

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Monitorování potenciálních endokrinních disruptorů a jejich karcinogenních
produktů přítomných v opalovacích krémech

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal Kodytek**
Osobní číslo: **C22289**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Monitorování potenciálních endokrinních disruptorů a jejich karcinogenních produktů přítomných v opalovacích krémech**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši zaměřenou na rizika používání konvenčních opalovacích krémů a na charakteristiku a stanovení škodlivých látek v nich přítomných.
- V rámci experimentální části nalezněte vhodnou extrakční techniku pro izolaci těchto látek z opalovacích krémů a dále optimalizujte jejich efektivní a rychlé stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.
- Nalezené optimální podmínky využijte pro analýzu reálných vzorků opalovacích krémů.
- Dosažené výsledky diskutujte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jitka Klikarová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Monitorování potenciálních endokrinních disruptorů a jejich karcinogenních produktů přítomných v opalovacích krémech jsem vypracoval(a) samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 8.5.2024

Bc. Michal Kodytek

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval vedoucí diplomové práce Ing. Jitce Klikarové, Ph.D. za rady, odborné vedení, čas věnovaný této práci a především trpělivost. Poděkování patří také mé rodině a přítelkyni za psychickou podporu během studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá analýzou nejběžnějších a zároveň nejdiskutovanějších ultrafialových filtrů přítomných v přípravcích na opalování, a to pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Teoretická část je věnována především charakteristice ultrafialových filtrů a možným problémům spojených s jejich používáním, ale také možnostem jejich stanovení. Experimentální část je věnována optimalizaci jejich extrakce a chromatografické separace. Zkoumána je také fotochemická stabilita oktokrylenu a míra jeho potenciální prostupnosti kůží do krevního řečiště.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oktokrylen, homosalát, UV filtry, endokrinní disruptor, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TITLE

Monitoring of potential endocrine disruptors and their carcinogenic products present in sunscreens

ANNOTATION

This thesis deals with the analysis of the most common and most discussed ultraviolet filters present in sunscreen products by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. The theoretical part is mainly devoted to the characteristics of ultraviolet filters and possible problems associated with their use, but also to the possibilities of their determination. The experimental part is devoted to the optimization of their extraction and chromatographic separation. The photochemical stability of octocrylene and the extent of its potential permeability through the skin into the bloodstream are also investigated.

KEYWORDS

Octocrylene, homosalate, UV filters, endocrine disruptor, high-performance liquid chromatography

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD	14
1. Teoretická část	15
1.1 Opalovací krémy	15
1.1.1 Vývoj opalovacích krémů	15
1.1.2 Ultrafialové filtry	18
1.1.3 Legislativní požadavky na opalovací krémy	19
1.1.4 Opalovací krémy pro děti	19
1.2 Rizika spojená s používáním opalovacích krémů	20
1.2.1 Kožní absorpce UV filtrů	20
1.2.2 Ovlivnění endokrinního systému	20
1.2.3 Nestabilita UV filtrů	21
1.2.4 Enviromentální dopady	22
1.3 Oktokrylen	23
1.3.1 Příprava oktokrylenu.....	23
1.3.2 Čistota a stabilita oktokrylenu	25
1.3.3 Toxicita oktokrylenu.....	26
1.3.4 Alergie na oktokrylen	27
1.4 Homosalát	28
1.4.1 Toxicita homosalátu.....	28
1.4.2 Alergie na homosalát	29
1.5 Další často používané UV filtry.....	29
1.6 Chromatografické stanovení UV filtrů	30
1.6.1 Příprava vzorku k analýze.....	30

1.6.2 Podmínky HPLC separace	32
1.6.3 České normy pro monitoring rozkladu a stanovení UV filtrů	32
1.7 Liberační testy.....	33
2. Experimentální část.....	35
2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky.....	35
2.2 Použité chemikálie a rozpouštědla.....	37
2.3 Chromatografické stanovení vybraných UV filtrů	38
2.3.1 HPLC analýza	38
2.3.2 Kvalitativní analýza standardů UV filtrů.....	38
2.3.3 Příprava kalibrační křivky	38
2.3.4 Analýza vzorků	38
2.4 Validace metody	40
2.4.1 Návratnost.....	40
2.4.2 Opakovatelnost	41
2.4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti	42
2.5 Liberační testy oktokrylenu	42
2.5.1 Příprava octanového pufru.....	43
2.5.2 Příprava kalibračních roztoků.....	43
2.5.3 Podmínky měření sekvenční injekční analýzy spojené s Franzovou difúzní celou.....	43
2.5.4 Pracovní postup liberace	44
2.6 Stanovení fotostability oktokrylenu.....	44
2.7 Zpracování experimentálních dat.....	45
3. Výsledky a diskuse	46
3.1 Optimalizace chromatografické separace	46
3.2 Validace chromatografické metody	49
3.2.1 Příprava kalibrační křivky	49
3.2.2 Návratnost metody	51

3.2.3 Opakovatelnost metody	51
3.2.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti	52
3.3 Stanovení UV filtrů.....	52
3.4 Stanovení fotostability oktokrylenu.....	56
3.5 Liberační testy oktokrylenu	58
ZÁVĚR	63
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
PŘÍLOHA	76

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Symbol UV-A ochrany [9].....	17
Obrázek 2 Prostupnost UV záření kůží (upraveno) [12]	18
Obrázek 3 Syntéza OC [34–38].....	24
Obrázek 4 Schéma retro-aldolové reakce [31]	25
Obrázek 5 Tři hlavní metabolity oktokrylenu (OC) [43].....	27
Obrázek 6 Syntéza homosalátu [49]	28
Obrázek 7 Graf frekvence obsahu všech nalezených 24 UV filtrů (přeloženo a upraveno) [58]	30
Obrázek 8 Schéma SIA systému s Franzovou celou [76; 78].....	34
Obrázek 9 SIA systém s Franzovou celou uloženou ve vodní lázni s víkem	36
Obrázek 10 Franzova cela.....	37
Obrázek 11 Způsob roztírání vzorku na destičku (upraveno) [83].....	45
Obrázek 12 UV/VIS spektra roztoků standardů sledovaných UV filtrů o koncentraci 10 % v acetonitrilu	47
Obrázek 13 Optimalizovaná HPLC separace všech pěti cílových analytů.....	48
Obrázek 14 Kalibrace EHS, BF a OC.....	50
Obrázek 15 Kalibrace OB a HMS	50
Obrázek 16 Graf UV filtrů obsažených v jednotlivých vzorcích s naznačenými maximálními povolenými limity.....	54
Obrázek 17 Příklad HPLC separace vzorku č. 7 s deklarovaným obsahem OC a EHS.....	55
Obrázek 18 Změny koncentrace OC standardu a OC přítomného ve vzorku č. 2 a 6 po ozáření v UV boxu UVITEC	56
Obrázek 19 Změny koncentrace OC standardu a OC přítomného ve vzorku č. 2 a 6 po ozáření v UV boxu Desaga.....	57
Obrázek 20 Změny koncentrace OC standardu a OC přítomného ve vzorku č. 2 a 6 po ozáření pod lampou Philips	57
Obrázek 21 Kalibrace OC pro liberační testy	59
Obrázek 22 Liberace OC do octanového pufru sledovaná po dobu 120 minut.....	60
Obrázek 23 Liberace OC do octanového pufru sledovaná po dobu 90 minut.....	61
Obrázek 24 Liberace OC do octanového pufru s 10 % ethanolu sledovaná po dobu 105 minut	61

Tabulka 1 Analyzované produkty na opalování	39
Tabulka 2 Parametry SIA systému	43
Tabulka 3 Návratnost metody	51
Tabulka 4 Intradenní a mezidenní opakovatelnost	52
Tabulka 5 Meze detekce a stanovitelnosti	52
Tabulka 6 Analýza vzorků.....	53
Tabulka P 1 Návratnost metody.....	76
Tabulka P 2 Intradenní a mezidenní opakovatelnost benzofenonu	76
Tabulka P 3 Intradenní a mezidenní opakovatelnost oxybenzonu	77
Tabulka P 4 Intradenní a mezidenní opakovatelnost oktokrylenu.....	77
Tabulka P 5 Intradenní a mezidenní opakovatelnost ethylhexylsalicylátu.....	78
Tabulka P 6 Intradenní opakovatelnost homosalátu	78
Tabulka P 7 Mezidenní opakovatelnost homosalátu	79

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

5OH-OC	2-ethyl-5-hydroxyhexyl-2-kyano-3,3-difenyl akrylát
BF	benzofenon
BMBM	avobenzon
COLIPA	Evropská asociace kosmetiky, toaletních potřeb a parfumerie
CPAA	2-kyano-3,3-difenylakrylová kyselina
DBT	iskotrizinol
DHMB	parsol diethylaminohydroxybenzoylhexyl benzoát
DOCAA	2-(karboxymethyl)butyl 2-kyano-3,3-difenyl akrylát
DPDT	Neo Heliopan AP
DTS	Mexoryl XL
ED	endokrinní disruptor
EHMC	oktinoxát
EHS	ethylhexyl salicylát
EHT	ethylhexyl triazon
EK	Evropská komise
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
HMS	homosalát
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IMC	amiloxát
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MBC	enzacamen
OB	oxybenzon

OC	oktokrylen
PABA	para-aminobenzoová kyselina
PBSA	ensulizol
PMMA	polymethylmetakrylát
PS15	polysilikon-15
PTFE	polytetrafluorethylen
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SCCS	Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SIA	sekvenční injekční analýza
SPF	faktor ochrany proti slunci (Sun Protection Factor)
TBPT	tris-bifenyl triazin
TDSA	ecamsul
UV-A	ultrafialové záření A
UV-B	ultrafialové záření B

ÚVOD

Diplomová práce s názvem *Monitorování potenciálních endokrinních disruptorů a jejich karcinogenních produktů přítomných v opalovacích krémech* se zaměřuje na charakteristiku a stanovení vybraných ultrafialových (UV) filtrů v přípravcích na opalování. UV filtry jsou látky organického nebo anorganického původu sloužící jako ochrana před působením škodlivého UV záření. Okolo některých UV filtrů organického původu vznikají v současné době otázky ohledně jejich bezpečnosti pro lidské zdraví i pro životní prostředí, kde se hromadí a mají tak nezanedbatelný ekologický dopad. Diskuse probíhá i okolo produktů těchto UV filtrů, které by mohly vznikat vlivem jejich případné fotosenzibility.

Tato práce si klade za cíl vytvořit literární rešerši týkající se běžně používaných UV filtrů v kosmetickém průmyslu, jejich historii, mechanismu účinku, potenciálních zdravotních rizik a analytického stanovení, včetně možností extrakce z jejich matrice. V rámci experimentální části byla vyvinuta jednoduchá a rychlá chromatografická metoda simultánního stanovení čtyř nejdiskutabilnějších UV filtrů a jednoho vedlejšího karcinogenního produktu, vedoucí k posouzení dodržování jejich maximálních povolených množství v komerčních výrobcích, jež bylo ustanoveno Evropskou komisí. Zároveň byla provedena studie zaměřená na ověření fotostability oktokrylenu při jeho expozici slunečnímu a UV záření a kinetika liberace oktokrylenu přes modelovou membránu imitující lidskou kůži.

1. Teoretická část

1.1 Opalovací krémy

Opalovací krémy jsou součástí naší společnosti od doby, kdy si člověk uvědomil potřebu chránit svou pokožku proti škodlivým vlivům slunečního záření, jako je například předčasné stárnutí kůže, vznik erytému a spálení. Přípravky na ochranu proti slunečnímu záření obsahují účinné látky, které mohou být organického nebo anorganického charakteru. Aby byl opalovací krém co nejúčinnější, musí absorbovat nebo rozptylovat záření v širokém spektrálním rozsahu. Obecně platí, že organické ultrafialové (UV) filtry (například homosalát či oktokrylen) absorbované UV záření přeměňují na neškodnou tepelnou energii (absorpcí UV záření se fotoexcitují a přebytečnou energii ultrarychlými relaxačními cestami uvolňují později). Anorganické UV filtry (například oxid titaničitý či oxid zinečnatý) pak sluneční záření nejen absorbují, ale také odrážejí či rozptylují [1–3]. UV záření je těmito filtry převážně absorbováno (odraz je řádově menší než <5 %), zatímco viditelnou část spektra tyto látky významně odráží. Účinnost anorganických filtrů závisí na několika proměnných, jako je velikost částic (čím menší, tím účinnější) a jejich rozptýlení v emulzi, množství použitého opalovacího krému a index lomu jednotlivých UV látek [1; 4]. Spousta opalovacích krémů přitom obsahuje kombinaci obou druhů filtrů, aby poskytovaly ochranu v co nejširším spektru. Ačkoliv jde o látky, které mají chránit člověka před škodlivým zářením, v současné době vyvstává kolem jejich používání řada otázek, a to v souvislosti s jejich možnými toxickými účinky [1; 5].

V současné době se na světovém trhu vyskytuje nepřehledné množství přípravků na opalování, které jsou pro lepší orientaci spotřebitelů rozdělovány dle jejich protektivního faktoru SPF (z anglického Sun Protective Factor) na výrobky s nižší (SPF menší než 15), vysokou (SPF 15 až 50) až velmi vysokou ochranou (SPF vyšší než 50). O popularitě opalovacích přípravků vypovídá fakt, že v roce 2018 činila hodnota celosvětově prodaných výrobků 11,6 miliard amerických dolarů [5; 6].

1.1.1 Vývoj opalovacích krémů

Slunce v pravěkých a starověkých kulturách bylo uctíváno jako božstvo. I přes to si lidé začali brzy uvědomovat jeho negativní efekty, a to především pro kůži. První civilizací, která začala využívat fotoprotektivních metod, byli již 4000 let před naším letopočtem Egypťané. Už tenkrát používali přípravky zhotovené z přírodních výtažků z rýže, jasmíny a lupiny, tedy z ingrediencí, které lze nalézt i v dnešních opalovacích krémech. Oxid zinečnatý byl

pravděpodobně poprvé použit již v období starověké Indie. Dle indické medicínské knihy „Charaka Samhita“ byl oxid zinečnatý používán jako balzám na oči, otevřená zranění a popáleniny. V současné době je oxid zinečnatý významnou složkou opalovacích krémů [5].

Spektrum slunečního záření obsahuje kromě ultrafialové složky (< 380 nm) i záření viditelné (380 – 780 nm) a infračervené záření (> 780 nm). UV záření se pak dle vlnových délek rozděluje na dlouhovlnné UV-A (320–400 nm) a středněvlnné UV-B (290–320 nm) [5; 7].

Ochrana proti ultrafialovému záření B

Sir Everard Home roku 1820 poprvé popsal roli slunečního světla při popálení kůže. Na základě jeho objevů se začaly zkoumat sloučeniny se schopností absorpce záření. První známou sloučeninou chránící pokožku před UV-B byl chininsulfát. Fridrich Hammer začal v roce 1891 v Německu prodávat masti a pleťové vody právě s obsahem chininsulfátu, čímž uvedl na trh historicky první chemické opalovací prostředky. Již v roce 1894 vyjádřil Paul Unna (označován za zakladatele dermatologie) a William Dudreuilh možnou souvislost mezi rakovinou kůže a dlouhodobou či opakovanou expozicí slunečnímu záření. První detailní studie zabývající se vznikem erytému a pigmentací lidské pokožky byla provedena roku 1922 německými vědci Hausserem a Vahlem, kteří zjistili, že delší vlnové délky UV spektra (tj. UV-A složka) více stimulují produkci pigmentu, zatímco kratší vlnové délky (tj. UV-B složka) jsou více erytemogenní. Výstupem jejich práce byl vývoj opalovacího krému, který díky obsahu benzyl salicylátu a benzyl cinamátu velmi dobře absorboval UV-B záření. Dalším průlomem bylo uvedení opalovacích krémů na bázi *p*-aminobenzoové kyseliny (PABA) a jejích esterů. Tyto produkty si nechal Eugene Shueller, zakladatel společnosti L’Oreal, v roce 1943 patentovat. Až později bylo zjištěno, že je PABA pro některé jedince alergenní, a proto se dnes musí přítomnost těchto látek v krémech uvést na obale. Pro lepší orientaci spotřebitelů mezi jednotlivými výrobky uvedl německý radiační fyzik Rudolf Schulze první návrh stupnice ochranného faktoru, která byla později vylepšena rakouským chemikem Franzem Freiterem. Ten začal používat termín SPF, který později roku 1978 přijal americký vládní Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Následně byl termín SPF mezinárodně uznán jako stupnice pro měření ochrany před slunečním zářením [5].

Ochrana proti ultrafialovému záření A

Vědecký objev účinku dlouhovlnného UV-A záření byl poprvé publikován v roce 1969 americkým dermatologem Albertem Kligmanem. Ve své publikaci popsal, jak sluneční záření způsobuje strukturální poškození kůže, které lze odlišit od procesu stárnutí. Prvními UV-A

filtry byly dibenzoylmethanové deriváty (například avobenzon). Tyto filtry se v roce 1980 nacházely pouze v 1 % opalovacích krémů, o 12 let později byly však přítomny již ve 35 % krémů. V roce 1992 byl ve spolupráci vědců ze společnosti BOOTs a profesorem fotobiologie Brianem Diffeyem vytvořen systém hvězdiček vyjadřující úroveň ochrany před UV-A zářením. Tato metoda byla hojně využívána ve Velké Británii. Aby byl však zajištěn jednotný celoevropský systém značení ochrany proti UV-A záření, byl Evropskou asociací kosmetiky, toaletních potřeb a parfumerie (COLIPA) zaveden test vztahující ochranu před UV-A zářením k ochraně před UV-B zářením. Pokud je tedy UV-A ochrana vyšší než 1/3 UV-B ochrany, na obalu výrobku se může uvést symbol s UV-A v kroužku (obrázek 1). Jelikož bylo zjištěno, že většina UV-A filtrů není fotostabilní a jsou po expozici UV záření poškozovány na molekulární úrovni, čímž ztrácí svou účinnost, existují dnes pouze dva UV-A filtry (oxid zinečnatý a avobenzon) schválené FDA [5; 8].



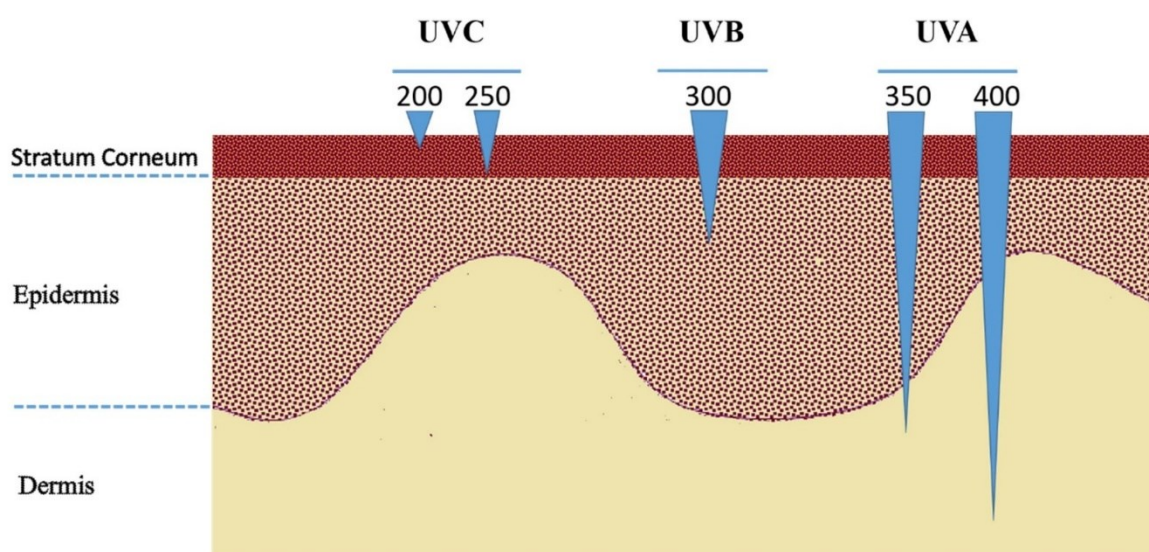
Obrázek 1 Symbol UV-A ochrany [9]

Ochrana proti viditelnému záření

Dopad vyšších vlnových délek viditelného záření při vyvolávání hyperpigmentace (melasmy) byly popsány roku 1983. Nejstudovanějším filtrem viditelného záření je oxid železitý. Studie z roku 1991 zabývající se propustností UV-A a viditelného světla pro různě silné vrstvy naneseného opalovacího krému ukázala, že u opalovacího krému obsahujícího 20 % oxidu zinečnatého nehraje tloušťka nanesené vrstvy roli. Kombinace 4% hydrochinonu a oxidu železitého vykazoval i pozitivní účinek při léčbě melasmy. Potenciální ochrannou funkci by mohly mít i antioxidanty, které jsou často součástí opalovacích krémů. Viditelné světlo totiž zvyšuje výskyt reaktivních forem kyslíku, které antioxidanty obecně vychytávají. Jejich význam v opalovacích krémech je však založen pouze na laboratorních testech a reálná ochrana kůže *in vivo* není příliš prozkoumána [5].

1.1.2 Ultrafialové filtry

UV filtry jsou tedy chemické sloučeniny, které jsou schopny zmírňovat škodlivé účinky slunečního záření, a proto jsou používány v různých kosmetických přípravcích, jako jsou například opalovací krémy, mléka či oleje. Účinnost těchto produktů je uváděna podle stupnice ochranného faktoru SPF, který závisí na množství a druhu UV filtrů v přípravku. Zatímco UV-B záření může způsobit popáleniny kůže a poškození DNA v jejích horních vrstvách (vedoucí ke vzniku maligního melanomu), UV-A proniká hlouběji do kožních vrstev a podílí se na poškození DNA a stárnutí kůže. Schéma prostupu jednotlivých vlnových délek UV záření kůží je znázorněn na obrázku 2. Jelikož je téměř veškeré UV-B záření odraženo stratosférickou ozonovou vrstvou, je jeho podíl v denním slunečním spektru malý (cca 1 %). Skutečné procento UV-B dopadajícího na povrch Země závisí na mnoha proměnných, jako je úbytek ozonu, oblačnost a úhel dopadu slunečního záření. Složka UV-B iniciuje u člověka fotolytickou reakci 7-dehydrocholesterolu na previtamin D₃, tedy prekurzor vitamínu D. Lidé si v reakci na nadměrnou expozici UV-B v průběhu evoluce vyvinuli rozsáhlé fotoprotektivní mechanismy, jako je například melanogeneze. V kůži je distribuována látka eumelanin, která absorbuje UV záření a jejíž koncentrace je regulována právě prostřednictvím melanogeneze. Jelikož opálení/spálení kůže je až opožděnou reakcí, a jedinec tak nezaznamená včas, že již mohlo dojít k poškození DNA, je dnes používání opalovacích přípravků s obsahem hned několika různých UV filtrů masově doporučováno, aby doplnily přirozené fotoprotektivní mechanismy kůže [2; 10; 11].



