je i způsob výroby sprejových formulací podle vynálezu, který je charakterizován tím, že se smísí 0,15 až 0,50 % hmot. nitroglycerinu, 24,50 až 24,85 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 3 až 6.

Při výhodném provedení se smísí 0,30 % hmot. nitroglycerinu, 24,70 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 6,0.

Podle jiné výhodné formy provedení se smísí 0,40 % hmot. nitroglycerinu, 24,60 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 6,0.

Příklady provedení vynálezu

Forma provedení spreje podle vynálezu je nastavena na pH 6 a vykazuje následující složení:

nitroglycerin	0,30 % hmot.
ethanol	24,70 % hmot.
1,2-propylenglykol	32,00 % hmot.
čištěná voda	43,00 % hmot.

Tento přípravek splňuje na základě svého kvalitativního a kvantitativního složení směsi požadavky kvality, kladené na léčivo. Ani při obvyklých zimních teplotách nedochází k vyloučení nitroglycerinu vlivem chladu.

Sprejová formulace podle vynálezu se může vyrábět způsoby a technologiemi, obvyklými při výrobě léků.

Získaný roztok se dá do vhodného primárního balení.

Dále se uvádějí příklady způsobu výroby přípravku:

Příklad 1

- a) 0,600 g roztoku glycerinu, obsahujícího propylenglykol, ve složení 30 mg nitroglycerinu a 570 mg 1,2-propylenglykolu, se smísilo se 2,50 g ethanolu, 2,630 g 1,2-propylenglykolu a 4,300 g čištěné vody a míchalo se až do dosažení homogenity. Potom se přikapávala 0,1 n kyselina solná až do dosažení hodnoty pH 6.

Získaný roztok se přefiltroval PVDF filtrem (s velikostí pórů 0,22 μm) firmy Millipore. Potom se roztok naplnil do hnědých skleněných lahví, na které bylo našroubováno dávkovací čerpadlo s rozprašovací hlavou.

- b) Alternativně se roztok může naplnit do aerosolové skleněné lahve, na kterou se nalisuje dávkovací čerpadlo s rozprašovací hlavou.

Příklad 2

- a) 0,600 g alkoholického roztoku nitroglycerinu ve složení 30 mg nitroglycerinu a 570 mg ethanolu se smísilo s 1,900 g ethanolu (Merck), 3,200 g 1,2-propylenglykolu a 4,300 g čištěné vody a míchalo se až do dosažení homogenity. Potom se přikapávala 0,1 n kyselina solná, dokud se nenastavila hodnota pH 6. Získaný roztok se přefiltroval PVDP filtrem (s velikostí pórů 0,22 μm) firmy Millipore. Potom se roztok naplnil do hnědé skleněné lahve, na kterou bylo našroubováno dávkovací čerpadlo s rozprašovací hlavou.

- b) Alternativně se může roztok naplnit do aerosolové skleněné lahve, na kterou se nalisuje rozprašovací hlava.

Příklad 3

- a) 0,800 g alkoholického roztoku nitroglycerinu ve složení 40 mg nitroglycerinu a 760 mg bezvodého ethanolu se smísilo s 1,700 g ethanolu (Merck), 3,200 g 1,2-propylenglykolu a 4,300 g čištěné vody a míchalo se až do dosažení homogenity. Potom se přikapávala 0,1 n kyselina solná, dokud se nedosáhla hodnota pH 6. Získaný roztok se přefiltroval přes PVDP filtr (velikost pórů 0,22 μm) firmy Millipore. Potom se roztok naplnil do hnědé skleněné lahve, na kterou bylo našroubováno dávkovací čerpadlo s rozprašovací hlavou.

- b) Alternativně se roztok může naplnit do aerosolové skleněné lahve, na kterou bylo nalisováno dávkovací čerpadlo s rozprašovací hlavou.

Sprej podle vynálezu má následující výhody:

- je příznivý pro životní prostředí, protože neobsahuje hnačí plyn,
- u uživatelů nevyvolává žádné alergie, protože neobsahuje konzervační látky,
- neobsahuje polymerní složky, takže nejsou přítomny žádné molekuly iniciátoru nebo zbytky katalyzátoru, jejichž fyziologický účinek není nezávadný,
- je vysoce odolný při skladování,
- po delším nepoužívání nebo po vícenásobném za sebou následujícím používání je zaručeno konstantní množství vynášené látky při konstantním složení.

Pozitivní vlastnosti spreje podle vynálezu byly potvrzeny farmakologickými zkouškami.

Při studii biopohotovosti bylo aplikováno 15 vyšetřovaným pacientům při namátkovém cross over 0,10 ml spreje A podle vynálezu, bezvodého přípravku spreje D, jakož i prodávané podjazykové tablety ve stejných dávkách a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 20, 30 minut po aplikaci byla určována krevní hladina. Běžně prodávaná podjazyková tableta Nitropen^R sestávala z 0,3 mg GTN a obvyklých pomocných látek pro tablety. Bezvodý sprej (B) měl složení 0,377 % hmot. glyceroltrinitrátu, 89,623 % hmot. ethanolu a 10,0 % hmot. 1,2-propylenglykolu. Sprej (A) vykazoval složení, popsané v příkladu provedení 2.

Výsledek studie biopohotovosti je uveden v tabulce 1:

Tab. 1 Farmakokinetické charakteristické údaje

	AUC (mg/ml)	C _{max} (mg/ml)	t _{max} (min)
podjazyková tableta	23,408	3,053	5,667
sprej (A)			
podle vynálezu	24,797	2,938	3,667
bezvodý sprej (B)	22,601	3,633	4,333

Ve farmakokinetické studii dosahuje nejkratší dobu náběhu (nejkratší t_{max}) sprej A podle vynálezu, zatím co podjazyková tableta má nejpomalejší dobu náběhu a nejdelší t_{max}. Bezvodý sprej B se pohybuje mezi oběma těmito formulacemi.