Obrázek 2 Prostupnost UV záření kůží (upraveno) [12]

1.1.3 Legislativní požadavky na opalovací krémy

V současné době existují seznamy schválených fotoprotektivních látek. Zatímco americký úřad FDA schvaluje pouze 16 složek, Evropská komise (EK) jich povoluje 27. Rozdíl je způsobený tím, že EK nahlíží na opalovací krémy jako na kosmetické přípravky, ale ve spojených státech jsou považovány za léčiva [5].

Nářízení Evropského parlamentu a Rady z roku 2022 reguluje použití tří organických UV filtrů, oktokrylenu, oxybenzonu a homosalátu. Množství oktokrylenu nesmí podle této legislativy přesáhnout 10 %, ať už je použit individuálně nebo kombinovaně s jinými UV filtry [13]. Ve stejném roce vydal Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů (SCCS) vyhlášku týkající se bezpečného použití homosalátu. S ohledem na obavy související s jeho potenciálními negativními dopady na endokrinní systém nesmí jeho koncentrace přesáhnout 7,34 % [14]. Oxybenzon, který je také nazýván benzofenon-3, je pro svou příbuznost s karcinogenním benzofenonem regulován do maximální koncentrace 6 % v produktu. Samotný benzofenon by se dle vyhlášky z roku 2009 neměl v produktech na opalování pro své negativní dopady na lidské zdraví vyskytovat vůbec. Tato vyhláška reguluje také výskyt často se vyskytujícího ethylhexyl salicylátu maximálně 5 % v produktu [13–15].

Zajímavostí je, že oktokrylen a 2 další UV filtry byly roku 2018 zakázány na ostrově Palau ležícím v Tichém oceánu, a to kvůli jejich toxicitě vůči korálovým útesům [16].

1.1.4 Opalovací krémy pro děti

Dětskou kůži je nutno chránit proti působení UV záření ještě důkladněji, jelikož její přirozené ochranné mechanismy nedosahují účinnosti dospělého jedince, a je tak náchylnější k poškození. Děti mají totiž tenčí epidermis, menší keratinocyty (buňky přenášející keratin) a nižší koncentraci melaninu a poměr lipidů ku proteinům. Vzhledem k nezralosti epidermální bariéry a možnému výskytu atopické dermatitidy je důležité, aby dětské opalovací krémy byly minimálně dráždivé (i pro oči), s malým nebo lépe žádným potenciálem senzibilace (vznik přecitlivění), a aby se nevstřebávaly do nižších vrstev kůže a následně do krevního řečiště. Měly by být zároveň dlouhotrvající, voděodolné a odolné proti fyzické aktivitě [17].

V současné době nestanovuje Evropská komise žádné zvláštní požadavky na složení opalovacích krémů určených dětem. Obecně platí, že obsahují stejné typy filtrů jako klasické opalovací krémy pro dospělé. Dětské opalovací krémy se tak svými vlastnostmi podobají krémům pro citlivou pokožku [17].

1.2 Rizika spojená s používáním opalovacích krémů

Zvyšující se frekvence používání opalovacích přípravků může být komplikací nejen pro lidské zdraví, ale i pro životní prostředí. Všechny v kosmetickém průmyslu schválené látky musely projít řadou testů týkajících se jejich bezpečnosti, ale některé problémy spojené s jejich používáním se mohou projevit až v delším časovém horizontu. Mezi nejčastěji diskutované problémy související s používáním kosmetických výrobků obsahující UV filtry patří (a) jejich pravděpodobná absorpce kůže, což vede k systémové expozici s neznámými důsledky, (b) možné poruchy endokrinního systému (jsou potenciálními endokrinními disruptory), (c) jejich degradace UV zářením vedoucí ke vzniku jiných, zdraví škodlivých sloučenin, (d) jejich hromadění v přírodě a potenciální negativní dopad na živočichy a rostliny [18].

1.2.1 Kožní absorpce UV filtrů

Kožní absorpci lze definovat jako průchod sloučenin kůže. Tento proces lze rozdělit na tři kroky. Prvním krokem je průnik (penetrace), což je vstup zkoumané látky do nejsvrchnější vrstvy kůže. Druhým krokem je permeace, kdy látka proniká z jedné vrstvy kůže (epidermis) do funkčně i strukturálně odlišné vrstvy (dermis). Posledním krokem je resorpce, tedy vstřebání látky do cévního systému (lymfy či krevních cév) [18; 19].

Naprosto ideální opalovací krém by měl co nejméně pronikat z rohové vrstvy pokožky do dalších vrstev, aby nedocházelo mimo jiné i ke ztrátám fotoprotekce. Nicméně některé UV filtry mají potenciál absorbovat se kůže, která se tak stává nechráněnou. V organismu navíc mohou metabolizovat na toxické produkty, a stát se tak potenciálně mutagenními látkami. Sledované jsou také jejich estrogenní účinky [18].

1.2.2 Ovlivnění endokrinního systému

Chemické látky narušující endokrinní systém jsou předmětem zájmu od 90. let 20. století. Současná definice potenciálního endokrinního disruptoru (ED) zní dle Evropské komise následovně: „*potenciální ED je exogenní látka nebo směs, která má vlastnosti, jež mohou vést k narušení endokrinního systému v intaktním organismu nebo potomstvu či (sub)populaci*“. ED je pak definován jako „*exogenní látka nebo směs, která mění funkci(e) endokrinního systému a následně způsobuje nepříznivé účinky na zdraví v intaktním organismu nebo jeho potomstvu či (sub)populaci*“ [20]. Poprvé se o UV filtrem jakožto potencionálních ED začalo hovořit počátkem 21. století. Jedná se zejména o látky ze skupiny benzofenonů nebo kafrových derivátů. Schlumpf a kolektiv zkoumal v roce 2001 šest často používaných UV-A a UV-B organických filtrů v opalovacích krémech z hlediska estrogenity. Jejich výzkum ukázal, že tři

ze zkoumaných látek vykazují estrogenní účinky nejen *in vitro*, ale i *in vivo* u myší. Bezprostředně na to se však Vědecký výbor pro kosmetické a nepotravinářské produkty proti tomuto výzkumu ohradil, neboť vykazoval řadu technických nedostatků. Od té doby se posouzení potenciálních endokrinních účinků UV filtrů stalo předmětem dalších studií, přičemž některé estrogenní účinek potvrdily, jiné vyvrátily. Jelikož jsou UV filtry přítomny i v kosmetických přípravcích určených pro denní použití (hydratační krémy, šampony či odličovací pomůcky), je stále třeba intenzivnějšího a detailnějšího vědeckého výzkumu [18; 21; 22].

1.2.3 Nestabilita UV filtrů

Mechanismem působení organických UV filtrů je absorpce UV záření, v jehož důsledku mohou filtry podléhat změnám ve své molekulární struktuře nebo se mohou zcela přeměňovat na jiné, mnohdy chemicky reaktivní molekuly. Tomuto ději se říká fotosenzibilizace, která se v závislosti na dávce světelného záření a koncentraci UV filtru na kůži může projevit jako zánětlivá reakce nebo může dokonce vést až k poškození tkání nebo buněk (pak hovoříme o fototoxicitě). Pokud dochází ke specifické imunitní reakci, jde o fotoalergii. Opakem fotosenzibilizace je fotostabilita, tedy schopnost látky zůstat stabilní při expozici světlu. Právě fotostabilita je důležitým faktorem při vývoji a hodnocení bezpečnosti a účinnosti (pozměněné molekuly nemusí být účinné v absorpci UV záření) opalovacích krémů. Některé UV filtry, zejména pod vlivem UV-A záření, vykazují značnou nestabilitu [11; 18; 23; 24].

Struktura UV filtrů musí zaručovat absorpci fotonů, a proto se obvykle jedná o jedno – nebo vícearomatické sloučeniny. Absorpce fotonu vede k vratným či nevratným fotochemickým reakcím molekul UV filtrů (například cis-trans transformace, keto-enolové tautomerie nebo reakce s jinými UV filtry či jinými látkami z matrice) nebo k jejich fotodegradaci, která může změnit fyzikální vlastnosti (například vlnovou délku ochrany před UV zářením a absorpční koeficient) či vést ke vzniku potenciálně nebezpečných produktů. Tyto produkty se mohou hromadit na kůži nebo se bioakumulovat v jiných orgánových strukturách. Fotodegradční meziprodukty mohou rovněž způsobit fotooxidaci a podpořit vznik volných radikálů, tedy reaktivních forem kyslíku, jež mohou interagovat nejen s dalšími složkami opalovacích krémů, ale také se složkami kůže, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Takové interakce mohou opět vést ke vzniku nových molekul s neznámými toxikologickými vlastnostmi, které mohou být pro lidské tělo škodlivé až fatální [18].

Fotostabilita UV filtrů se značně liší. Obecně ale platí, že opalovací krémy obsahující anorganické UV filtry vykazují vyšší fotostabilitu než krémy s organickými filtry [25].

1.2.4 Enviromentální dopady

Protože se používání přípravků na opalování každým rokem zvyšuje, je nutno zmínit také dopady těchto produktů na životní prostředí. Je prokázáno, že se UV filtry a jejich degradační produkty hromadí ve vodě, a to zejména mořské [1]. UV filtry jsou proto aktuálně považovány za mikropolutant, podobně jako polyfluoroalkylované látky, toxické produkty hub, hormony, psychoaktivní látky, pesticidy a průmyslové přísady a léčiva. Tyto kontaminanty byly detekovány v mořských ekosystémech po celém světě. Platí však, že jejich koncentrace závisí na několika faktorech, jako je oblast odběru, datum a čas odběru a zejména turistická návštěvnost. Nejvyšší koncentrace UV filtrů jsou poté zjišťovány v nejkomerčnějších destinacích. Cestovní ruch tedy hraje velice důležitou roli v kontaminaci vodního prostředí UV filtry. Jelikož se pobřežní turistika stává neustále atraktivnější, lidé tráví více času u moře a počet obyvatel přímořských oblastí roste, je vysoce pravděpodobné, že i koncentrace UV filtrů se bude v budoucnu zvyšovat. Protože čističky odpadních vod nejsou schopné tyto kontaminanty účinně odstranit, dostávají se do ekosystému i z odpadních vod (například vlivem sprchování, vylučování nebo praní oděvů) [1; 26]. Ve vodním prostředí může docházet k fotolýze UV filtrů a vzniku škodlivých vedlejších produktů. Některé studie navíc naznačují, že tyto produkty fotolýzy mohou dále reagovat s chlorem přítomným v bazénové vodě. Vznikající chlorované produkty pak mohou rovněž ohrožovat lidské zdraví [1].

Experimentální studie dále ukázaly, že organické UV filtry mají tendenci bioakumulovat i v různých živočiších, zejména v korálech, řasách, členovcích, měkkýších a mořských obratlovcích [1]. Mnohé UV filtry, jako například oktokrylen, benzofenon, kafrové deriváty atd., prokazatelně způsobují úhyn či bělení korálů. Oktokrylen se přeměňuje na velmi lipofilní konjugáty mastných kyselin, které se hromadí v tkáních korálů. To způsobuje abnormální metabolismus mastných kyselin související s mitochondriální dysfunkcí. Anorganické UV filtry, jako je TiO_2 , jsou zase velkou hrozbou pro řasy a členovce. Nanočástice TiO_2 tvoří při vystavení ultrafialovému záření reaktivní formy kyslíku, které jim mohou způsobit oxidační stres, molekulární změny lipidů a proteinů buněčných membrán a inhibovat produkci fotosyntetických pigmentů (chlorofylu), čímž ovlivňují proces fotosyntézy. Mlži obecně velice dobře bioakumulují kovy, což platí také o agregátech nanočástic UV filtrů rozpuštěných ve vodě. U ryb mohou UV filtry bioakumulovat a způsobovat hormonální poruchy, změny v produkci genů a poruchy rozmnožovacích systémů [1; 27; 28].

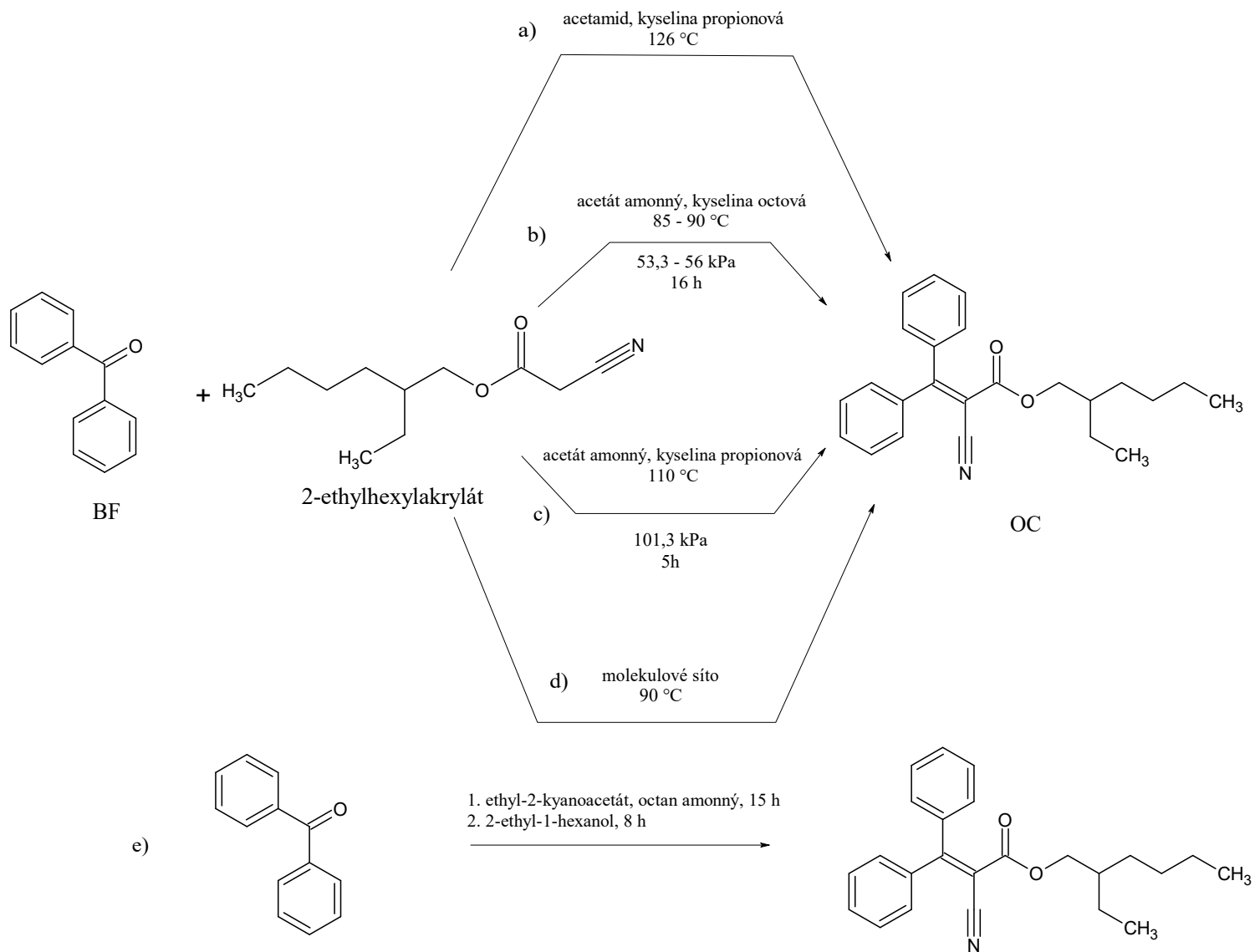
Problémem je, že doposud nejsou právními předpisy stanoveny maximální přípustné koncentrace jednotlivých UV filtrů ve vodách. Odstranění těchto nových kontaminantů z odpadních vod lze dosáhnout ozonizací (nebo jinou oxidací), membránovou filtrací či adsorpcí [1; 29; 30].

1.3 Oktokrylen

Oktokrylen (OC; 2-ethylhexyl ester kyseliny 2-kyano-3,3-difenyl-2-propenové) je v tučích rozpustná viskózní kapalina světle žluté až žluté barvy, která je jednou ze složek opalovacích krémů schválených Evropskou Unií pro použití ve volně prodejných opalovacích (s SPF označením) i jiných kosmetických přípravcích (bez SPF), jako jsou například šampony, laky na vlasy a kondicionéry. Zatímco akrylátová část oktokrylenu absorbuje UV-A i UV-B záření, čímž chrání pokožku před přímým poškozením, 2-ethylhexanolová část molekuly je mastný alkohol, který dodává změkčující a olejové (voděodolné) vlastnosti. Z tohoto důvodu je oktokrylen jedna z nejběžnějších molekul obsažených v komerčně dostupných opalovacích krémech [2; 23; 31–33].

1.3.1 Příprava oktokrylenu

Patentovaná příprava OC z roku 2022 (s výtěžností 92,3 %) vychází z benzofenonu (BF) a 2-ethylhexylakrylátu. Jako katalyzátor byl použit acetamid a kyselina propionová. Rozpouštědlem reakce je butyl-acetát a reakce probíhá při teplotě 126 °C (obrázek 3a) [34]. Pro tuto aldolovou kondenzaci lze však použít i jiné katalyzátory (př.: směsi octanu amonného s kyselinou octovou nebo kyselinou propionovou) a reakční podmínky (v závislosti na rozpouštědle byla zvolena různá teplota a tlak reakce), nicméně reakce probíhá s nižším výtěžkem (obrázek 3b a 3c) [35; 36]. Ve větších měřítcích lze použít katalyzátor s molekulovým sítem na bázi aminu (obrázek 3d) [37].

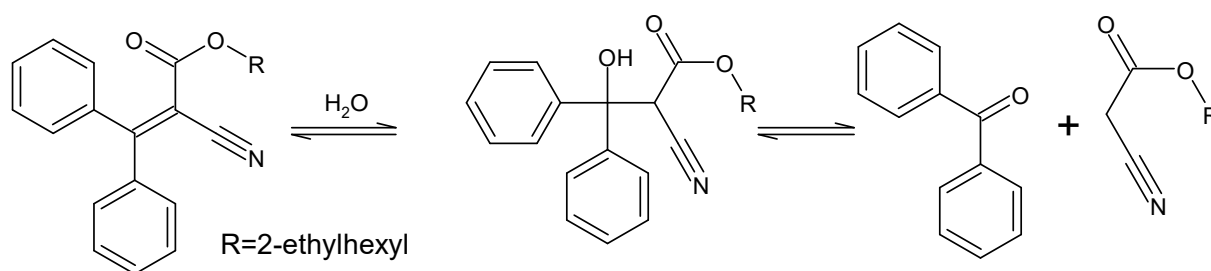


Obrázek 3 Syntéza OC [34–38]

Z benzofenonu lze OC vyrobit i složitější dvoukrokovou cestou (obrázek 3e), kdy v prvním kroku reaguje BF s ethyl-2-kyanoacetátem (v přítomnosti acetátu amonného) po dobu 15 hodin za vzniku etokrylenu. V kroku druhém se pak OC syntetizuje reakcí tohoto meziprojektu s 2-ethyl-1-hexanolem po dobu 8 hodin [38]. Někdy je v druhém kroku použit uhličitan sodný a teplota 130 °C [39].

1.3.2 Čistota a stabilita oktokrylenu

Velkým problémem používání OC v kosmetických produktech je jeho nedostatečná čistota a diskutabilní stabilita. Surový OC používaný pro výrobu opalovacích krémů je totiž obvykle kontaminován benzofenonem (výchozí látka při výrobě oktokrylenu), který je spojován s celou řadou endokrinních poruch a toxických účinků, včetně genotoxicity a karcinogenity. Jeho běžné metabolity mají podobné negativní účinky. Navíc bylo prokázáno, že BF vyvolává v přítomnosti UV záření dimerizaci thyminu a tvorbu dvouřetězcových zlomků DNA. Jak bylo popsáno výše, OC je nejčastěji syntetizován aldolovou kondenzací benzofenonu s 2-ethylhexyl-2-kyanoacetátem (obrázek 3). Tato reakce je ale vratná, a proto byla při stárnutí výrobku prokázána i pozvolná degradace oktokrylenu zpět na BF (obrázek 4). Pro další používání OC v kosmetických produktech by bylo vhodné zamezit jeho kontaminaci benzofenonem a vyvinout bezpečný stabilizátor, který by zabraňoval retro-aldolové reakci [31; 40].



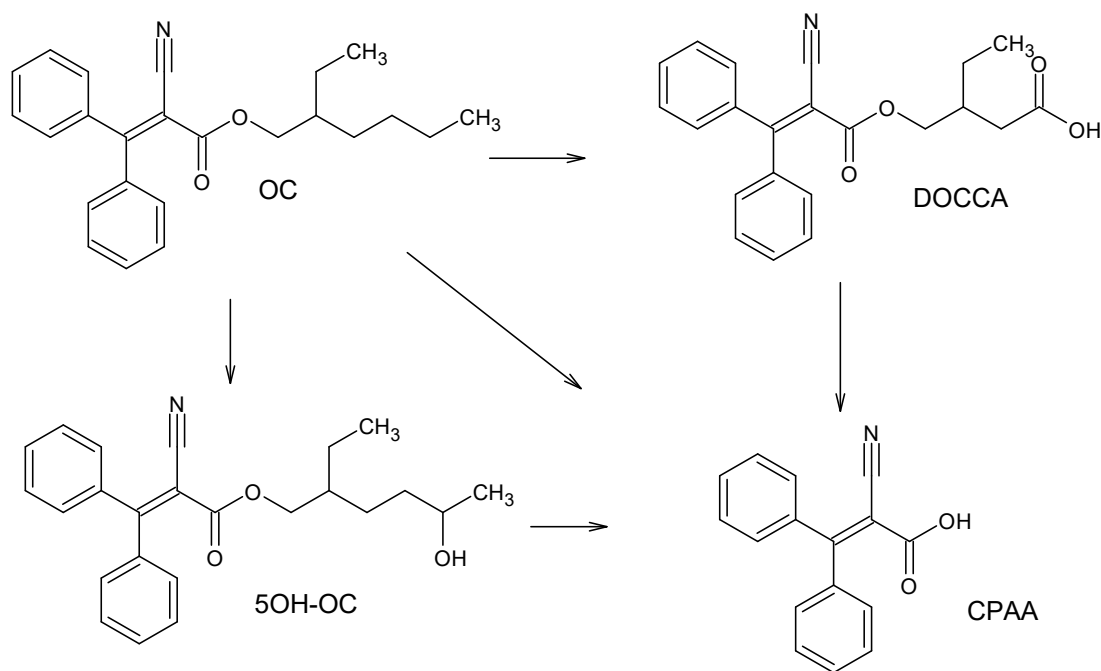
Obrázek 4 Schéma retro-aldolové reakce [31]

Dalším problémem je rozklad OC ve chlorované vodě bazénů na produkty s mírnými až vysoce toxickými účinky. OC lze tak spolu s dalšími UV filtry řadit mezi širokou skupinu polutantů, na něž se ale v současné době nevztahuje žádné legislativní opatření upravující jejich nejvyšší přípustné hodnoty [29].