Výsledek této studie ukazuje, že rychlost náběhu je rozhodně ovlivnitelná překvapujícím způsobem pro účinnou látku vlastnostmi roztoku podle receptury, takže se u pacientů dosáhne při záchvatu rychlé odstranění bolesti.

S překvapením se ukázalo, že formulace A podle vynálezu při funkčních zkouškách s prodávanými dávkovacími rozprašovači s čerpadlem předčí formulaci B:

poloha spreje při skladování	ztráty odpařením během 50 dnů při teplotě místnosti	
	sprej (A) (mg) podle vynálezu	srovnávací sprej (mg)
vzprímená	3,6 ± 3,7	30,6 ± 26,1
ležící	12,2 ± 6,8	118,5 ± 37,6
postavený na hlavu	12,1 ± 7,5	58,9 ± 30,1

Sprej podle vynálezu vede k vysoké trvanlivosti léčiv v průběhu 3 let a k nepatrné ztrátě na hmotnosti asi 270 mg. Srovnávaný sprej B naproti tomu může utrpět během 3 let ztrátu na hmotnosti 2,6 g, a to zkracuje trvanlivost léčiva.

Při množství náplně asi 10 až 20 g roztoku (nádrž na sprej) lze dosáhnout dostatečnou stabilitu léčiva jak z kvalitativního, tak i kvantitativního hlediska pouze s roztokem A podle vynálezu.

Na dávkovací rozprašovač roztoků s čerpadlem pro vitální indikaci, jako léčení záchvatu anginy pectoris, jsou kladeny obzvláštní požadavky: v protikladu například k dezinfekčním prostředkům a podobným prostředkům musí být zaručeno disponování dávkou i po přestávce po posledním použití spreje. Nejčastějšími obvykle prodávanými dávkovacími čerpadly je nutné po určité době jejich nepoužívání, například po době pouhého jednoho dne, vícekrát zapumpovat, neboť obsah dávkovací komory není uzavřen a bez zábrany se vypařuje. U dávkovacího čerpadla, které konstrukčně uzavírá obsah dávkovací komory, může pumpování po prostoji odpadnout.

Požadavek možnosti aplikovat nezávisle na době trvání, po kterou se sprej nepoužívá, po posledním použití plnou dávkou při prvním výstřiku lze s roztokem A podle vynálezu dosáhnout; neboť navzdory uzavěru dávkovací komory může docházet v závislosti na povrchovém pnutí roztoku, který se má dávkovat, v závislosti na jeho tlaku par a jeho účinku vzdouvání nebo nevzdouvání na částech čerpadla, k odpařením. To platí v obzvláštní míře pro běžné formulace sprejů.

Srovnávací zkoušky mezi formulacemi A podle vynálezu a běžnými formulacemi sprejů doložily, že formulací A podle vynálezu se i po 36 dnech, kdy nebyl používán, dosáhlo požadované oblasti dávkování v prvním rázovém střiku.

Toto činí 81,8 % ± 6,8 % průměrného vynášeného množství, což bylo zjištěno u 12 (dvanácti) dávkovacích sprejů.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Vodný hydrofilní farmaceutický přípravek ve formě spreje, obsahující nitroglycerin a jednu nebo více obvyklých pomocných látek, pro léčení srdečních a oběhových onemocnění a preklampsie, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přípravek obsahuje 0,15 až 0,50 % hmot. nitroglycerinu, 24,50 až 24,85 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a je nastaven na pH 3 až 6.
2. Vodný hydrofilní farmaceutický přípravek ve formě spreje, obsahující nitroglycerin a jednu nebo více obvyklých pomocných látek, pro léčení srdečních a oběhových onemocnění a preklampsie podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přípravek obsahuje 0,30 % hmot. nitroglycerinu, 24,70 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a je nastaven na pH 6,0.
3. Vodný hydrofilní farmaceutický přípravek ve formě spreje, obsahující nitroglycerin a jednu nebo více obvyklých pomocných látek, pro léčení srdečních a oběhových onemocnění a preklampsie podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že přípravek obsahuje 0,40 % hmot. nitroglycerinu, 24,60 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a je nastaven na pH 6,0.
4. Způsob výroby vodného hydrofilního farmaceutického přípravku ve formě spreje, obsahujícího nitroglycerin a jednu nebo více obvyklých pomocných látek, pro léčení srdečních a oběhových onemocnění a preklampsie podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se smísí 0,15 až 0,50 % hmot. nitroglycerinu, 24,50 až 24,85 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 3 až 6.
5. Způsob výroby vodného hydrofilního farmaceutického přípravku ve formě spreje, obsahujícího nitroglycerin a jednu nebo více obvyklých pomocných látek, pro léčení srdečních a oběhových onemocnění a preklampsie podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se smísí 0,30 % hmot. nitroglycerinu, 24,70 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 6,0.
6. Způsob výroby vodného hydrofilního farmaceutického přípravku ve formě spreje, obsahujícího nitroglycerin a jednu nebo více obvyklých pomocných látek, pro léčení srdečních a oběhových onemocnění a preklampsie podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se smísí 0,40 % hmot. nitroglycerinu, 24,60 % hmot. ethanolu, 32,00 % hmot. 1,2-propylenglykolu a 43,00 % hmot. čištěné vody a získaný roztok se nastaví kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou solnou, na pH 6,0.

Konec dokumentu