1.3.3 Toxicita oktokrylenu

Potenciální toxické účinky OC byly zkoumány při jeho dermálním i orálním podání. Po orální expozici byly sice ve studii provedené na potkanech při vysokých dávkách zaznamenány účinky na játra, štítnou žlázu a počet mláďat, nicméně vzhledem ke klasickému dermálnímu použití jsou výsledky poněkud zavádějící. Jedná se však pouze o výzkum toxicity OC bez vystavení zkoumaného živočicha UV záření. Při dermálním podání nejevil OC ani estrogenní, androgenní, vývojové či teratogenní účinky [41]. Genotoxická studie provedená v roce 1994 pak potvrzuje jeho toxikologickou bezpečnost [42].

V Německu byl OC vybrán do rozsáhlého projektu, jehož cílem je zavést nové metody biomonitoringu člověka k hodnocení expozice a rizik nových chemických látek. Identifikace a stanovení odhalilo tři hlavní metabolity OC (biomarkery jeho expozice). Jde o kyselinu 2-kyano-3,3-difenylakrylovou (CPAA), 2-ethyl-5-hydroxyhexyl-2-kyano-3,3-difenyl akrylát (5OH-OC) a 2-(karboxymethyl)butyl 2-kyano-3,3-difenyl akrylát (DOCCA), jejichž struktury jsou znázorněny na obrázek 5 [43]. Ve vzorcích moči běžné populace byla po aplikaci přípravků s OC zaznamenána nejvyšší koncentrace CPAA, který je tak kvantitativně nejvýznamnějším metabolitem OC. Jelikož ale může vznikat biodegradací i jiných látek, není pro OC vysoce specifický. Za ty se naopak pokládají 5OH-OC a DOCCA. Stanovení metabolitů OC v lidských tělních tekutinách je důležitým ukazatelem, že dochází k absorpci a pronikání UV filtrů rohovou vrstvou kůže [43; 44].



Obrázek 5 Tři hlavní metabolity oktokrylenu (OC) [43]

Zkratky: DOCCA, 2-(karboxymethyl)butyl 2-kyano-3,3-difenylyl akrylát; 5OH-OC, 2-ethyl-5-hydroxyhexyl-2-kyano-3,3-difenylyl akrylát a CPAA, 2-kyano-3,3-difenylyl akrylovou.

1.3.4 Alergie na oktokrylen

První popsané případy alergické reakce na OC pochází z roku 2003, což je zároveň období, kdy se OC začal objevovat v opalovacích krémech ve větších koncentracích. Od té doby se počet zpráv o alergiích spojených s jeho použitím zvýšil. Jsou uváděny dva hlavní typy senzibilizačních reakcí: kontaktní alergie (vzniká bez aktivace UV zářením) a fotokontaktní alergie (po UV ozáření). V porovnání s poměrně vzácnou kontaktní alergií se fotoalergická kontaktní dermatitida vyskytuje mnohem častěji [41; 45–48].

Ze studií vyplývá, že pravděpodobnost alergie na OC ještě zvyšuje současné používání ketoprofenu, což je léčivo používané proti bolesti, a to z následujících důvodů:

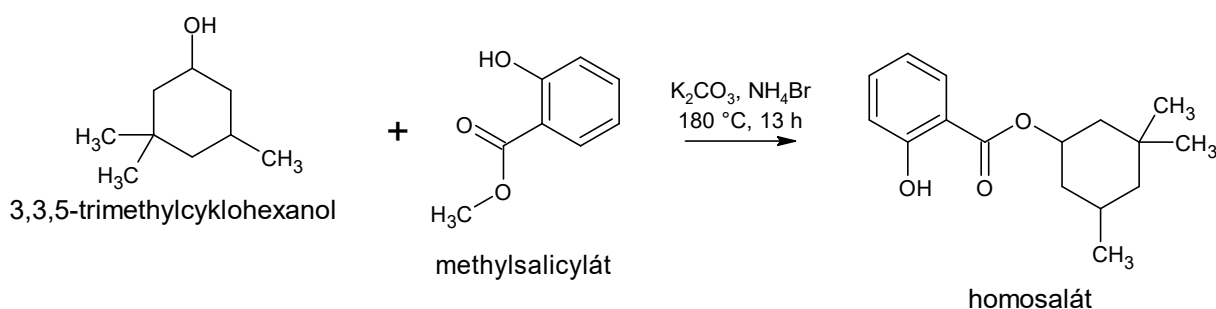
(i) benzofenonová část v chemické struktuře ketoprofenu může být zodpovědná za fotoalergii připisovanou OC

(ii) koreaktivity obou látek (vznik alergické reakce na obě látky současně).

Jelikož je ketoprofen velice populární ve Francii, Belgii, Itálii a Španělsku, je zvýšené procento alergií na OC hlášeno právě z těchto zemí [33; 41].

1.4 Homosalát

Homosalát (HMS; 3,3,5-trimethylcyklohexyl ester 2-hydroxybenzoové kyseliny) je organická látka, která náleží do skupiny salicylátů. Jde o ester kyseliny salicylové a 3,3,5-trimethylcyklohexanolu. Lze připravit reakcí 3,3,5-trimethylcyklohexanolu s methylsalicylátem (obrázek 6) [49]. HMS vykazuje UV-B absorpční vlastnosti, a proto má využití v opalovacích krémech a jiné kosmetice [50; 51].



Obrázek 6 Syntéza homosalátu [49]

1.4.1 Toxicita homosalátu

Molekula HMS obsahuje esterový můstek mezi fenolovým a alkyl-substituovaným cyklohexanovým kruhem (obrázek 6). Fenol a cyklohexan jsou řazeny mezi toxické látky. Přítomnost alkyl-substituovaného cyklohexanového kruhu může navíc drasticky měnit lipofilitu HMS, a může tak mít vliv na jeho adsorpci, distribuci, metabolismus a vylučování. Přestože denní expozice HMS je relativně nízká, má vysoký potenciál interagovat s jinými látkami, a jeho dlouhodobá expozice tak může způsobit vážné toxikologické účinky včetně mutací a poškození DNA vedoucí ke karcinogenezi (jelikož byl detekován i v mateřském mléce, mohl by způsobit karcinom prsu), teratogenezi, mutagenezi a dědičným genetickým onemocněním [52; 53]. I přes doloženou genotoxicitu nebyl HMS nikdy prokázán jako endokrinní disruptor [54].

Podobně jako ostatní UV filtry se i HMS dostává z opalovacích krémů do vody. Chlorovaná voda může HMS navíc přeměnit na chlorované produkty, jako jsou například diastereoizomery monochlor-homosalátu či dichlor-homosalát, jejichž (geno)toxické či alergenní účinky mohou být dokonce ještě větší [55; 56].

1.4.2 Alergie na homosalát

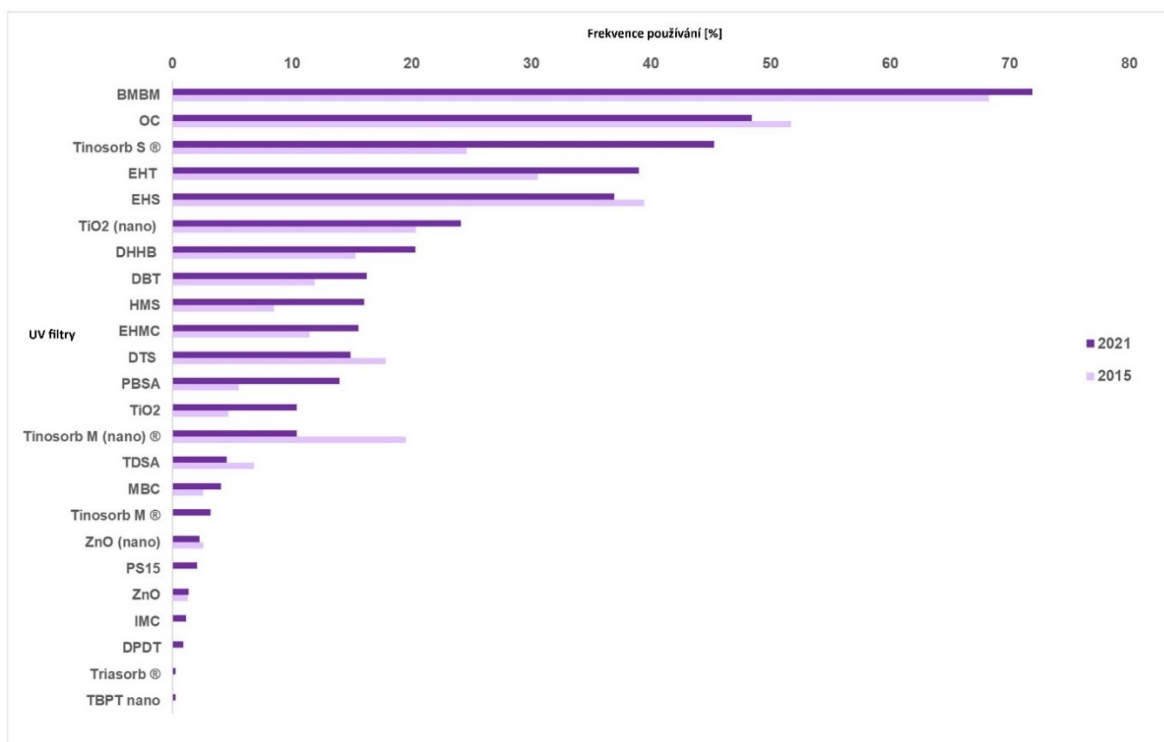
Jelikož neexistuje dostatek studií zabývajících se alergickými reakcemi na HMS a ostatní salicyláty, není možné dělat jednoznačné závěry. V minulém roce však byl prezentován případ alergické reakce po použití opalovacího krému s obsahem HMS, jež je tak momentálně považován za potenciální alergen. Jeho dopad na imunitní systém jedince je však nutné v budoucích letech podrobit dalšímu zkoumání [57].

1.5 Další často používané UV filtry

Portugalská studie z roku 2022 zabývající se průzkumem trhu z hlediska zastoupení UV filtrů odhalila vedle OC a HMS dalších 22 UV filtrů., přičemž dominují organické UV filtry oproti anorganickým. Nejčastěji používaným UV filtrem byl avobenzon (BMBM) a je následován OC. Dalšími často používanými organickými UV filtry jsou Tinosorb S, ethylhexyl triazon, ethylhexyl salicylát a HMS. Nejčastěji používaným anorganickým UV filtrem je oxid titaničitý ve formě nanočástic.

Nejvíce sledovanou charakteristikou, která rozhoduje o použití UV filtrů do přípravků na opalování, je v současné době jejich fotostabilita. Masivně používaný avobenzon je podle některých výzkumů nestabilní a podobně jako OC podléhá degradaci za vzniku toxických produktů. Výrobci tuto negativní vlastnost řeší použitím kombinací UV filtrů. Některé UV filtry totiž mohou sloužit jako fotostabilizátory pro ostatní. Z tohoto důvodu je BMBM kombinován právě s OC či Tinosorbem S, který ho nejen stabilizují, ale společně také poskytují širokospektrální ochranu.

Vzhledem ke stále novým poznatkům objevujících se v této problematice se chování výrobců opalovacích krémů neustále vyvíjí. Jak je vidět na obrázku 8, od používání OC se pomalu opouští (možným vysvětlením jsou problémy zmíněné v kapitole 1.2 a také jeho maximální povolené koncentrace dané Evropskou komisí vysvětlené v kapitole 1.1.3). Jeho náhradou je nejspíše Tinosorb S, jehož frekvence použití se během let 2015 až 2021 zdvojnásobila. Z anorganických UV filtrů se stále více používá TiO_2 . Důvody nejsou zcela jasné, nicméně možným vysvětlením by mohly být právě problémy některých organických UV filtrů se stabilitou [58].



Obrázek 7 Graf frekvence obsahu všech nalezených 24 UV filtrů (přeloženo a upraveno) [58]

Zkratky: BMBM: avobenzon, OC: oktocylen, EHT: ethylhexyl triazon, EHS: ethylhexyl salicylát, DHHB: Parsol DHHB, DBT: Iscotrizinol, HMS: homosalát, EHMC: oktinoxát, DTS: Mexoryl XL, PBSA: ensulizole, TDSA: ecamsule, MBC: enzacamene, PS15: polysilicon-15, IMC: amiloxate, DPDT: Neo Heliopan AP, TBPT: tris-bifenyl triazin

1.6 Chromatografické stanovení UV filtrů

UV filtry přítomné v opalovacích krémech lze stanovit celou řadu analytických instrumentálních technik. Zatímco pro anorganické filtry byly využívány techniky plamenové atomové absorpční spektrometrie nebo emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem, pro stanovení organických UV filtrů byly využity metody nukleární magnetické rezonance, Ramanovy spektroskopie, spektrofotometrie, strippingové voltametrie na uhlíkových elektrodách, plynové chromatografie, vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie, ale především vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [10; 59]. Možnostem provedení HPLC stanovení UV filtrů budou věnovány následující kapitoly.

1.6.1 Příprava vzorku k analýze

Příprava vzorků opalovacích krémů (nebo modelových vzorků) k analýze spočívá obvykle pouze v jejich rozpuštění v organických rozpouštědlech a případně v extrakci cílových analytů. Z rozpouštědel byl doposud využit ethanol [10; 26; 60; 61], methanol [62; 63] či okyselený methanol [64], případně byly použity směsi organických rozpouštědel, jako

například tetrahydrofuran s okyseleným methanolem [65] či dimethylacetamid s 2-propanolem [64]. Samotné rozpuštění emulze je možné podpořit použitím ultrazvukové vodní lázně s případným zahřátím pro ještě vyšší účinnost [26; 63; 65]. Pro odstranění mechanických nečistot či nerozpuštěných anorganických UV filtrů je pak před samotnou HPLC analýzou nutné vzorek přefiltrovat přes nylonové [26; 63] či polytetrafluorethylenové [65] stříkačkové filtry.

Pro vyhodnocení výtěžnosti extrakce/rozpuštění je vhodná příprava modelového vzorku. Matrice takového vzorku musí být podobná opalovacímu krému a nesmí obsahovat látky, které by jakýmkoli způsobem rušily proces extrakce nebo separace. Používají se hydrofilní krémové základy, které lze zakoupit připravené například v lékárně nebo složitěji připravit v laboratoři. Do těchto základů jsou následně přidány standardy stanovovaných látek ve vhodných koncentracích [10; 26; 60; 64].

Ačkoli je pouhé rozpuštění vzorku (podpořené ultrazvukem) před HPLC analýzou obvykle zcela dostačující, někdy je s výhodou začleněna i izolace cílových analytů různými extrakčními metodami, jako je extrakce nadkritickou tekutinou [66], (mikro)extrakce tuhou fází [67; 68] nebo extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku [69]. Extrakce stopových množství UV filtrů z polymerních obalových materiálů je možná s využitím fokusované ultrazvukové extrakce pevná látka-kapalina [61] či tradiční Soxhletovy extrakce [70]. Přechod UV filtrů z opalovacích krémů do životního prostředí je ekologickým a zdravotním problémem současné doby. Vzhledem k nízkým koncentracím ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) těchto analytů ve vodách je obvykle nutné zařadit krok zakoncentrování, jež je obvykle realizováno (mikro)extrakcí na tuhou fázi [68] nebo jsou pro tyto účely využívány micelární agregáty za zvýšené teploty, jejichž výhodou je jejich re-extrakce vedoucí k potlačení případných interferencí při separaci cílových analytů kapalinovou nebo plynovou chromatografií [71]. Pro extrakci UV filtrů benzofenonového typu lze pak využít ekologicky šetrnou ultrazvukem asistovanou disperzní mikroextrakci kapalina-kapalina, která urychlí tvorbu jemně zakaleného roztoku za použití menšího množství disperzního rozpouštědla [72].

Zásobní roztoky standardů UV filtrů se rozpouští ve stejných rozpouštědlech, jaké byly použity pro úpravu vzorku [10; 26; 60; 65]. Pro naředění roztoků standardů na požadovanou koncentraci je možné použít i roztok mobilní fáze [62; 63].

1.6.2 Podmínky HPLC separace

HPLC stanovení UV filtrů probíhá v systému s obracenými fázemi, s využitím kolon naplněných silikagelem s navázanou C18 [10; 26; 60–65], C8 [64] nebo C16 stacionární fází [64]. Kolona je obvykle temperována na 30 nebo 35 °C [60; 65]. Samotná separace může být provedena izokratickou [10; 62; 63] i gradientovou elucí [26; 60; 61; 65] mobilní fází. Často se jedná o binární systémy směsi ethanolu [10; 26; 60; 61], acetonitrilu [65] či methanolu [62; 63] a čisté [62] či okyselené vody [10; 26; 60; 61]. Speciálním případem je modifikace mobilní fáze přidavkem cyklodextrinů za účelem zapouzdření UV filtrů a tím zvýšení jejich fotostability a rozpustnosti ve vodě [10; 26]. Průtok mobilní fáze se pohybuje kolem 1 ml.min⁻¹ [10; 26; 63; 65] a dávkované objemy byly nejčastěji 10 µl [64]. Délka separace se pohybuje od 10 [10], 15 [62] až do 30 minut [10; 26; 60; 61; 63; 65]. Vzhledem k výrazným absorpčním vlastnostem analytů je možné použít spektrofotometrický detektor. Předem je ale nutné zvážit absorpční maxima analyzovaných látek a dle nich nastavit vhodnou vlnovou délku detekce (vlnové délky často v rozmezí 305–360 nm) [10; 26; 60; 63], případně je vhodné využít detektoru s diodovým polem [63; 65].

Z důvodu časté fotonestability UV filtrů můžeme v opalovacích krémech nalézt velké množství jejich fotodegradčních produktů. Výzkum fotodegradace je důležitý pro zajišťování účinnosti opalovacích krémů. Pro stanovení stability UV filtrů je opalovací krém rozetřen na destičku z plexiskla. Rozetřený vzorek je po ozáření (400 W.m⁻² po dobu 14,6 hodin) podroben simultánnímu chromatografickému stanovení UV filtrů a jejich degradačních produktů. HPLC podmínky se přitom neliší od výše uvedených. K identifikaci degradačních produktů je vhodné použít HPLC spojenou s hmotností spektrometrií [11].

1.6.3 České normy pro monitoring rozkladu a stanovení UV filtrů

V současné době jsou podmínky a postup stanovení SPF faktoru UV filtrů zakotveny v normě ČSN EN ISO 24443 z roku 2022. Tento postup a podmínky jsou použitelné také pro stanovení rozkladu UV filtrů a jsou následující: k měření musí být použit spektrometr svítící ve vlnových délkách od 290 do 400 nm. Zároveň by však dávka UV záření během jednoho cyklu neměla překročit 0,2 J.cm⁻². Před samotným měřením se lampa spektrometru musí nechat nejméně 20 minut nahřát. Na měření se má použít polymethylmetakrylátová (PMMA) destička, jejíž plocha nesmí být menší než 16 cm². Vzorek na novou PMMA destičku má být nanášen, aby na čtvereční centimetr nebylo více než 1,3 mg vzorku (±1,6 %). Produkt na opalování má být nanášen ve 12 stejných kapkách a poté rovnoměrně rozetřen po destičce pohyby nahoru a dolů a zprava doleva (viz obrázek 11). Celý

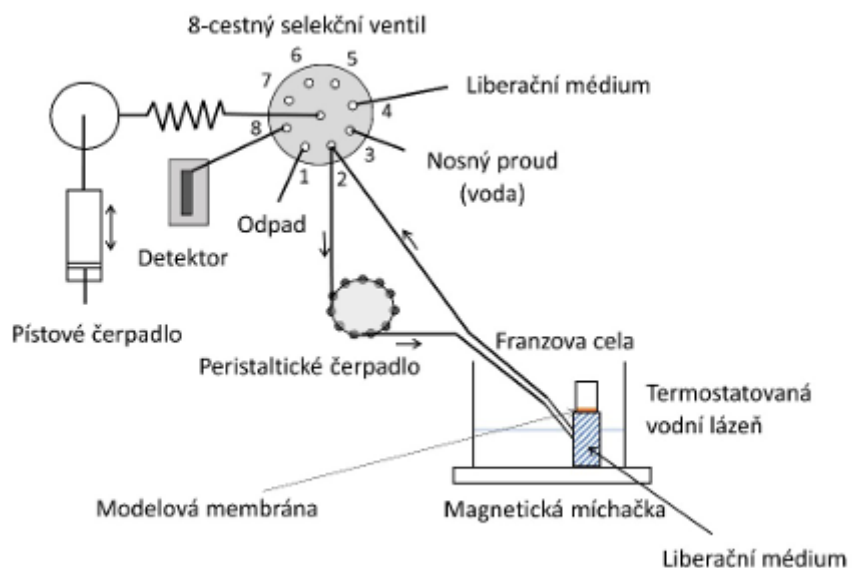
proces nanášení na jednu destičku by neměl zabrat více než 30 sekund. Vzorky na destičkách musí být uloženy přímo pod lampu UV zdroje. Při měření SPF jsou po ozáření vzorku měřeny hodnoty absorbance opalovacích přípravků a zda se tato hodnota změnila. Norma se tedy dále nevěnuje dalšímu stanovení UV filtrů v opalovacích přípravcích pomocí HPLC [73].

Pro samotné kvantitativní stanovení UV filtrů v kosmetických produktech existují dvě normy z roku 2014 [74] a 2019 [75], ve kterých jsou zmíněné postupy použitelné také pro stanovení produktů rozkladu UV filtrů. Normy se zabývají o HPLC stanovením UV filtrů včetně postupů extrakce, zpracování vzorků a použití kolon a mobilních fází, které jsou shodné s již uvedenými v ostatní literatuře v kapitolách 1.6.1 a 1.6.2.

1.7 Liberační testy

Liberační testy slouží k monitorování transdermálního přechodu látky z kůže do krevního řečiště. Kinetika liberace je důležitou charakteristikou léčivých přípravků, které se aplikují na kůži. Je jí však možné použít i pro vyjádření účinnosti UV filtrů nanesených na kůži, tedy stanovení, kolik UV filtru projde kožní bariérou (pokožka tím ztratí ochranu před UV zářením). Znalost tohoto procesu je důležitá, neboť UV filtry by ideálně neměly kožní bariérou procházet vůbec (pokožka se pak stává nechráněnou a biotransformace UV filtrů není dokonale prozkoumána; viz kapitola 1.2.3). Ke stanovení liberační kinetiky lze použít různých metod, které závisí na typu lékové formy nebo parametrech sledované látky. Optimalizace takových testů dávají důraz na rychlost stanovení, možnost automatizace celé metody a spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků měření. O možnostech stanovení liberačních parametrů pojednává Český lékopis. Lékopisná zkouška v něm uvedená je určena především pro rozpouštění látek z transdermálních náplastí, nikoliv z topických přípravků, avšak je na ně převeditelná. Český lékopis poté připouští použití metody s extrakční celou, která je vhodná pro analýzu organických UV filtrů. Proto lze použít sekvenční injekční analýzu (SIA) v kombinaci s Franzovou difúzní celou. Toto měření umožňuje plnou automatizaci odběru vzorku z prostoru Franzovy cely a pozorování kinetického profilu v reálném čase. Franzova cely se skládá ze dvou částí, donorové a akceptorové, mezi něž lze vložit různé typy membrán simulujících kůži nebo různé buněčné linie. Do vrchní, donorové části, je dávkován vzorek a sleduje se, kolik látky prochází přes danou membránu do činidla v akceptorové části, odkud je vzorek veden do SIA systému. Při analýze prostupnosti UV filtrů kůží je jako liberační činidlo vhodné použít acetátový pufr, který svým pH odpovídá prostředí lidské kůže [76–80].

Vyhovující je po testu dle Českého lékopisu účinná látka, jejíž množství uvolněné z náplasti (nebo krému) v určeném čase, vyjádřené jako množství na jednotku plochy náplasti (membránu simulující lidskou kůži, na které je látka nanesena) za jednotku času, je v požadovaném rozmezí [79; 80].



Obrázek 8 Schéma SLA systému s Franzovou celou [76; 78]

2. Experimentální část

2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

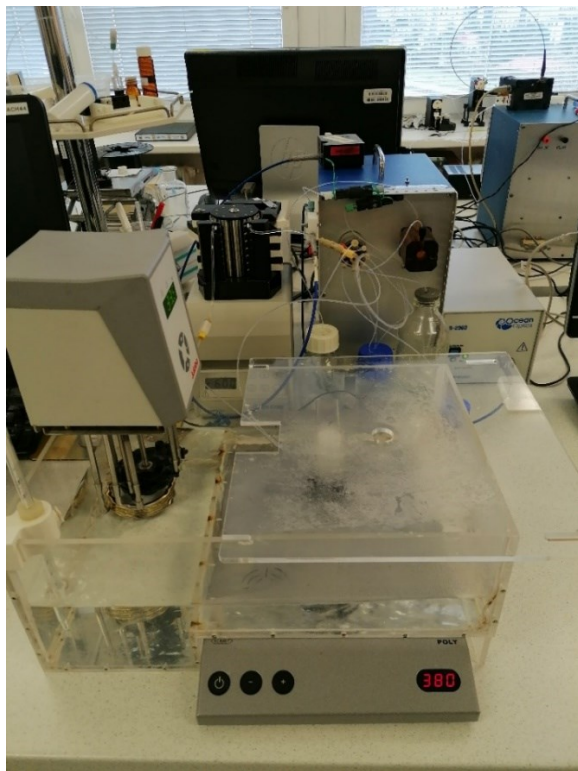
Pro vážení chemikálií byly použity analytické digitální váhy Sartorius (Ústí nad Labem, ČR) a běžné laboratorní pomůcky (navažovací lodičky, lžičky, odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, vialky, kopist, zásobní láhve na mobilní fázi). Pro odměřování objemů pro přípravu standardů a vzorků byly použity automatické pipety Finnpiquette (ThermoLabsystems, Waltham, USA) s různým rozptylem objemů. Pro efektivnější extrakci a rozpuštění vzorků byla použita digitální ultrazvuková lázeň Kraintek K12LE s košíkem K12L (Hradec Králové, Česká republika) a vzorky byly před HPLC analýzou filtrovány přes stříkačkové filtry s teflonovou membránou (PTFE) o průměru 13 mm a s póry o velikosti 0,22 μm (LABICOM, Olomouc, Česká republika).

Pro zjištění absorpčních spekter stanovovaných látek byl použit spektrofotometr UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a křemenné kvety s optickou dráhou 10 mm (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika).

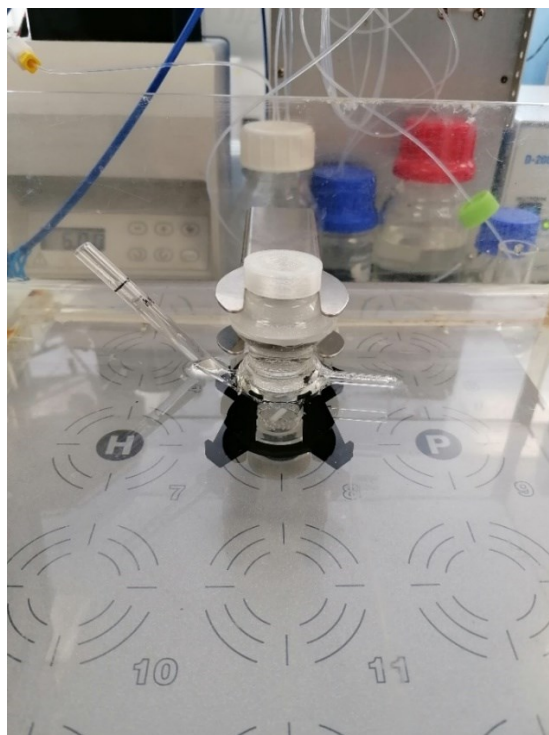
Pro HPLC separaci byl využit kapalinový chromatograf složený ze spektrofotometrického detektoru SPD-20A, dvou vysokotlakých čerpadel LC-30AD a degaseru DGU-20A5 (vše Shimadzu). Pro analýzu byla používána kolona Ascentis Express C18 (15 cm \times 3,0 mm) s částicemi 2,7 μm (Supelco, Bellefonte, USA) umístěná v termostatu LCO 102 (Ecom, Praha, ČR). Přístroj byl vybaven šesticestným ventilem s vnější dávkovací smyčkou o objemu 2 μl (Valco-Vici, Schenkon, Švýcarsko). Vzorky byly dávkovány mikrostríkačkou značky Hamilton (Reno, USA) o objemu 250 μl . Pro přípravu mobilní fáze byla používána redestilovaná voda čištěná pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Darmstadt, Německo)

Pro měření liberace UV filtru OC byl použit MicroSIA systém (FIALab, Seattle, USA) s osmicestným ventilem, jehož poloha a celé stanovení bylo řízeno přednastaveným programem v aplikaci FIALab, a pětimililitrovým pístovým čerpadlem. Dále byl použit UV/VIS spektrofotometr (Ocean Optics, Dunedin, USA), termostat (Julabo, Seelbach, Německo), Franzova difúzní cela s vnitřním objemem 15 ml (PermeGear, Hellertown, USA), peristaltické čerpadlo Minipuls 3 (Gilson, Madison, USA), které zajišťovalo průtok analytů ze spodní části Franzovy cely do detektoru, magnetická míchačka POLY 15 Variomag (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Německo) a hydrofilní polykarbonátová membrána o průměru 37 mm a velikosti pórů 0,4 μm (Merck). Celý SIA systém byl propojen teflonovými hadičkami a mobilní

fází byla redestilovaná voda (obrázky 9 a 10). V případě měření kalibrační křivky byla součástí systému také odměrná baňka obsahující různě koncentrované roztoky OC v octanovém pufru, které byly při analýze liberace nahrazeny čistým octanovým pufrům a doplněny o Franzovu celu s magnetickou míchačkou umístěnou do vodní lázně temperované na 32 °C (teplota na povrchu lidské kůže).



Obrázek 9 SIA systém s Franzovou celou uloženou ve vodní lázni s víkem



Obrázek 10 Franzova cela

Při studiu stability oktokrylenu byl použit UV síťovač UVITEC CL-508 (Cambridge, Spojené království), UV-box pro tenkovrstvou chromatografii Desaga GmbH/Sarstedt 230 V (Heidelberg, Německo) a lampa simulující sluneční záření se zářivkou značky Philips g23pl-11w (Amsterdam, Nizozemsko). Na simulaci degradace UV filtrů byly použity PMMA (Gutta, Německo) destičky o rozměru 4x4 cm, porcelánové kapkovací destičky a podložní mikroskopická skla.

2.2 Použité chemikálie a rozpouštědla

- Methanol; $\geq 99,9$ % (Merck)
- Acetonitril; 99,8 % (Merck)
- 2-propanol; $\geq 99,8$ % (Merck)
- Ethanol; absolutní (Penta, Praha, Česká republika)
- Oktokrylen; $> 98,0$ % (TCI, Tokyo, Japonsko)
- Homosalát; $> 98,0$ % (TCI)
- Oxybenzon (OB); 99 % (Merck)
- Benzofenon; 99 % (Merck)
- Ethylhexyl salicylát (EHS); $> 98,0$ % (TCI)
- Kyselina octová 99,8 % (Penta)
- Octan sodný (Penta)

2.3 Chromatografické stanovení vybraných UV filtrů

2.3.1 HPLC analýza

Optimalizovaná separace extraktů a standardů látek probíhala na koloně Ascentis Express C18 (15 cm × 3,0 mm; 2,7 μm) temperované na teplotou 30 °C. Binární mobilní fáze byla tvořena směsí methanolu a vody a separace probíhala v režimu izokratické eluce vodného roztoku 90% methanolu (v/v). Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Detekce analyzovaných látek probíhala na UV/VIS detektoru při 285 nm. Separace proběhla do 6 minut.

2.3.2 Kvalitativní analýza standardů UV filtrů

Pro přípravu zásobních roztoků UV filtrů bylo vždy 10 mg příslušného standardu rozpuštěno v 10 ml acetonitrilu. Pro zjištění retenčních časů jednotlivých látek byly roztoky standardů (stokrát naředěné acetonitrilem) analyzovány nejprve samostatně, následně byla ale připravena jejich směs o koncentraci 2 %, pomocí níž byla optimalizována chromatografická metoda.

2.3.3 Příprava kalibrační křivky

Koncentrační rozsah kalibrace byl pro jednotlivé analyty vybrán tak, aby pokryl jejich předpokládaný obsah v analyzovaných vzorcích (prostřední koncentrační body vždy odpovídaly jejich maximálnímu povolenému množství). U OC proto byla připravena kalibrační křivka od 1 do 25 % (maximální povolená koncentrace je 10 % [13]) a pro OB, HMS a EHS bylo vybráno koncentrační rozmezí 1–20 % (maximální povolená koncentrace OB 6 %, HMS 7,5 % a EHS 5 %) [13–15]. Jelikož HMS je vždy ve formě racemátu, byl k sestavení kalibrační křivky i k jeho následné kvantifikaci použit vždy součet ploch píků obou jeho izomerů. Benzofenon by se dle regulace EU v produktech neměl vyskytovat vůbec [15], proto byla připravena kalibrace v koncentračním rozmezí od 0,2 do 8 %. Měření každého kalibračního bodu bylo provedeno třikrát.

2.3.4 Analýza vzorků

Pro stanovení vybraných UV filtrů v reálných vzorcích byly použity opalovací přípravky, jejichž seznam je spolu s bližšími informacemi (výrobce, deklarované UV filtry na obale, cena a stupeň ochrany SPF) názorně shrnut v tabulce 1. V žádném z výrobků není uvedeno přesné množství (procentuální ani váhové) použitého UV filtru. Zároveň byl také použit základ krému bez přidaných látek připravený v lékárně AmiFarm, který sloužil pro vytvoření modelového opalovacího krému.

K analýze bylo odebíráno 50 mg vzorku, do kterého bylo přidáno 20 ml acetonitrilu. Takto naředěný vzorek byl na 15 min vložen do ultrazvukové lázně temperované na teplotu 30 °C. Extrakt byl poté přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr, 10x naředěn acetonitrilem a analyzován. Každý vzorek byl připraven v trojím provedení (n=3).

Tabulka 1 Analyzované produkty na opalování

Číslo vzorku a název produktu	SPF	Cena/ 100 ml [Kč]	Deklarované UV filtry					Další deklarované UV filtry
			OC	HMS	OB	EHS		
1 Vichy Capital Soleil Velvety Cream	50+	1178	✓				✓	TiO ₂ , EHT, BMBM
2 Lilien Trasparent Spray	20	93	✓				✓	BMBM, EHD PABA
3 Cien Sun Spray	20	40	✓				✓	BMBM, DBT
4 Astrid Sun Olej na opalování ve spreji	6	110	✓	✓				BMBM
5 Nivea Sun	6	92	✓				✓	BMBM, Tinosorb S
6 DM Sun Dance Cream	30	88	✓				✓	BMBM, Tinosorb A2B
7 DM Sun Dance Spray	30	87	✓				✓	BMBM
8 Astrid Sun olej na opalování s panthenolem	10	70	✓	✓			✓	BMBM
9 Cien kids Sun Cream	50+	49	✓				✓	BMBM, PBSA
10 Vichy Capital Soleil Hydrating milk	50+	230	✓				✓	Oxid titaničitý, BMBM, EHT
11 DM Sun Dance Cream	50	104	✓				✓	DHHB, EHT, PBSA

Číslo vzorku a název produktu	SPF	Cena/ 100 ml [Kč]	Deklarované UV filtry					Další deklarované UV filtry
			OC	HMS	OB	EHS		
12 Just Sun Care s extrakty z protěže a mochyně	30	626	✓			✓		IMC, DHHB
13 Avon Care Sun+ hydratační mléko	15	133			✓	✓		BMBM
14 Avon Care Sun+ balzám na rty	30	148*			✓	✓		EHMC, TiO ₂
15 Balea vyživující denní pleťový krém	15	110				✓		BMBM, Tinosorb S, EHT
16 Balea denní pleťový krém Urea	15	140				✓		BMBM, EHT
17 Balea Q10 denní pleťový krém	15	130				✓		BMBM, IMC, EHT

*Cena je vzhledem k povaze vzorku uvedena na 10 g výrobku.

Zkratky: OC: oktokrylen; HMS: homosalát; OB: oxybenzon; EHS: ethylhexyl salicylát; EHT: ethylhexyl triazon; BMBM: avobenzon; EHD PABA: ethylhexyl dimethyl PABA; DBT: Iscotrizinol; PBSA: ensulizole; IMC: amiloxate; DHHB: Parsol DHHB; EHMC: oktinoxát

2.4 Validace metody

V rámci validace vyvinuté metody byly testovány běžné parametry. Ke stanovení těchto hodnot byly využity nejen roztoky standardů stanovovaných látek, ale i modelový vzorek opalovacího krému. Ten byl připravený z masťového základu (získaného v lékárně) používaného běžně ve farmacii pro výrobu krémů, mastí, či balzámů, do kterého byly standardy cílových UV filtrů intenzivně vmíchány.

2.4.1 Návratnost

Návratnost analytické metody je často označována jako správnost metody a udává rozdíl mezi experimentálně zjištěnou koncentrací a koncentrací reálnou (rovnice 1). Vyjadřuje se v procentech a pro vyjádření výsledků je vypočtena také směrodatná odchylka (SD) [81].

$$\text{Návratnost [\%]} = \frac{c_{\text{vypočtená}}}{c_{\text{skutečná}}} \cdot 100 \quad (1)$$

V rovnici $c_{\text{vypočtená}}$ odpovídá koncentraci látky, která byla experimentálně naměřena a vypočtena příslušnou kvantifikační metodou, $c_{\text{skutečná}}$ poté odpovídá skutečné koncentraci látky, která byla měřena.

SD je poté vypočtena jako druhá odmocnina rozptylu (rovnice 2) [82]:

$$SD = \sqrt{s^2} \quad (2)$$

Rovnice 3 výpočtu rozptylu je následující [82]:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (3)$$

K samotnému stanovení návratnosti analytické metody byl použit modelový vzorek opalovacího krému, který byl připraven následovně: ke 250 mg lékárenského krémového základu byly postupně odváženy standardy UV filtrů, aby jejich hodnoty odpovídaly maximální povolené koncentraci v Evropské Unii (OC 10 %, HMS 7,5 %, OB 6 %, 5 % EHS a 2 % BF). Následně byl krém společně se standardy 10 minut intenzivně promícháván kopistí. K takto připravenému vzorku opalovacího krému bylo přidáno 100 ml acetonitrilu a vzniklá suspenze byla 15 minut při 30 °C sonifikována. Poté byl roztok přefiltrován přes 0,22 μm PTFE stříkačkový filtr a analyzován. Vzorky ke stanovení návratnosti byly připraveny v trojím provedení (n=3) a výsledky měření jsou následně uváděny jako aritmetický průměr naměřených hodnot.

2.4.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost analytické metody je určována v rámci jednoho dne (intradenní opakovatelnost) a také v rámci několika po sobě jdoucích dnů (mezidenní opakovatelnost). Opakovatelnost metody udává, jaká je shoda mezi naměřenými výsledky (chyba měření). Podmínkou je, aby měření probíhala za stejných podmínek, stejným pracovníkem a na stejném přístroji. Opakovatelnost se uvádí jako relativní směrodatná odchylka (RSD), kterou lze vypočítat ze SD a průměru naměřených hodnot \bar{x} (rovnice 4) [81; 82].

$$RSD [\%] = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

Pro měření opakovatelnosti analytické metody byl připraven modelový vzorek opalovacího krému, který byl zpracován stejným způsobem, jako v případě měření návratnosti

metody. Koncentrace standardů v připraveném vzorku krému byly následující: 13 % BF, 9 % OB, 7 % OC, 10 % HMS a 5 % EHS. Z tohoto krému připravený roztok byl analyzován pětkrát v jednom dni (n=5) a dále také v pěti po sobě jdoucích dnech (n=5).

2.4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je definována jako nejmenší možná koncentrace analyzované látky ve vzorku, kterou jsme ještě schopni spolehlivě analyzovat (detekovat), tedy odlišit signál od šumu základní linie. Mez stanovitelnosti (LOQ) lze definovat jako nejmenší koncentraci analyzované látky ve vzorku, kterou lze přesně a správně kvantitativně stanovit. Obě meze lze vypočítat ze závislosti výšky šumu základní linie a výšky píku dané látky při určité koncentraci (rovnice 5 a 6) [81].

$$LOD = \frac{c_{analyzované\ látky} \cdot 3 \cdot h_{šum}}{h_{analyzované\ látky}} \quad (5)$$

$$LOQ = \frac{c_{analyzované\ látky} \cdot 10 \cdot h_{šum}}{h_{analyzované\ látky}} \quad (6)$$

V rovnicích odpovídá $c_{analyzované\ látky}$ koncentraci analyzované látky, $h_{šum}$ výšce šumu základní linie a $h_{analyzované\ látky}$ výšce píku analyzované látky.

Případně lze využít zjednodušeného vztahu pro výpočet LOQ, kdy $LOQ = 3,3 \cdot LOD$.

Pro stanovení LOD a LOQ byl použit stejný modelový vzorek, jako pro stanovení návratnosti metody.

2.5 Liberační testy oktokrylenu

Liberační testy OC byly prováděny ve spolupráci s Katedrou analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Hany Sklenářové, Ph.D., kde se liberačním testům léčiv a jím podobných přípravků intenzivně věnují. Liberace je metodou určenou primárně pro sledování prostupu léčiv kůží (stanovení účinnosti dermálně aplikovaných léčiv), a mohla by být proto použitelná i pro stanovení průchodu UV filtrů z opalovacích krémů do krevního řečiště.

2.5.1 Příprava octanového pufru

Pro přípravu 250 ml octanového pufru bylo naváženo 0,7475 g octanu sodného, který byl následně rozpuštěn v 0,2% vodném roztoku kyseliny octové. Jelikož je OC nerozpustný ve vodě, byl pro jednu analýzu připraven i octanový pufr obsahující 10 % ethanolu.

2.5.2 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky OC v octanovém pufru byly připravovány tak, aby odpovídaly předpokládanému procentuálnímu prostupu OC skrz membránu, který se pro podobné sloučeniny obvykle pohybuje v řádech desetin procenta [76–79]. Pro měření byl připraven roztok obsahující 10 % OC. Z tohoto roztoku byla připravována kalibrační řada postupným ředěním octanovým pufrům. Koncentrační rozsah kalibrační řady činil 0,2–1 % OC. Signál samotného octanového pufru pak odpovídal 0 % OC. Naměřené hodnoty byly použity k sestavení grafické závislosti hodnoty signálu ku procentům obsahu OC v kalibračním roztoku.

2.5.3 Podmínky měření sekvenční injekční analýzy spojené s Franzovou difúzní celou

Jednotlivé parametry systému pro stanovení liberace OC v modelovém roztoku jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Parametry SIA systému

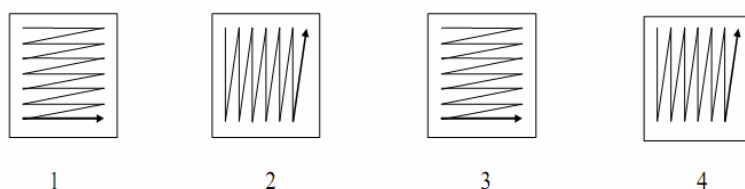
Vlnová délka detekce	250 nm
Délka jednoho cyklu liberace (2 signály)	5 minut
Rychlost aspirace nosného plynu	60 $\mu\text{l/s}$
Objem Franzovy cely	15 ml
Teplota vodní lázně	32 °C
Otáčky míchačky	380 rpm
Objem pro doplnění Franzovy cely	220 μl
Objem aspirace vzorku	50 μl
Objem toku do detektoru	700 μl
Rychlost toku do detektoru	30 $\mu\text{l/s}$
Rychlost aspirace vzorku	30 $\mu\text{l/s}$
Objem aspirace nosného proudu	650 μl

2.5.4 Pracovní postup liberace

Samotná SIA sestava byla před zahájením procesu liberace promývána redestilovanou vodou, dokud nebyly ze systému odstraněny viditelné bubliny. Následně byla sestavena Franzova cela, jejíž spodní část byla naplněna octanovým pufrem (přibližně 15 ml) a bylo do ní umístěno magnetické míchadlo. Na tuto část byla umístěna polykarbonátová membrána tak, aby pod ní nebyla bublina. Na membránu byla přiložena horní část Franzovy cely a celá sestava byla zajištěna svorkou. Takto připravená Franzova cela byla umístěna do předem vytemperované vodní lázně a do její spodní části byly zavedeny hadičky SIA systému. Po ustálení teploty ve Franzově cele byl do její vrchní části nadávkován 1 ml 10% methanolického roztoku OC a bylo spuštěno měření v programu FIAlab. Vyhodnocení koncentrace OC ve spodní části Franzovy cely probíhalo každých 5 minut po dobu 1,5–2 hodin. Výsledky tohoto měření byly následně zaznamenány a procentuální prostup OC skrz membránu byl vypočítán z rovnice kalibrační křivky. Provedeny byly tři liberace OC, přičemž rozdílné bylo složení liberačního činidla ve spodní části Franzovy cely a čas liberace. Dvě liberace proběhly s octanovým pufrem, přičemž jedna byla sledována po dobu 2 hodin a druhá po dobu 1,5 hodiny. Třetí liberace byla provedena s roztokem octanového pufru a 10% methanolu po dobu 1,5 hodiny.

2.6 Stanovení fotostability oktokrylenu

Ověření stability OC bylo provedeno ve dvou UV boxech a s pomocí lampy simulující sluneční světlo. Pro tato měření byly použity tři materiály sloužící jako podložka pro nanášení vzorku. Šlo o PMMA destičky, porcelánové kapkovací destičky a podložní sklička. V případě analýzy reálných vzorků opalovacích přípravků byl analyzován jeden krém a jeden sprej. Tyto přípravky byly diferenčně naváženy (50 mg) přímo na plochu podložky (v sedmi replikách), rozetřeny kopistí, jak je uvedeno na obrázku 11, a umístěny do UV komor nebo pod lampu simulující sluneční světlo, a to po dobu 7 hodin. Analýza vzorků byla prováděna vždy po jedné hodině. UV box Desaga využívá kombinace dvou lamp s vlnovými délkami 254 a 366 nm a spolu s lampou je stačí pouze zapnout. UV box Uvitec využívá tři pětiwattové UV žárovky s vlnovými délkami 254, 312 a 365 nm a jeho výkon je nastavitelný. Pro stanovení stability OC byla nastavena vždy jedna hodina, která odpovídá výkonu $0,12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. Zpracování osvětleného vzorku pro následnou analýzu probíhalo stejným způsobem jako při přípravě vzorku bez degradace (viz kapitola 2.3).



Obrázek 11 Způsob roztírání vzorku na destičku (upraveno) [83]

K porovnání výsledků měření a zároveň eliminaci vlivu stabilizačních látek obsažených v přípravcích na opalování byl proces degradace sledován také na standardu OC. Množství 5 mg standardu bylo odváženo do sedmi jamek porcelánové kapkovací destičky a na 7 podložních sklíčků. Následně byl standard rozetřen stejným způsobem jako reálné vzorky a podroben identickému procesu ozařování v obou UV boxech i pod lampou.

2.7 Zpracování experimentálních dat

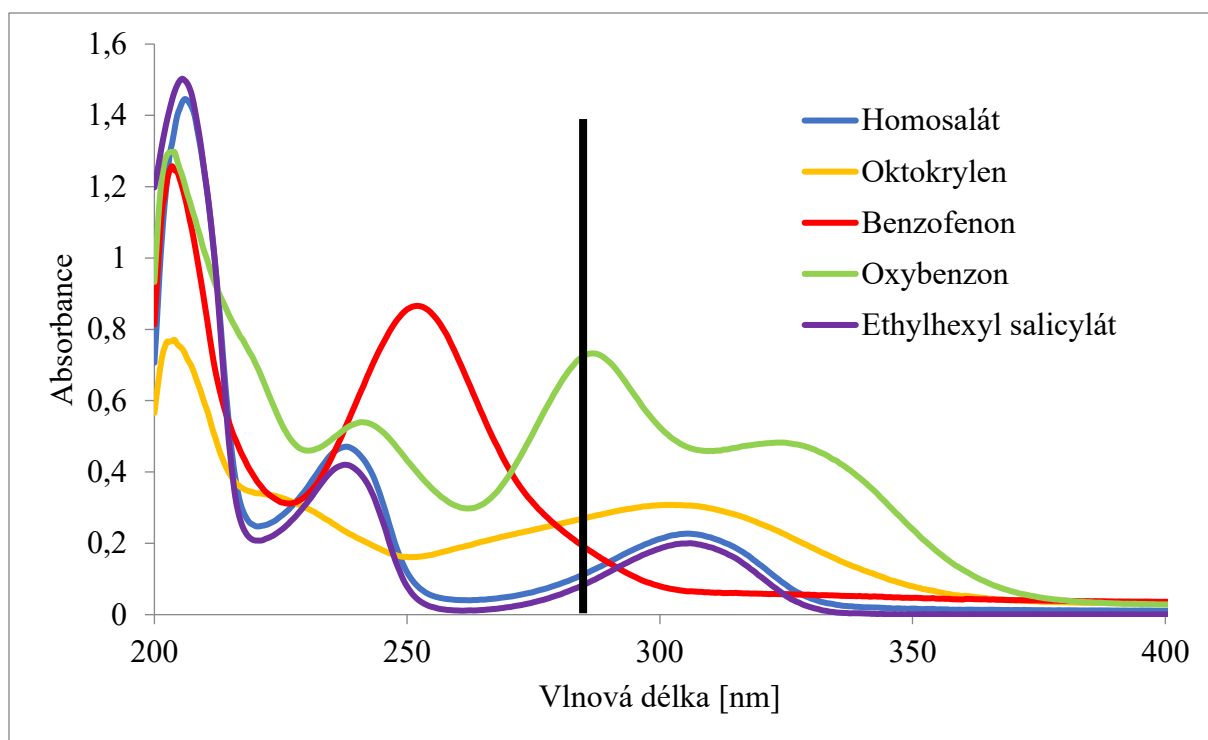
Pro zpracování získaných dat po HPLC separaci, spektrofotometrickém měření a liberaci byl použit program Excel a Word programového balíku Microsoft Office 365. Ke sběru dat z HPLC měření byl použit program Clarity (DataApex, Praha, Česká republika). Při SIA analýze byl použit program FIALab 5.0 (Seattle, USA).

Standardní roztoky pro přípravu kalibrační křivky byly spolu s reálnými vzorky analyzovány vždy ve třech opakováních ($n = 3$) a výsledky byly vypočteny a prezentovány jako intervaly spolehlivosti $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}/\sqrt{n}$, kde \bar{x} je aritmetický průměr, s směrodatná odchylka a $t_{1-\alpha}$ kritická hodnota Studentova (t -rozdělení) pro tři opakovaná měření (dva stupně volnosti; 4,303) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95% pravděpodobnost). Nakonec byly pomocí analýzy dat použitím softwaru Microsoft Excel 365 stanoveny směrodatné odchylky směrnice a úseku kalibrační křivky a byla hodnocena jejich významnost.

3. Výsledky a diskuse

3.1 Optimalizace chromatografické separace

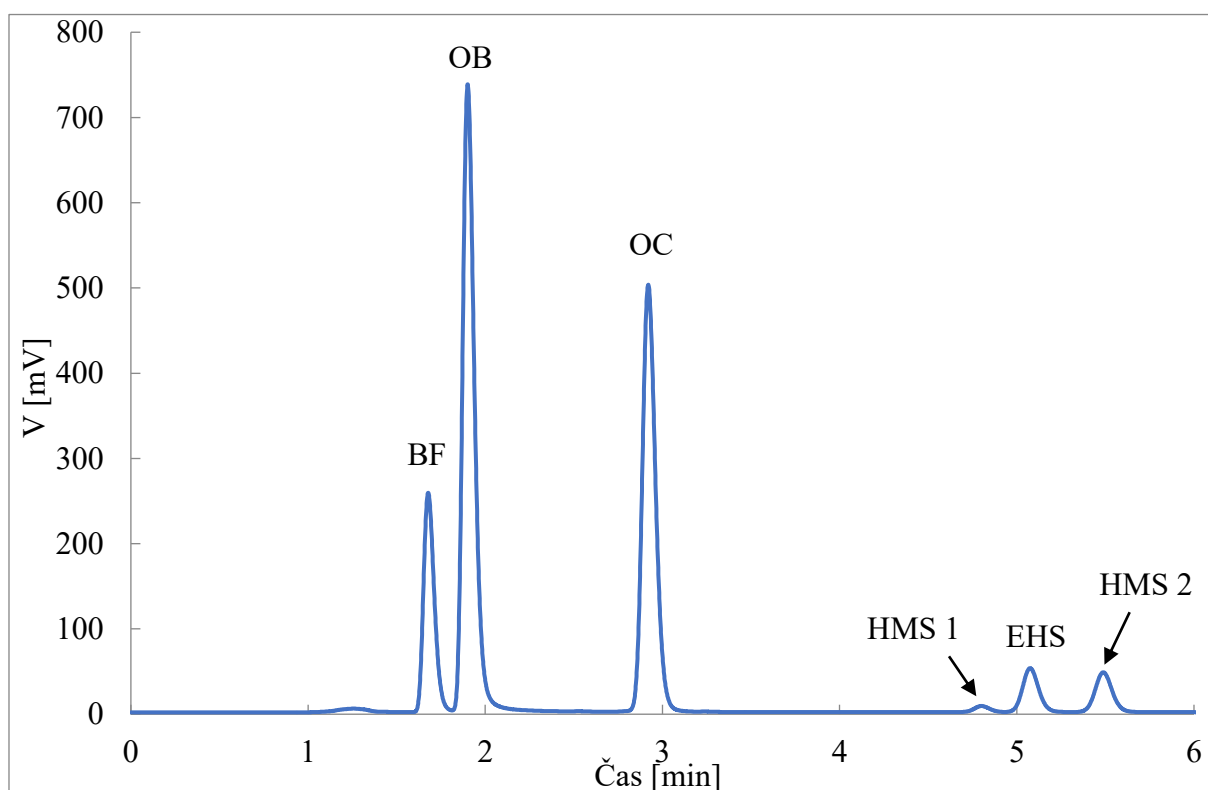
Před samotnou optimalizací chromatografických podmínek bylo nejprve nutné vybrat vhodné rozpouštědlo pro přípravu standardů a jednu vlnovou délku, při níž by dostatečně absorbovaly všechny sledované analyty. Na základě literatury byl testován ethanol [10; 26; 60; 61], methanol [62; 63], acetonitril [65], 2-propanol a směs methanolu a 2-propanolu v poměru 1:1 (v/v) [64]. Nejvyšší odezvu standardy vykazovaly při použití acetonitrilu, který byl tedy následně používán pro přípravu zásobních roztoků i pro zpracování vzorků. Pro zjištění optimální vlnové délky spektrofotometrické detekce pro simultánní chromatografické stanovení všech cílových analytů byla nejprve změřena příslušná UV/VIS spektra. Za tímto účelem byly připraveny 10% roztoky jednotlivých standardů v acetonitrilu, jejichž absorpční chování bylo sledováno v intervalu vlnových délek 800–200 nm. Jelikož HPLC přístroj nedisponoval detektorem s diodovým polem a absorpční maxima jednotlivých analytů se poměrně zásadně liší (obrázek 12), bylo nutné zvolit takovou vlnovou délku, při níž dochází k dostatečné absorpci všech pěti cílových analytů (a je tedy možné jejich stanovení v jedné analýze). Kompromisem byla vlnová délka 285 nm, která byla nastavena na spektrofotometickém detektoru pro všechna chromatografická měření. Při analýze jednotlivých vzorků byl jedním ze sledovaných parametrů výskyt karcinogenního benzofenonu. Pokud byl ve vzorku benzofenon detekován, byla jeho přítomnost potvrzena opětovnou analýzou při vlnové délce jeho absorpčního maxima ($\lambda=255$ nm).



Obrázek 12 UV/VIS spektra roztoků standardů sledovaných UV filtrů o koncentraci 10 % v acetonitrilu

Původní chromatografické podmínky vycházely z již publikovaných zdrojů, které byly modifikovány za účelem zrychlení a zjednodušení celé analýzy [10; 26; 60–65]. Nejprve byly připraveny 10% zásobní roztoky jednotlivých analytů v acetonitrilu, které sloužily pro zjištění příslušných retenčních časů. Následně byla připravena 2% směs všech standardů, na níž probíhala optimalizace separace. Jako mobilní fáze se ve většině dosud publikovaných článků uvádí použití binárních systémů směsi ethanolu [10; 26; 60; 61], acetonitrilu [65] či methanolu [62; 63] a čisté [62] či okyselené vody [10; 26; 60; 61]. Některé zdroje se věnovaly stanovení většího množství UV filtrů (až 15), kde pro dosažení dostatečného rozlišení píků v rozumném časovém horizontu použili gradientovou eluci [26; 60; 61; 65]. Izokratická eluce pak byla pro separaci UV filtrů používána méně, a to v případě, kdy bylo analyzováno menší množství UV filtrů (maximálně 5) [10; 62; 63]. Pro separaci našich analytů byly testovány gradienty o různých počátečních koncentracích organické složky (70–85 %) mobilní fáze a s různou strmostí, stejně jako izokratické podmínky s různě koncentrovanou organickou složkou (80–95 %). Z organických rozpouštědel byl testován methanol a acetonitril, který byl preferován z důvodu jeho použití pro přípravu vzorků k analýze. Směs vody s acetonitrem ale neposkytovala úplné rozlišení všech zkoumaných píků v dostatečně krátkém čase. Optimálních podmínek separace bylo tedy dosaženo při použití izokratické eluce 90% vodného roztoku

methanolu (v/v), při níž byly všechny sledované píky rozděleny během šesti minut, a to s minimálně jednotkovým rozlišením (obrázek 13). Retenční časy (t_R) analytů jsou následovné: $t_R(\text{BF}) = 1,67 \text{ min}$, $t_R(\text{OB}) = 1,89 \text{ min}$, $t_R(\text{OC}) = 2,93 \text{ min}$ a $t_R(\text{EHS}) = 5,10 \text{ min}$. HMS má dva rozlišené píky svých izomerních forem, první při $t_R = 4,86 \text{ min}$ a druhý při $t_R = 5,57 \text{ min}$ (obrázek 13). Značné zlepšení tedy bylo zaznamenáno v celkové době analýzy, jelikož literatura uvádí separace od 10 [10], 15 [62] až do 30 minut [10; 26; 60; 61; 63; 65], nicméně v některých publikacích bylo separováno větší množství UV filtrů [26; 62]. K detekci je často používán detektor s diodovým polem [63; 65]. V našem případě však stačila pro detekci levnější varianta ve formě UV/VIS spektrofotometru. Koncentrace UV filtrů jsou ve vzorcích totiž tak vysoké, že i když nebylo měřeno v optimálních absorpčních maximech jednotlivých látek, pro stanovení jejich limitních koncentrací přítomných ve vzorcích vybraná kompromisní vlnová délka více než dostačovala.



Obrázek 13 Optimalizovaná HPLC separace všech pěti cílových analytů

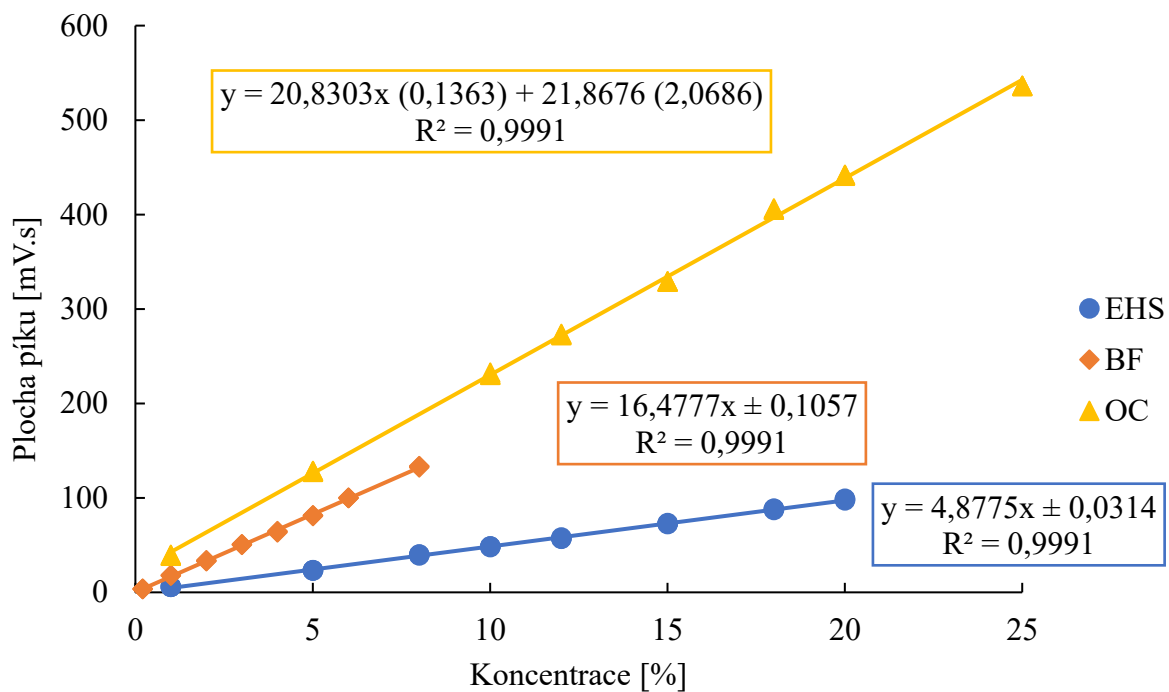
Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (15 cm × 3,0 mm; 2,7 μm); teplota 30 °C; izokratická eluce 90% vodného roztoku methanolu (v/v); 0,5 ml/min; dávkování 2 μl; UV/VIS detekce 285 nm.

3.2 Validace chromatografické metody

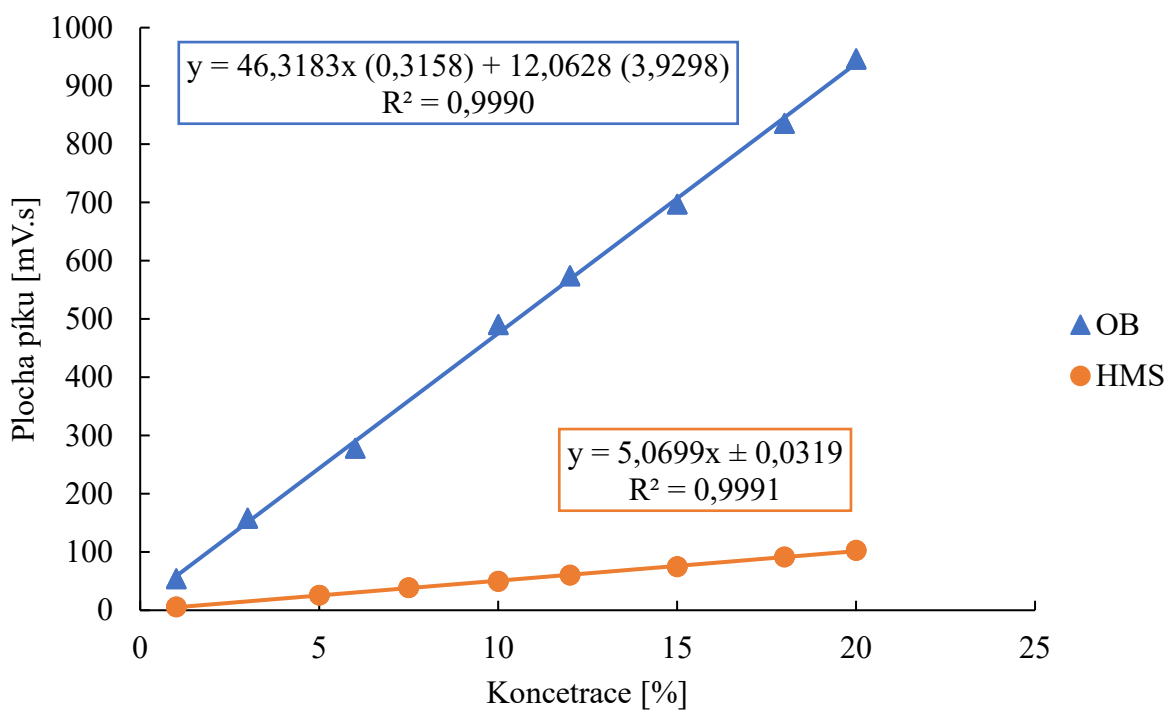
Abychom ověřili nově vyvinutou analytickou metodu, byla provedena její validace, a to v základních parametrech, jako jsou linearita, přesnost, správnost a limity detekce a kvantifikace.

3.2.1 Příprava kalibrační křivky

Pro kvantitativní stanovení UV filtrů ve vzorcích přípravků na opalování byla použita metoda vnějšího standardu, konkrétně kalibrační křivky. Pro EHS, OB a HMS byly připraveny kalibrační roztoky v koncentračním rozsahu 1–20 % a pro OC v rozsahu 1–25 %, jelikož jeho maximální povolená koncentrace je ze všech látek nejvyšší (10 %). Také byla připravena kalibrační křivka BF, který by se v přípravcích na opalování neměl vyskytovat vůbec. Koncentrace standardních kalibračních roztoků BF byly proto upraveny na nižší hodnoty a pohybovaly se mezi 0–8 %. Na obrázcích 14 a 15 jsou znázorněny kalibrační křivky pro jednotlivé látky vyjádřené jako závislost plochy píku na koncentraci. Uvedená je rovněž i příslušná rovnice regrese a koeficient determinace R^2 , který byl ve všech případech $> 0,999$. Každý kalibrační bod byl měřen třikrát, proto každé koncentraci odpovídají také tři body v grafu. Jelikož se i v reálných vzorcích opalovacích krémů nacházely obě izomerní formy HMS, bylo pro jeho kvantitativní stanovení počítáno vždy se sumou ploch obou píků. Pro úsek i směrnici byly spočítány směrodatné odchylky a byla studována i statistická významnost jednotlivých úseků. U kalibrací BF, HMS a EHS bylo zjištěno, že úseky jsou statisticky nevýznamné, a daná metoda je tedy vhodná i pro kvantifikaci metodou standardního přídatku či metodou přímého srovnání. Úseky rovnic regrese OC a OB jsou statisticky významné. Všechny kalibrační křivky jsou v rozsahu stanovovaných koncentrací lineární.



Obrázek 14 Kalibrace EHS, BF a OC



Obrázek 15 Kalibrace OB a HMS

3.2.2 Návratnost metody

Návratností analytické metody byla stanovována odchylka skutečné koncentrace stanovovaných látek od koncentrace experimentálně naměřené. Pro zjištění návratnosti bylo do krémového základu získaného z lékárny odváženo takové množství daného analytu, které odpovídá maximální legislativně povolené koncentraci (10 % OC; 7,34 % HMS; 6 % OB; 5 % EHS a 2 % BF). Tyto naspikované vzorky byly připraveny v trojím provedení. Vypočtené hodnoty návratnosti jednotlivých analytů se pohybovaly v rozmezí 99,2–99,9 % a jsou přehledně shrnuty v Tabulce 3. Všechny stanovené hodnoty návratností jsou srovnatelné či lepší než hodnoty uvedené v literatuře [10; 26; 60; 63; 65]. Zároveň i splňují požadavky z validačních protokolů [84], které by se pro naše koncentrační hladiny měly pohybovat v rozmezí 95–105 % [10; 26; 60; 63; 65]. Detailnější data, jako jsou naměřené plochy píků a skutečné a vypočítané koncentrace jednotlivých analytů, jsou pak uvedeny v Tabulce P1 v příloze.

Tabulka 3 Návratnost metody

Látka	Návratnost [%]
BF	99,2
OB	98,7
OC	99,2
HMS	99,7
EHS	99,9

3.2.3 Opakovatelnost metody

Pro stanovení opakovatelnosti metody byl připraven roztok naspikovaného modelového vzorku (koncentrace UV filtrů: 13 % BF, 9% OB, 7 % OC, 10 % HMS a 5 % EHS), který byl pětikrát analyzován v pěti po sobě jdoucích dnech (mezidenní opakovatelnost) a rovněž i pětikrát v jednom dni (intradenní opakovatelnost). Vždy byla sledována odchylka ploch píků (respektive koncentrací) a retenčních časů látek, která byla vyjádřena jako RSD (viz Tabulka 4). U HMS jsou uvedeny dvě hodnoty RSD retenčního času pro dva píky izomerních forem. Přílohové tabulky P2–P7 pak uvádí retenční časy, plochy píků a koncentrace obdržené pro jednotlivá měření intradenní i mezidenní opakovatelnosti. Jak je patrné z tabulky 4 všechny sledované látky dosáhly v intradenním i v mezidenním měření RSD < 3,7 %, což je maximální možná hodnota [84], kdy je daná metoda ještě považována za dostatečně přesnou. Ostatní

zdroje uvádí hodnoty RSD pro intradenní i mezidenní opakovatelnost také < 3,7 % [10; 26; 60; 61; 62; 63].

Tabulka 4 Intradenní a mezidenní opakovatelnost

Látka	Intradenní opakovatelnost		Mezidenní opakovatelnost			
	RSD retenčního času [min]	RSD koncentrace [%]	RSD retenčního času [min]	RSD koncentrace [%]		
BF	0,2	1,3	0,08	0,4		
OB	0,3	1,1	0,09	1,1		
OC	0,2	1,2	0,01	2,4		
EHS	0,1	1,9	0,2	2,0		
HMS	0,2	0,2	2,9	0,1	0,1	0,9

3.2.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti pro analyzované látky byly vypočítány dle vztahů v kapitole 2.4.3. Hodnoty LOD se pohybovaly v rozmezí $3,34 \cdot 10^{-3}$ – $2,92 \cdot 10^{-1}$ %, zatímco LOQ v rozmezí $1,11 \cdot 10^{-2}$ – $9,6 \cdot 10^{-1}$ % (tabulka 5). Porovnáme-li dosažené výsledky s literaturou, námi vyvinutá metoda dosahuje řádově stejných hodnot LOD i LOQ [10; 26; 60; 61; 63].

Tabulka 5 Meze detekce a stanovitelnosti

Látka	LOD [%]		LOQ [%]	
BF	$9,64 \cdot 10^{-3}$		$3,21 \cdot 10^{-2}$	
OB	$3,34 \cdot 10^{-3}$		$1,11 \cdot 10^{-2}$	
OC	$7,44 \cdot 10^{-3}$		$2,48 \cdot 10^{-2}$	
EHS	$3,86 \cdot 10^{-2}$		$1,28 \cdot 10^{-1}$	
HMS	1. pík	2. pík	1. pík	2. pík
	$2,92 \cdot 10^{-1}$	$4,45 \cdot 10^{-2}$	$9,6 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$

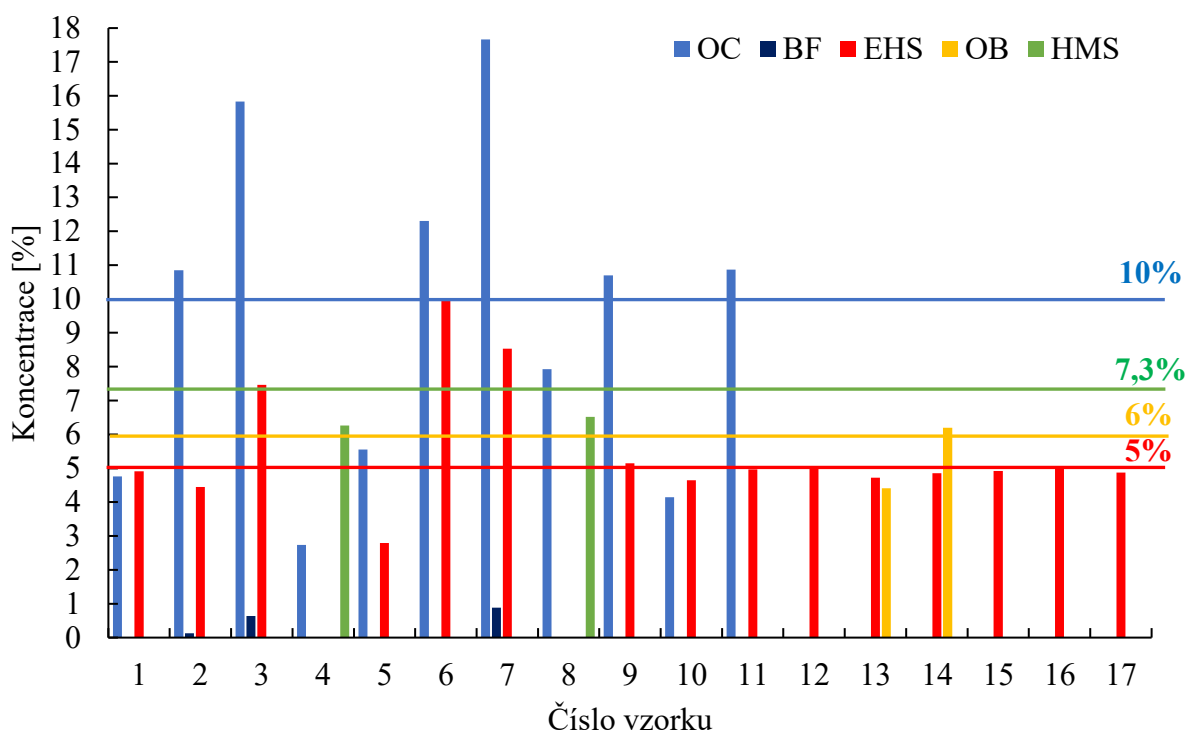
3.3 Stanovení UV filtrů

Celkem bylo analyzováno 17 přípravků s deklarovanou ochranou proti slunci, které byly z různé cenové kategorie a měly různý stupeň SPF ochrany. Tři z těchto vzorků byly pleťové krémy, jeden vzorek byl balzám na rty a ostatní vzorky byly krémy a spreje na opalování. Cílem analýz bylo zjistit, zda koncentrace UV filtrů nepřesahuje maximální povolenou koncentraci podle Evropské Unie, a pokud ano, tak o kolik. Dalším sledovaným parametrem byla možná

přítomnost škodlivého BF, který by se v kosmetických produktech neměl vyskytovat vůbec. Výsledné koncentrace nalezených UV filtrů byly vypočítány pomocí kalibračních zavislostí. Jelikož byla provedena analýza každého vzorku třikrát, výsledky jsou udávány jako aritmetický průměr měření se směrodatnou odchylkou (tabulka 6). Nevyhovující koncentrace UV filtrů a BF jsou v tabulce 6 zvýrazněny tučně. Na obrázku 16 je pak graficky znázorněn obsah sledovaných UV filtrů v jednotlivých vzorcích. Příklad chromatografické separace vzorku č. 7 je pak uveden na obrázku 17. Popsány jsou píky stanovených UV filtrů, a to včetně BF, ostatní odpovídají nejspíše dalším UV filtrům obsaženým v opalovacím krému, které však stanovovány nebyly (například BMBM).

Tabulka 6 Analýza vzorků

Číslo vzorku	SPF	Koncentrace UV filtru [%]				
		OC	HMS	EHS	OB	BF
1	50+	4,76 ± 0,2		4,91 ± 0,4		
2	20	10,85 ± 1,1		4,45 ± 0,2		0,13 ± 0,02
3	20	15,83 ± 0,01		7,46 ± 0,5		0,64 ± 0,01
4	6	2,74 ± 0,04	6,26 ± 0,4			
5	6	5,55 ± 0,1		2,77 ± 1,1		
6	30	12,3 ± 0,05		9,95 ± 0,4		
7	30	17,66 ± 0,9		8,53 ± 0,5		0,88 ± 0,04
8	10	7,93 ± 0,2	6,52 ± 0,4			
9	50+	10,7 ± 0,2		5,15 ± 0,2		
10	50+	4,15 ± 0,3		4,65 ± 0,3		
11	50	10,87 ± 0,3		4,97 ± 0,1		
12	30	<LOQ		4,99 ± 0,3		
13	15			4,72 ± 0,3	4,41 ± 0,1	
14	30			4,85 ± 0,7	6,2 ± 0,1	
15	15			4,92 ± 0,01		
16	15			5,03 ± 0,2		
17	15			4,87 ± 0,4		

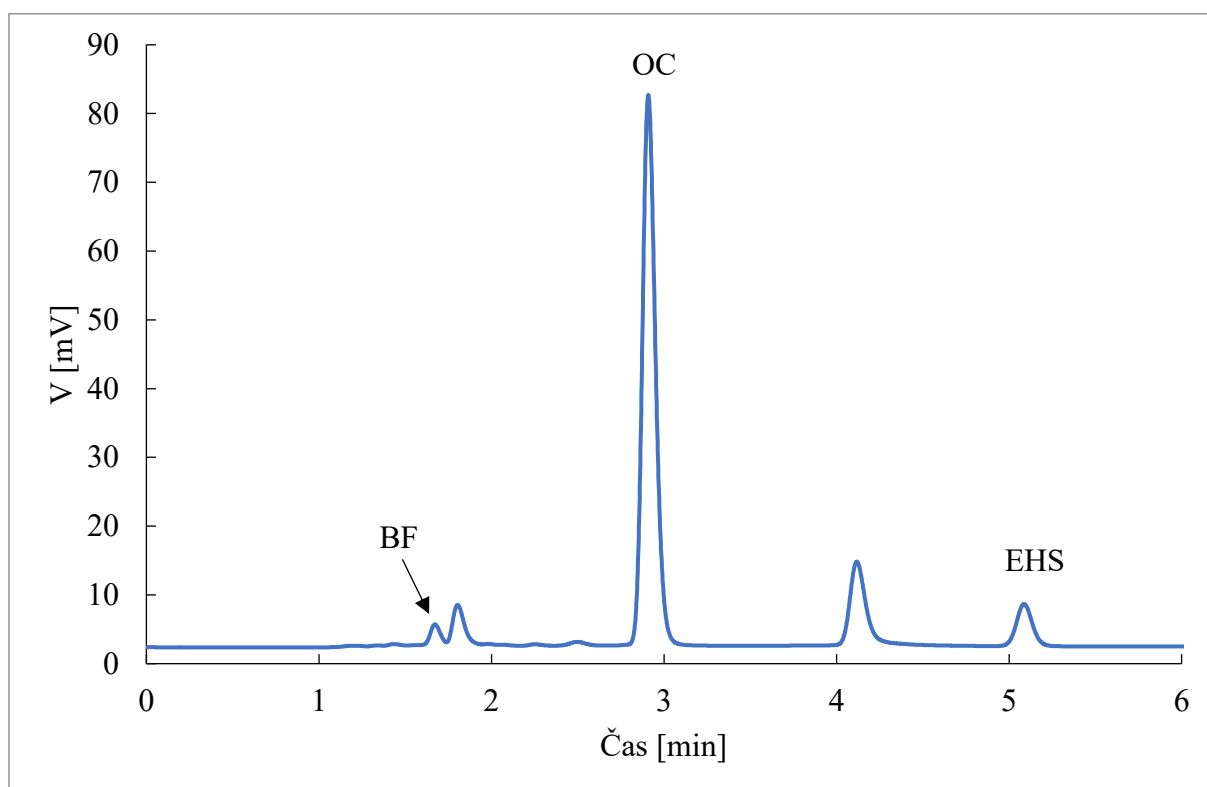


Obrázek 16 Graf UV filtrů obsažených v jednotlivých vzorcích s naznačenými maximálními povolenými limity

Dvanáct vzorků (č. 1–12) mělo ve svém složení deklarovaný OC a ve všech těchto vzorcích byl také nalezen. Maximální možná koncentrace OC je v přípravcích na opalování 10 % [13]. Tuto hranici splňovala pouze polovina z těchto vzorků, přičemž dva nevyhovující vzorky (č. 9 a 11) přesáhly maximální množství o méně než jedno procento. Vzorek č. 2 by vyhověl při zohlednění jeho SD. Nejnižší množství OC bylo stanoveno ve vzorku č. 12, kde jeho koncentrace nedosahovala limitu kvantifikace. Naopak nejvyšší koncentrace OC (kolem 17 %) byly nalezeny ve dvou sprejích na opalování se středním stupněm ochrany (vzorky č. 3 a 7). EHS byl obsažen ve všech vzorcích, kromě dvou sprejů na opalování (č. 4 a 8). Ve třech vzorcích (č. 3, 6 a 7) byla jeho koncentrace vyšší, než je povoleno ($c_{MAX} = 5 \%$, [15]), přičemž vzorek č. 6 obsahoval EHS v téměř dvojnásobném množství. Ve většině vzorků (vzorky č. 1, 2 a 9–17) se jeho koncentrace pohybovala právě kolem hraniční hodnoty 5 %. HMS se nacházel ve dvou z analyzovaných vzorků (č. 4 a 8, oba od značky Astrid) a v obou případech nedošlo k překročení jeho maximálního povoleného množství (7,34 %, [14]). OB se také nacházel pouze ve dvou vzorcích (č. 13 a 14, oba od značky Avon), přičemž vzorek č. 14 překročil jeho maximální povolenou koncentraci (6 %) o 0,2 %. Z hlediska nálezu BF pak nevyhovovaly tři vzorky (č. 2, 3 a 7), kde byl kvantifikován v koncentracích do jednoho procenta. Jednalo se zároveň o vzorky s naprosto nejvyšším obsahem OC, což by mohlo naznačovat, že opravdu

dochází k retro-aldolové reakci OC na jeho výchozí sloučeniny [31]. Naprosto nejhůře tedy dopadl vzorek č. 7 (Sun Dance Spray) od značky DM, jenž obsahoval nepřipustné množství OC a EHS, a navíc v něm byl ještě detekován zakázaný BF, a to v koncentraci téměř 1 %. Další alarmující výsledky pak vykazovaly vzorky č. 2 (Transparent Spray od značky Lilien), č. 3 (Sun Spray od značky Cien) a č. 6 (Sun Dance Cream od značky DM), v nichž zdaleka nebyly dodrženy maximální přípustné koncentrace UV filtrů, a navíc ještě obsahovaly (vzorek č. 2 a 3) nemalé množství BF. Z naměřených výsledků je dále patrné, že SPF faktor nehraje roli ve kvantitativním zastoupení jednotlivých UV filtrů.

V literatuře nebyly obsahy UV filtrů v komerčních produktech příliš často kvantifikovány či jinak významně hodnoceny. Pozornost autorů byla zaměřena spíše na jejich kvalitativní analýzu s důrazem na vysoké rozlišení všech píků [10; 26; 62; 63; 65]. Zajímavostí je, že ač je EHS jedním z nejčastěji používaných UV filtrů současnosti, literatura se jeho stanovení často vůbec nevěnuje, ale zaměřuje se na „problémovější“ UV filtry, jako je OC, HMS či OB (potencionální karcinogeny a endokrinní disruptory).

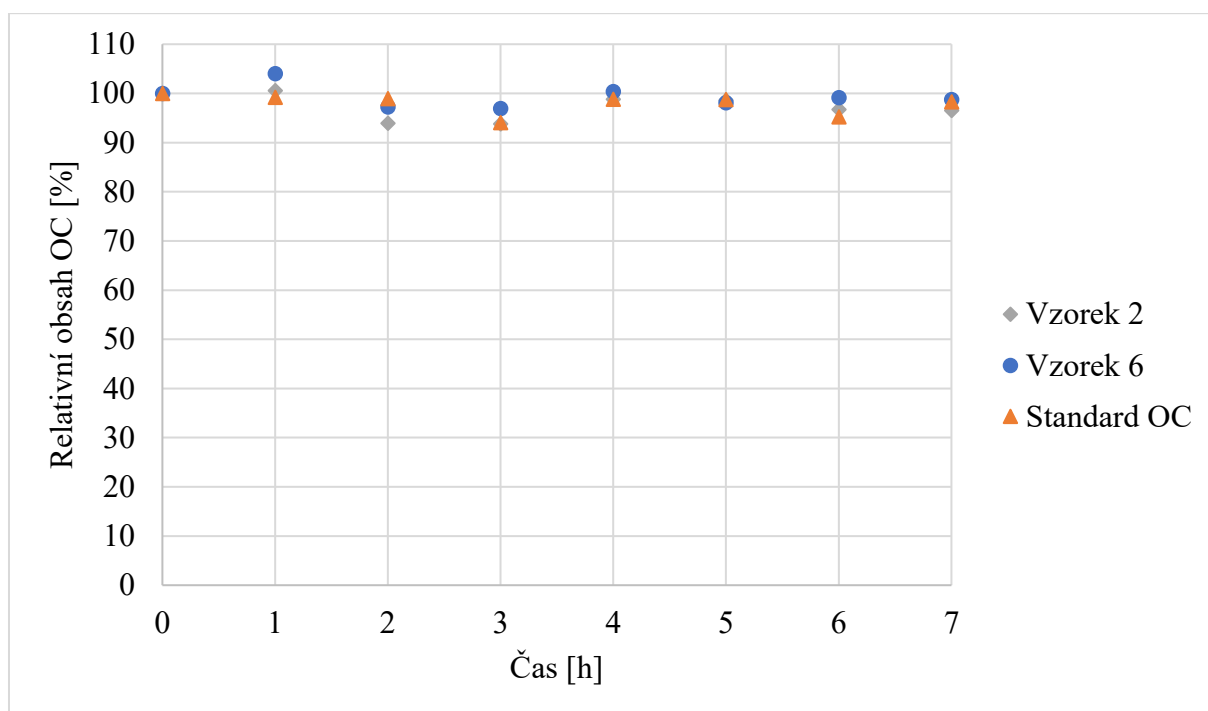


Obrázek 17 Příklad HPLC separace vzorku č. 7 s deklarovaným obsahem OC a EHS

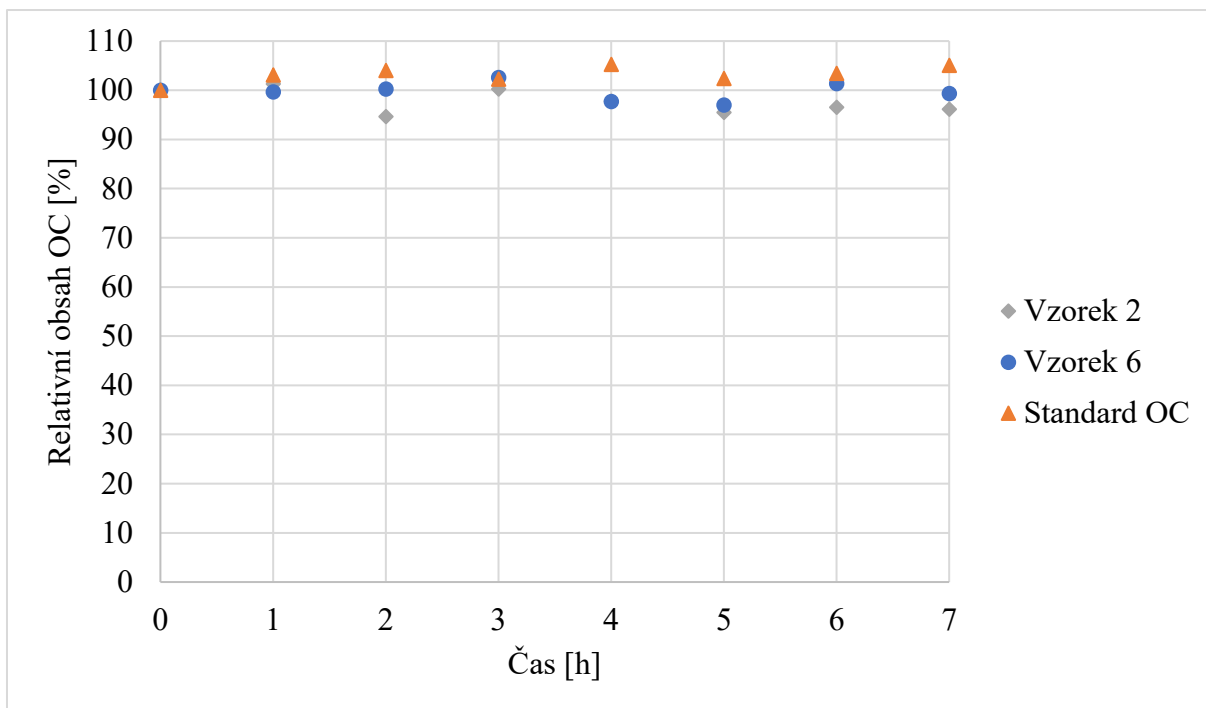
Podmínky analýzy: Ascentis Express C18 (15 cm × 3,0 mm; 2,7 μm); teplota 30 °C; izokratická eluce 90% vodného roztoku methanolu (v/v); 0,5 ml/min; dávkování 2 μl; UV/VIS detekce 285 nm.

3.4 Stanovení fotostability oktokrylenu

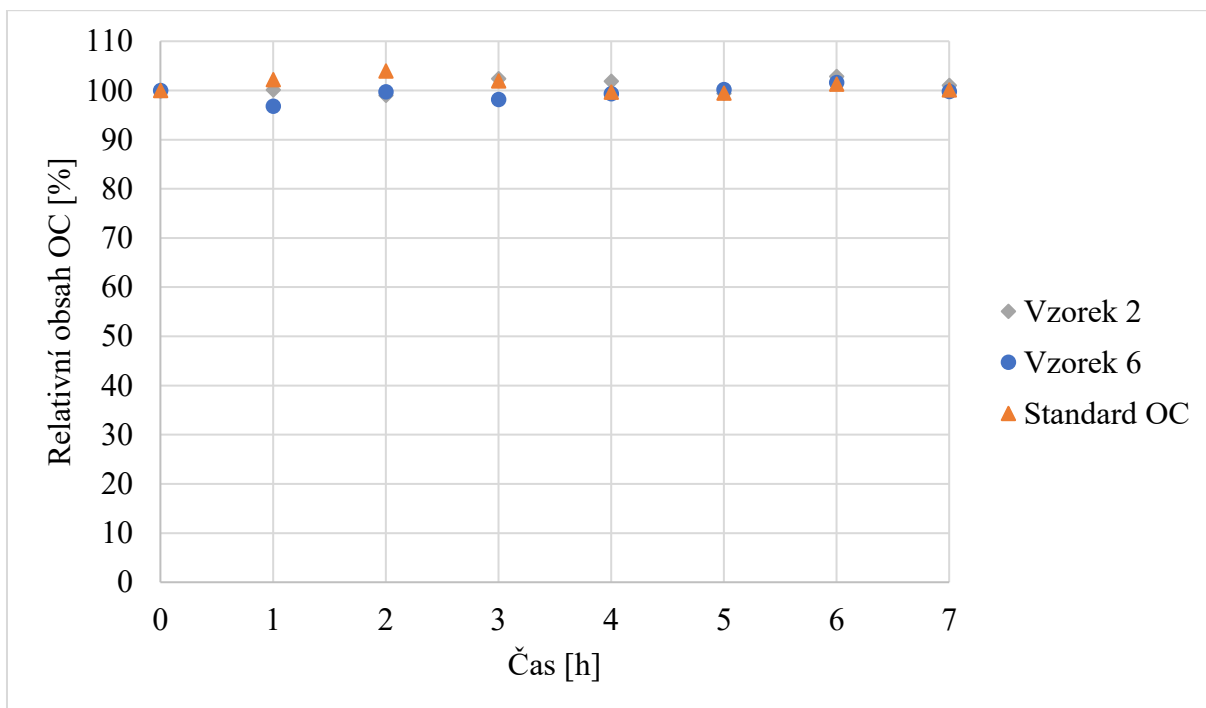
Z předchozích poznatků bylo nutné ověřit, zda OC nepodléhá retro-aldolové reakci vedoucí ke snížení koncentrace detekovaného OC a zároveň k nárůstu množství BF či počtu píků v chromatogramu. Z tohoto důvodu byl opalovací krém č. 6 a opalovací sprej č. 2 (oba obsahující vysoké množství OC) vystaven UV záření po dobu 7 hodin, a to ve dvou UV boxech a pod lampou simulující sluneční záření. Nejprve bylo postupováno podle normy týkající se stanovení SPF faktoru [73], v níž vzorek nanáší na polymethylmetakrylátové destičky o rozměrech 4x4 cm. Následně však bylo zjištěno, že komponenty obsažené v opalovacích krémech (př. změkčovadla) tyto destičky rozleptávají, a proto byly pro další experimenty používány porcelánové a skleněné materiály. V následujících grafech (obrázek 18 až 20) jsou zaznamenány změny koncentrace OC v čase při použití jednotlivých přístrojů. Při vyhodnocování výsledků byla porovnávána naměřená plocha píku po degradaci s naměřenou plochou píku před degradací. Výsledky jsou pak uvedeny v relativních procentech.



Obrázek 18 Změny koncentrace OC standardu a OC přítomného ve vzorku č. 2 a 6 po ozáření v UV boxu UVITEC



Obrázek 19 Změny koncentrace OC standardu a OC přítomného ve vzorku č. 2 a 6 po ozáření v UV boxu Desaga



Obrázek 20 Změny koncentrace OC standardu a OC přítomného ve vzorku č. 2 a 6 po ozáření pod lampou Philips

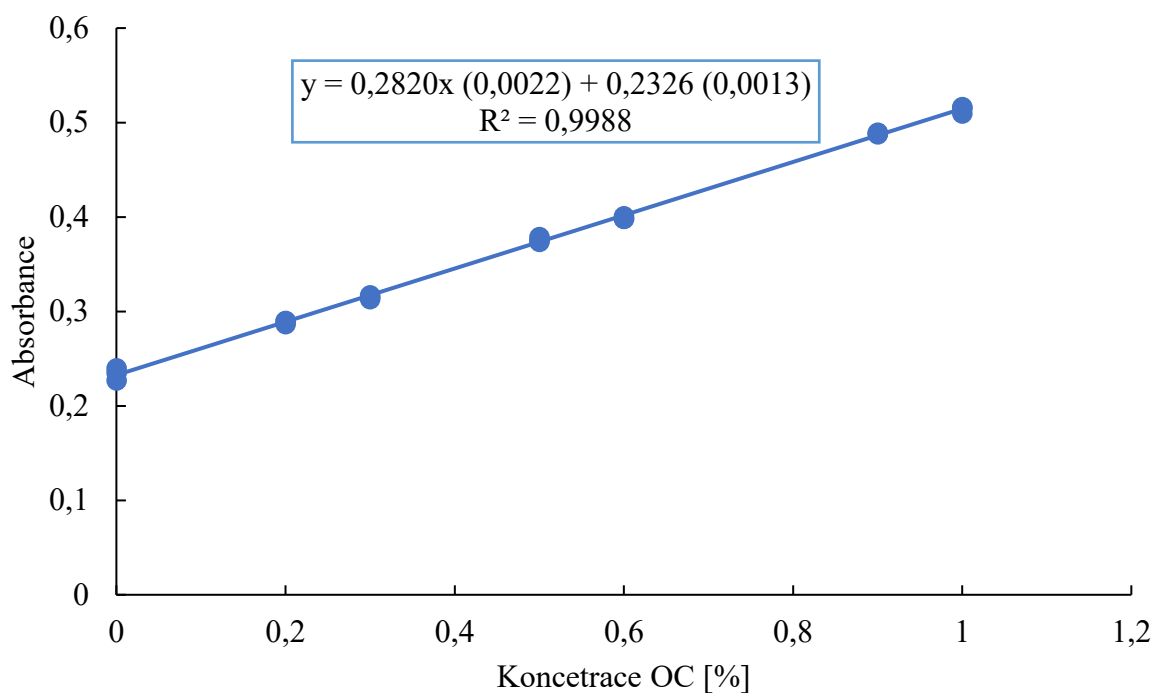
Z grafů na obrázcích 18 až 20 je patrné, že ke statisticky významnému poklesu koncentrace OC při jednotlivých měření nedocházelo. Obsah OC ve všech měřených vzorcích

kolísal mezi 95–105 %, což mohlo být částečně způsobeno i chybou při navážce. U žádného vzorku zároveň nedocházelo ani ke zvýšení počtu píků v chromatogramu, ani ke zvětšování plochy píku BF. Lze tedy konstatovat, že se OC v žádném ze vzorků nerozkládal. Vzorky byly navíc vystaveny záření po nadstandardní dobu. Výrobci totiž obvykle uvádí, že člověk má mít na sobě produkt na opalování maximálně 2 hodiny, a poté doporučuje vrstvu obnovit. Simulace však byla provedena v delším časovém rozsahu, protože u některých profesí (rybáři, dělníci na stavbách atd.) by v extrémním případě i taková doba byla možná. Jelikož reálný vzorek opalovacího přípravku obsahuje i látky stabilizující UV filtry, byl stejným způsobem ozařován i standard OC. Ani v tomto případě však nebyla zaznamenána fotochemická degradace OC (obrázky 18–20). Ačkoliv již byla publikována jistá data týkající se potenciálního rozkladu OC na BF [31], podrobný výzkum, v němž by byl standard OC nebo opalovací přípravek obsahující OC vystavovaný UV záření nebyl nalezen.

3.5 Liberační testy oktokrylenu

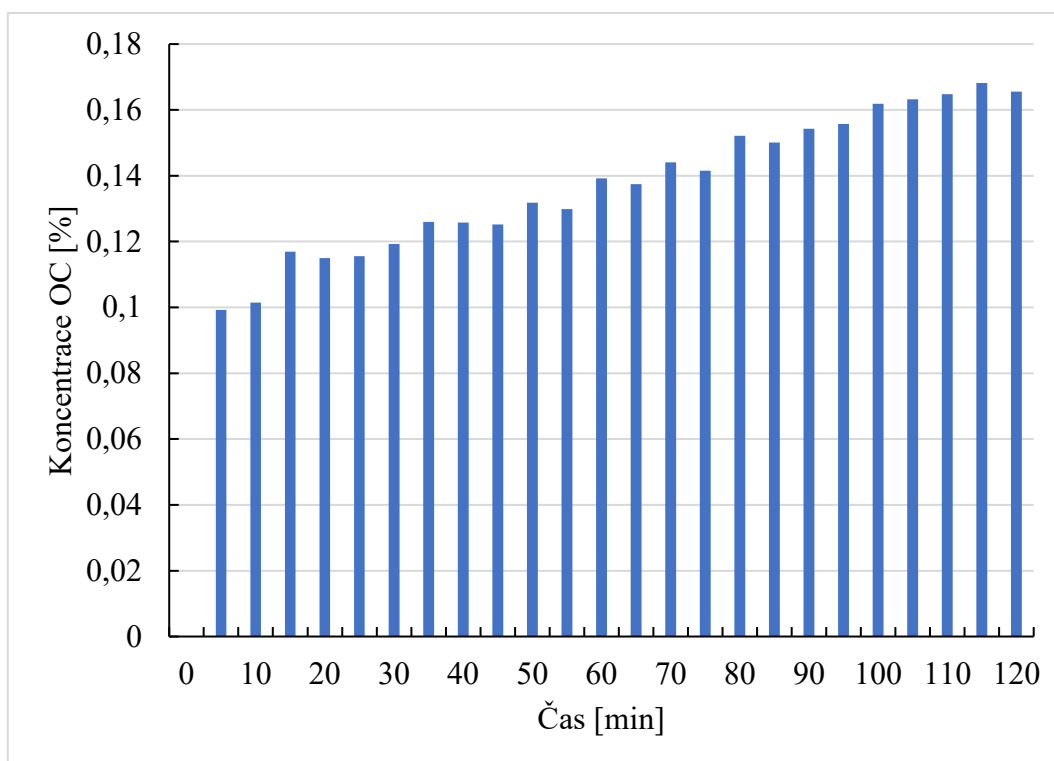
Při liberačních testech je zjišťováno, zda zkoumané látky neprocházejí přes modelovou membránu, která má imitovat lidskou kůži. Tato metoda je určena primárně pro výzkum léčiv, kdy je zjišťováno, zda léčiva prochází přes kůži na místo svého účinku. Naopak se u některých látek hodnotí, jestli přes kůži neprocházejí [76–80]. Tak tomu je také v případě OC, jehož průchod kůží je vysoce nežádoucí, a to kvůli ztrátě ochrany kůže před UV zářením a zároveň jeho potenciální karcinogenitě. Z tohoto důvodu byl OC podroben liberačním testům. Podobný výzkum, který by se liberaci OC věnoval, nebyl objeven.

Kalibrační roztoky byly připraveny v koncentračním rozmezí 0–1 % OC v ethanolu a změřeny za podmínek uvedených v kapitole 2.5.3 a postupem uvedeným v kapitole 2.5.4. Grafické znázornění kalibrace OC je včetně rovnice regrese a koeficientu determinace uvedeno na obrázku 21. Koeficient determinace dosahoval hodnoty 0,999. Zároveň byla studována statistická významnost úseků získaných z rovnic regrese a pro úsek i směrnici byly spočítány směrodatné odchylky. Úsek rovnice byl vyhodnocen jako významný. Kalibrační křivka byla v rozsahu stanovovaných koncentrací lineární.



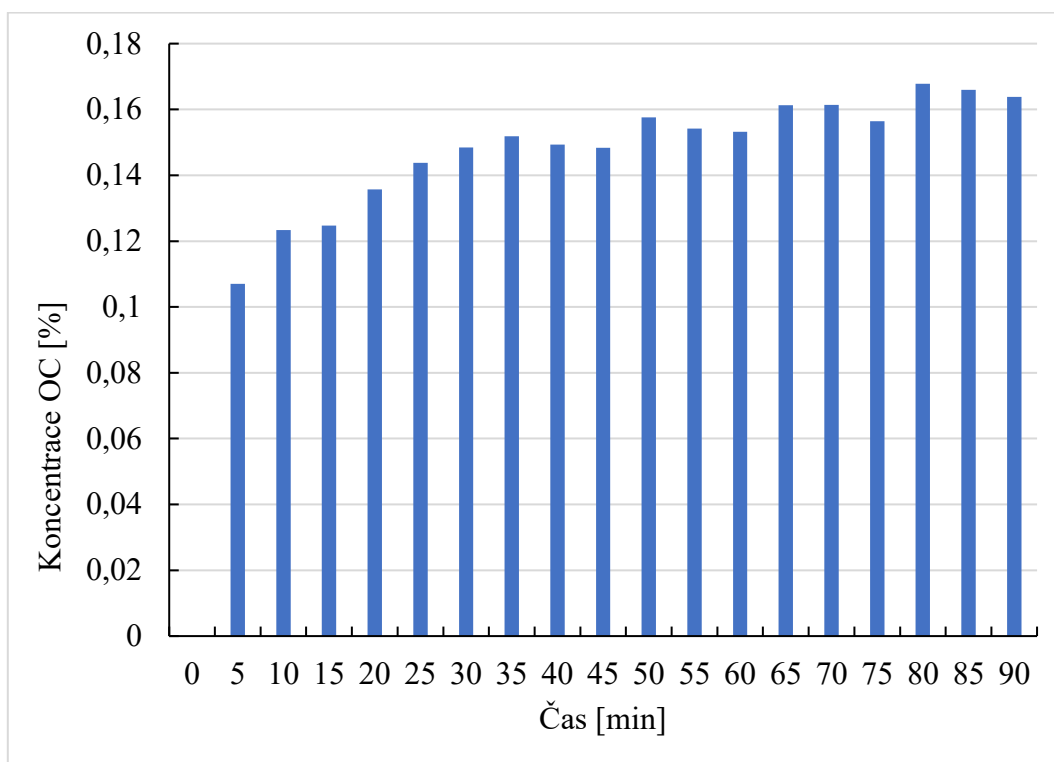
Obrázek 21 Kalibrace OC pro liberační testy

Liberace OC byla měřena nejprve po dobu 120 minut (obrázek 22) a následně po dobu 90 minut (obrázek 23). Jelikož je OC prakticky nerozpustný ve vodě, a tím také v octanovém pufru, byl jako třetí liberační médium použit roztok octanového pufru s 10 % ethanolu (obrázek 24). Hodnota pH octanového pufru a nastavené podmínky liberace odpovídají podmínkám na lidské kůži. Počáteční signál při měření průchodu OC je odezvou samotného octanového pufru, nárůst signálu pak znamená procentuální nárůst koncentrace OC v liberačním činidle.

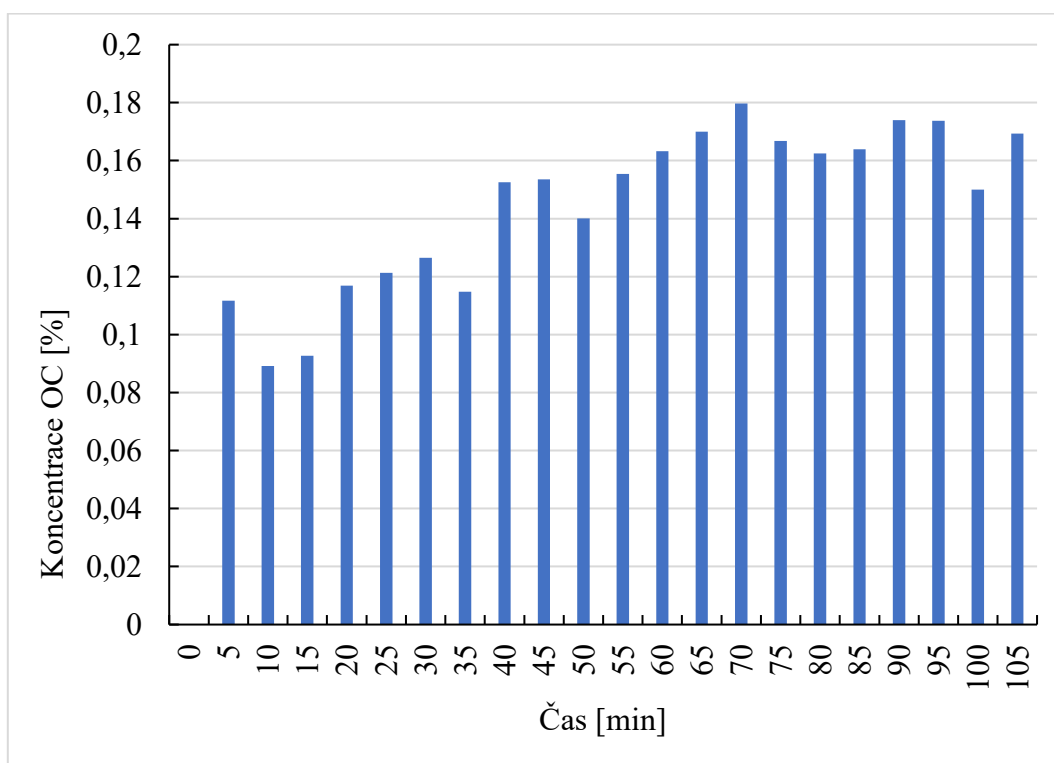


Obrázek 22 Librace OC do octanového pufru sledovaná po dobu 120 minut

Z obrázku 22 je patrné, že k průchodu OC membránou docházelo a jeho koncentrace v liberačním médiu postupně narůstala z 0 % na počátku na maximálních 0,168 % po 115 minutách měření. Patrný je postupný nárůst, zejména pak v prvních 100 minutách měření. Nejvyšší zaznamenaná koncentrace OC (0,168 %) je však pořad velice nízká, což svědčí o tom, že kůži do těla prochází pouze zanedbatelné, zdraví neškodné množství. Jelikož koncentrace OC výrazněji rostla v prvních 100 minutách, byl experiment s octanovým pufrům ještě jednou zopakován, avšak pouze v tomto kratším časovém intervalu. Jak je zřejmé z obrázku 23, oba experimenty poskytly srovnatelné výsledky. V tomto případě byl ale prakticky celý nárůst zaznamenan již v prvních 50 minutách. Jelikož se OC špatně rozpouští ve vodě, byla následně změřena librace OC do roztoku octanového pufru s 10 % ethanolom. Měření bylo prováděno po dobu 105 minut. Z obrázku 24 je zjevné, že přidání ethanolu do liberačního média, a tím potenciální zvýšení rozpustnosti OC, významně neovlivnilo průchod OC přes membránu. Po 70 minutách měření bylo dosaženo koncentračního maxima (0,18 %), které se však významně nelišilo od předchozích měření (0,168 %). Zajímavé je, že k nárůstu koncentrace OC došlo opět během kratšího časového úseku. Důvodem rozdílu v rychlosti nárůstu koncentrace OC mohlo být vytvoření bubliny v dolní části Franzovy cely při prvním měření, čímž bylo zvyšování koncentrace pomalejší.



Obrázek 23 Liberace OC do octanového pufu sledovaná po dobu 90 minut



Obrázek 24 Liberace OC do octanového pufu s 10 % ethanolu sledovaná po dobu 105 minut

Práce na podobné téma se většinou zabývají hodnocením liberace léčiv z jejich masťových základů (př.: liberace klotrimazolu [76; 77]). Samotné UV filtry těmito liberačním testům téměř vůbec nejsou podrobovány. Byla však provedena jedna studie, která se věnovala liberaci UV filtru sulisobenzonu (benzofenon-4), který se přes polykarbonátovou membránu uvolňoval velice snadno ze všech testovaných roztoků opalovacích krémů, a to až v 90 % [78]. OC tedy v porovnání se sulisobenzonem neprochází kůží téměř vůbec, a lze ho tedy považovat za zdraví neškodný.

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla vyvinuta metoda ultrazvukem asistované extrakce organických UV filtrů, které jsou nejčastěji používány v kosmetickém průmyslu, a dále jejich stanovení pomocí kapalinové chromatografie v systémech s obrácenými fázemi. V případě extrakce poskytovalo nejlepší výsledky použití 100% acetonitrilu. Optimalizované podmínky chromatografické analýzy využívaly analytickou kolonu Ascentis Express C18 (15 cm × 3,0 mm; 2,7 μm) temperovanou na teplotou 30 °C, mobilní fázi tvořenou směsí methanolu a vody (9:1; v/v) v režimu izokratické eluce s průtokem 0,5 ml/min a spektrofotometrickou detekci při 285 nm. Separace proběhla do 6 minut (s minimálně jednotkovým rozlišením všech monitorovaných látek). Celkem bylo analýze podrobena 17 vzorků se zaměřením na procentuální obsah sledovaných UV filtrů (oktokrylenu, oxybenzonu, homosalátu a ethylhexyl salicylátu) a obsah benzofenonu. Hodnocena byla skutečnost, zda jejich koncentrace nepřesahuje limity dané legislativou Evropské Unie. Limity oktokrylenu nebyly splněny v polovině případů, ethylhexyl salicylát byl obsažen v nadlimitním množství v pětině vzorků a oxybenzon v jednom případě ze dvou vzorků s jeho deklarovaným obsahem. Homosalát nepřekročil povolené množství ani v jednom ze dvou vzorků s jeho deklarovaným obsahem. Karcinogenní benzofenon, jehož přítomnost je v kosmetických přípravcích zakázána, byl nalezen ve třech vzorcích.

Hodnocena byla také stabilita oktokrylenu při expozici UV nebo slunečnímu záření. Expozice probíhaly vždy 7 hodin, a to ve dvou UV boxech a pod lampou simulující slunce. Ani v jednom případě nedocházelo k žádnému statisticky významnému úbytku jeho koncentrace, proto by mohl být považován za fotostabilní. Byla tedy vyvrácena hypotéza popisující jeho retro-aldolovou kondenzaci vedoucí k tvorbě karcinogenního benzofenonu.

Ve spolupráci s Farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové byly dále provedeny i liberační testy oktokrylenu, které ukazují, že oktokrylen přes membránu imitující lidskou kůži v žádném významném množství neprochází. Z tohoto důvodu může být považován za zdraví neškodný a přípravky na opalování s jeho obsahem neztrácí stupeň ochrany vlivem penetrace UV filtru pokožkou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHATZIGIANNI, Myrto, Panagoula PAVLOU, Angeliki SIAMIDI, Marilena VLACHOU, Athanasia VARVARESOU a Spyridon PAPAGEORGIU. Environmental impacts due to the use of sunscreen products: a mini-review. *Ecotoxicology* [online]. 2022, **31**(9), 1331-1345 [cit. 2023-11-28]. ISSN 0963-9292. Dostupné z: doi:10.1007/s10646-022-02592-w
- [2] BAKER, Lewis A., Michael D. HORBURY a Vasilios G. STAVROS. Ultrafast photoprotective properties of the suncreening agent octocrylene. *Optics Express* [online]. 2016, **24**(10), 10700-10709 [cit. 2023-12-05]. ISSN 1094-4087. Dostupné z: doi:10.1364/OE.24.010700
- [3] HOLT, Emily L., Konstantina M. KROKIDI, Matthew A. P. TURNER, Piyush MISHRA, Timothy S. ZWIER, Natércia d. N. RODRIGUES a Vasilios G. STAVROS. Insights into the photoprotection mechanism of the UV filter homosalate. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2020, 2020-07-15, **22**(27), 15509-15519 [cit. 2023-12-05]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/D0CP02610G
- [4] COLE, Curtis, Thomas SHYR a Hao OU-YANG. Metal oxide sunscreens protect skin by absorption, not by reflection or scattering. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* [online]. 2016, **32**(1), 5-10 [cit. 2024-01-06]. ISSN 0905-4383. Dostupné z: doi:10.1111/phpp.12214
- [5] SHAHBANDEH, M., N. SHAATH, P. T. CRADDOCK, et al. History of sunscreen: An updated view. *Wiley Online Library* [online]. [cit. 2023-11-13]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jocd.14004>
- [6] DRUML, Lauren, Amber M ILYAS a Erum N ILYAS. Sunscreen Label Marketing Towards Pediatric Populations: Guidance for Navigating Sunscreen Choice. *Cureus* [online]. 2023, **15**(10) [cit. 2024-02-20]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.46785
- [7] SPACE ENVIRONMENT TECHNOLOGIES. *ISO 21348 Definitions of Solar Irradiance Spectral Categories*. Dostupné také z:

https://web.archive.org/web/20131029233428/http://www.spacewx.com/pdf/SET_21348_2004.pdf

- [8] SAYRE, Robert M., Joseph STANFIELD, Dennis L. LOTT a John C. DOWDY. Simplified method to substantiate SPF labeling for sunscreen products. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* [online]. 2003, **19**(5), 254-260 [cit. 2024-02-20]. ISSN 0905-4383. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0781.2003.00050.x
- [9] UVA protection logo on sunscreens (European Union). *Wikipedia* [online]. 2009 [cit. 2024-01-31]. Dostupné z: https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:UVA_logo.svg
- [10] CHISVERT, A., M.C. PASCUAL-MARTÍ a A. SALVADOR. Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **921**(2), 207-215 [cit. 2023-11-14]. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00866-4
- [11] KOCKLER, Jutta, Cherie A. MOTTI, Sherryl ROBERTSON, Michael OELGEMÖLLER a Beverley D. GLASS. HPLC Method for the Simultaneous Determination of the UV-Filters Butyl Methoxy Dibenzoylmethane and Octocrylene in the Presence of Their Photodegradants. *Chromatographia* [online]. 2013, **76**(23-24), 1721-1727 [cit. 2023-11-14]. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-013-2541-4
- [12] PARWAIZ, Shaikh a Mohammad Mansoob KHAN. Recent developments in tuning the efficacy of different types of sunscreens. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 2023, **46**(12), 1711-1727 [cit. 2024-02-21]. ISSN 1615-7591. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-023-02919-9
- [13] COMMISSION REGULATION (EU) 2022/1176 of 7 July 2022 amending Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the use of certain UV filters in cosmetic products. *Official Journal of the European Union* [online]. 2022 [cit. 2024-01-03]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1176>
- [14] COMMISSION REGULATION (EU) 2022/2195 of 10 November 2022 amending Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council as regards

the use of Butylated Hydroxytoluene, Acid Yellow 3, Homosalate and HAA299 in cosmetic products and correcting that Regulation as regards the use of Resorcinol in cosmetic products. *Official Journal of the European Union* [online]. 2022 [cit. 2024-01-03]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R2195&from=EN>

- [15] *REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products* [Official Journal of the European Union]. In: . 2009 [cit. 2024-04-02].
- [16] REPUBLIC OF PALAU. RPPL No. 10-30: The Responsible Tourism Education Act of 2018 – PalauGov.pw. *PalauGov.pw* [online]. 2018 [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: <https://www.palau.gov.pw/wp-content/uploads/2018/10/RPPL-No.-10-30-re.-The-Responsible-Tourism-Education-Act-of-2018.pdf>
- [17] GILABERTE, Y. a J.M. CARRASCOSA. Sun Protection in Children: Realities and Challenges. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* [online]. 2014, **105**(3), 253-262 [cit. 2024-01-02]. ISSN 15782190. Dostupné z: doi:10.1016/j.adengl.2013.05.006
- [18] KLIMOVÁ, Zuzana, Jarmila HOJEROVÁ a Silvia PAŽOUREKOVÁ. Current problems in the use of organic UV filters to protect skin from excessive sun exposure. *Acta Chimica Slovaca* [online]. 2013, 2013-04-1, **6**(1), 82-88 [cit. 2023-11-13]. ISSN 1337-978X. Dostupné z: doi:10.2478/acs-2013-0014
- [19] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [20] *THE SCCS'S NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC SUBSTANCES AND THEIR SAFETY EVALUATION 8 TH REVISION: SCCS/1501/12*. In: . 2012, s. 1-133.
- [21] SCHLUMPF, M, B COTTON, M CONSCIENCE, V HALLER, B STEINMANN a W LICHTENSTEIGER. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2001, **109**(3), 239-244 [cit. 2023-11-13]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.01109239

- [22] ALKILANI, Ahlam, Maelíosa T. MCCRUDDEN a Ryan DONNELLY. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* [online]. 2015, **7**(4), 438-470 [cit. 2024-01-31]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics7040438
- [23] AGHA, Yousef N., M. A. AL-KHAYAT a Samer HAIDAR. Development and validation of RP-HPLC method for analysis of four UV filters in sunscreen products. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2013, **23**(2), 254-258 [cit. 2023-11-15]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/288695027_Development_and_validation_of_RP-HPLC_method_for_analysis_of_four_UV_filters_in_sunscreen_products
- [24] BEANI, Jean-Claude. Phototoxicity, Photoirritation, and Photoallergy Detection and Assessment. *Agache's Measuring the Skin* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 1061-1069 [cit. 2024-01-31]. ISBN 978-3-319-32381-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-32383-1_137
- [25] GONZALEZ, Helena, Nils TARRAS-WAHLBERG, Birgitta STRÖMDAHL, Asta JUZENIENE, Johan MOAN, Olle LARKÖ, Arne ROSÉN a Ann-Marie WENNBERG. Photostability of commercial sunscreens upon sun exposure and irradiation by ultraviolet lamps. *BMC Dermatology* [online]. 2007, **7**(1) [cit. 2023-11-19]. ISSN 1471-5945. Dostupné z: doi:10.1186/1471-5945-7-1
- [26] CHISVERT, Alberto, Isuha TARAZONA a Amparo SALVADOR. A reliable and environmentally-friendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **790**, 61-67 [cit. 2023-11-28]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.06.032
- [27] WONG, Stella W.Y., Guang-Jie ZHOU, Priscilla T.Y. LEUNG, Jeonghoon HAN, Jae-Seong LEE, Kevin W.H. KWOK a Kenneth M.Y. LEUNG. Sunscreens containing zinc oxide nanoparticles can trigger oxidative stress and toxicity to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 2020, **154** [cit. 2023-11-29]. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111078

- [28] STIEN, Didier, Fanny CLERGEAUD, Alice M. S. RODRIGUES, Karine LEBARON, Rémi PILLOT, Pascal ROMANS, Sonja FAGERVOLD a Philippe LEBARON. Metabolomics Reveal That Octocrylene Accumulates in Pocillopora damicornis Tissues as Fatty Acid Conjugates and Triggers Coral Cell Mitochondrial Dysfunction. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, 2019-01-02, **91**(1), 990-995 [cit. 2024-01-06]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b04187
- [29] MEDICI, Antonio, Lorenzo SAVIANO, Antonietta SICILIANO, Giovanni LIBRALATO, Marco GUIDA, Lucio PREVITERA, Giovanni DI FABIO a Armando ZARRELLI. Octocrylene: From Sunscreens to the Degradation Pathway during Chlorination Processes. *Molecules* [online]. 2022, **27**(16) [cit. 2023-12-29]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27165286
- [30] MANASFI, Tarek, Bruno COULOMB, Sylvain RAVIER a Jean-Luc BOUDENNE. Degradation of Organic UV filters in Chlorinated Seawater Swimming Pools: Transformation Pathways and Bromoform Formation. *Environ Sci Technol.* [online]. 2017, 2017-12-05, **51**(23), 13580-13591 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b02624
- [31] DOWNS, C. A., Joseph C. DINARDO, Didier STIEN, Alice M. S. RODRIGUES a Philippe LEBARON. Benzophenone Accumulates over Time from the Degradation of Octocrylene in Commercial Sunscreen Products. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2021, 2021-04-19, **34**(4), 1046-1054 [cit. 2023-11-13]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.0c00461
- [32] Octocrylene. *The Merck Index Online* [online]. 2013 [cit. 2023-12-04]. Dostupné z: <https://merckindex.rsc.org/monographs/m8115>
- [33] ROMITA, Paolo, Caterina FOTI, Katharina HANSEL a Luca STINGENI. Photo-contact allergy to octocrylene: a decreasing trend? *Contact Dermatitis* [online]. 2018, **78**(3), 224-225 [cit. 2024-01-04]. ISSN 0105-1873. Dostupné z: doi:10.1111/cod.12904
- [34] *Preparation method of cyano olefine acid ester* [online]. SHANGHAI LANGYI FUNCTIONAL MAT CO LTD. [cit. 2023-12-06]. Čínská lidová republika. CN115353462A. Přihlášeno 23.8.2022. Uděleno 18.11.2022.

- [35] *A NOVEL PROCESS FOR THE PREPARATION OF 2-CYANO- 3,3-DIARYLACRYLATES*. GALAXY SURFACTANTS LTD [IN]. IN. WO2014178061. Přihlášeno 6.12-2013. Uděleno 6.11.2014.
- [36] *PROCESS FOR THE MANUFACTURE OF SUBSTITUTED 2-CYANO CINNAMIC ESTERS*. DSM IP ASSETS BV [NL]; HUANG JING [CN]; JING SHUPING [CN]; KARGE REINHARD [DE]; PROPLESCH RALF [CH]. CN. WO2008089920. Přihlášeno 18.1.2008. Uděleno 31.7.2008.
- [37] *Preparation method of octocrylene*. DAJIA SPICE TECH TIANJIN CO LTD. CN. CN114957039A. Přihlášeno 27.2.2021. Uděleno 30.8.2022.
- [38] *Preparation method of cyanoacrylate ultraviolet light absorber*. RIANLON KERUN ZHEJIANG NEW MAT CO LTD; RIANLON CORP. CN. CN110981752A. Přihlášeno 18.12.2019. Uděleno 10.4.2020.
- [39] *Process for the preparation of 2-cyano-3,3-diarylacrylates*. BASF AG [DE]. US. US5047571. Přihlášeno 13.4.1990. Uděleno 10.9.1991.
- [40] CHARLIER, M., C. HELENE a W. L. CARRIER. PHOTOCHEMICAL REACTIONS OF AROMATIC KETONES WITH NUCLEIC ACIDS AND THEIR COMPONENTS—III. CHAIN BREAKAGE AND THYMINE DIMERIZATION IN BENZOPHENONE PHOTSENSITIZED DNA*. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 1972, **15**(6), 527-536 [cit. 2023-12-30]. ISSN 0031-8655. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.1972.tb06265.x
- [41] BERARDESCA, E., T. ZUBERBIER, M. SANCHEZ VIERA a M. MARINOVICH. Review of the safety of octocrylene used as an ultraviolet filter in cosmetics. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2019, **33**(S7), 25-33 [cit. 2023-12-12]. ISSN 0926-9959. Dostupné z: doi:10.1111/jdv.15945
- [42] ODIO, M. Evaluation of Subchronic (13 Week), Reproductive, and in Vitro Genetic Toxicity Potential of 2-Ethylhexyl-2-cyano-3,3-diphenyl Acrylate (Octocrylene). *Fundamental and Applied Toxicology* [online]. 1994, **22**(3), 355-368 [cit. 2024-01-05]. ISSN 02720590. Dostupné z: doi:10.1006/faat.1994.1041

- [43] BURY, Daniel, Vladimir N. BELOV, Yulin QI, Heiko HAYEN, Dietrich A. VOLMER, Thomas BRÜNING a Holger M. KOCH. Determination of Urinary Metabolites of the Emerging UV Filter Octocrylene by Online-SPE-LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, 2018-01-02, **90**(1), 944-951 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b03996
- [44] BURY, Daniel, Hendrik MODICK-BIERMANN, Edgar LEIBOLD, Thomas BRÜNING a Holger M. KOCH. Urinary metabolites of the UV filter octocrylene in humans as biomarkers of exposure. *Archives of Toxicology* [online]. 2019, **93**(5), 1227-1238 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-019-02408-7
- [45] CARROTTE-LEFEBVRE, I., A. BONNEVALLE, M. SEGARD, E. DELAPORTE a P. THOMAS. Contact allergy to octocrylene. *Contact Dermatitis* [online]. 2003, **48**(1), 45-55 [cit. 2023-12-06]. ISSN 0105-1873. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0536.2003.480108_2.x
- [46] LOH, TiffanyYvonne a PhilipR COHEN. Ketoprofen-induced photoallergic dermatitis. *Indian Journal of Medical Research* [online]. 2016, **144**(6), 803-806 [cit. 2023-12-12]. ISSN 0971-5916. Dostupné z: doi:10.4103/ijmr.IJMR_626_16
- [47] KARLSSON, Isabella, Katrien VANDEN BROECKE, Jerker MÅRTENSSON, An GOOSSENS a Anna BÖRJE. Clinical and experimental studies of octocrylene's allergenic potency. *Contact Dermatitis* [online]. 2011, **64**(6), 343-352 [cit. 2023-12-12]. ISSN 01051873. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0536.2011.01899.x
- [48] DE GROOT, Anton C. a David W. ROBERTS. Contact and photocontact allergy to octocrylene: a review. *Contact Dermatitis* [online]. 2014, **70**(4), 193-204 [cit. 2023-12-12]. ISSN 0105-1873. Dostupné z: doi:10.1111/cod.12205
- [49] *Synthetic method of homosalate*. NANJING NONGKANG BIOTECHNOLOGY CO LTD. CN. CN105541634A. Přihlášeno 4.11.2014. Uděleno 4.5.2016.
- [50] Homosalate. *The Merck Index Online* [online]. 2013 [cit. 2023-12-04]. Dostupné z: <https://merckindex.rsc.org/monographs/m6047>

- [51] Homosalate DB11064. *DrugBank Online* [online]. 2015, February 21, 2021 [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11064>
- [52] GÖKÇEK, Yaman a Selma YAZAR. Assessment of in Vitro Genotoxicity Effect of Homosalate in Cosmetics. *Journal of Research in Pharmacy* [online]. 2018, 2018-07-02, **22**(1), 109-115 [cit. 2023-12-29]. ISSN 2630-6344. Dostupné z: doi:10.12991/jrp.2018.84
- [53] ALAMER, Maha a Philippa D. DARBRE. Effects of exposure to six chemical ultraviolet filters commonly used in personal care products on motility of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2018, **38**(2), 148-159 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0260-437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.3525
- [54] EROL, Meltem, Ismet ÇOK, Özlem BOSTAN GAYRET, et al. Evaluation of the endocrine-disrupting effects of homosalate (HMS) and 2-ethylhexyl 4-dimethylaminobenzoate (OD-PABA) in rat pups during the prenatal, lactation, and early postnatal periods. *Toxicology and Industrial Health* [online]. 2017, **33**(10), 775-791 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0748-2337. Dostupné z: doi:10.1177/0748233717718974
- [55] IMAMOVIC, Belma, Snezana TRIFUNOVIC, Ervina BECIC, Mirza DEDIC a Miroslav SOBER. Study of Homosalate Stability in Chlorinated Water and Identification Chalogenated By-Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES* [online]. 2015, **6**(1), 990-1000 [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000413254900126>
- [56] IMAMOVIĆ, Belma, Jasmin MUŠANOVIĆ, Ervina BEČIĆ a Miroslav ŠOBER. Investigation of Genotoxicity of Homosalate Byproducts Occured in the Presence of Free Chlorine by Using Allium Test. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health* [online]. 2016, **8**(8), 472-482 [cit. 2024-01-07]. Dostupné z: <https://internalmedicine.imedpub.com/investigation-of-genotoxicity-of-homosalate-byproductsoccured-in-the-presence-of-free-chlorine-byusing-allium-test.php?aid=10496#a1>

- [57] TEO, Ying X., Ian R. WHITE a John P. MCFADDEN. Allergic contact dermatitis to multiple salicylates: A case report. *Contact Dermatitis* [online]. 2023 [cit. 2024-01-06]. ISSN 0105-1873. Dostupné z: doi:10.1111/cod.14464
- [58] JESUS, Ana, Inês AUGUSTO, Joana DUARTE, Emília SOUSA, Honorina CIDADE, Maria T. CRUZ, José M. Sousa LOBO a Isabel F. ALMEIDA. Recent Trends on UV filters. *Applied Sciences* [online]. 2022, **12**(23) [cit. 2024-03-14]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app122312003
- [59] SUNYER, Adrià, Ainoa GONZÁLEZ-NAVARRO, M. Pau SERRA-ROIG, Núria SERRANO, M. Silvia DÍAZ-CRUZ a José Manuel DÍAZ-CRUZ. First application of carbon-based screen-printed electrodes for the voltammetric determination of the organic UV filters oxybenzone and octocrylene. *Talanta* [online]. 2019, **196**, 381-388 [cit. 2024-02-01]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.12.092
- [60] CHISVERT, Alberto, M.-C. PASCUAL-MARTÍ a Amparo SALVADOR. Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2001, 2001-4-24, **369**(7-8), 638-641 [cit. 2023-11-16]. ISSN 0937-0633. Dostupné z: doi:10.1007/s002160100701
- [61] MORETA, Cristina a María Teresa TENA. Determination of UV filters in packaging by focused ultrasonic solid-liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2011, **1218**(21), 3392-3399 [cit. 2024-01-31]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.11.087
- [62] PERUCHI, L. M. a S. RATH. Development and application of a HPLC method for eight sunscreen agents in suncare products. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2012, **34**(3), 226-233 [cit. 2023-11-21]. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-2494.2012.00703.x
- [63] ZAINY, F. M. a N. O. AL-ATTAS. Determination of UV Filters on Some Sunscreen Products using HPLC-DAD. *Journal of King Abdulaziz University Science* [online]. 2020, 2020-1-2, **30**(2), 47-56 [cit. 2023-11-21]. ISSN 1658-4252. Dostupné z: doi:10.4197/Sci.30-2.5

- [64] ORSI, D., G. GIANNINI, L. GAGLIARDI, R. PORRÀ, S. BERRI, A. BOLASCO, I. CARPANI a D. TONELLI. Simple Extraction and HPLC Determination of UV-A and UV-B Filters in Sunscreen Products. *Chromatographia* [online]. 2006, 2006-11-8, **64**(9-10), 509-515 [cit. 2023-11-21]. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-006-0074-9
- [65] SCHNEIDER, P., A. BRINGHEN a H. GONZENBACH. Single step HPLC analysis of sunscreen products containing complex UV filter systems. *Drug & Cosmetic Industry* [online]. 1996, **159**(6), 32-38+ [cit. 2023-11-20]. ISSN 00126527. Dostupné z: <https://www.proquest.com/docview/196439419>
- [66] SCALIA, Santo. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **870**(1-2), 199-205 [cit. 2024-02-19]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)01224-8
- [67] BALMER, Marianne E., Hans-Rudolf BUSER, Markus D. MÜLLER a Thomas POIGER. Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. *Environmental Science and Technology* [online]. 2005, 2005-02-01, **39**(4), 953-962 [cit. 2024-02-19]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es040055r
- [68] NEGREIRA, N., I. RODRÍGUEZ, M. RAMIL, E. RUBÍ a R. CELA. Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **638**(1), 36-44 [cit. 2024-01-04]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.02.015
- [69] NIETO, Antonio, Francesc BORRULL, Rosa Maria MARCÉ a Eva POCURULL. Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(30), 5619-5625 [cit. 2024-01-04]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.05.061
- [70] KAWAMURA, Yoko, Makiko MIURA, Takiko SUGITA a Takashi YAMADA. Residue and Release of Antioxidants and Ultraviolet Stabilizers in Polyethylene

- Products in Contact with Foodstuffs. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* [online]. 1997, **38**(1), 27-33 [cit. 2024-02-19]. ISSN 0015-6426. Dostupné z: doi:10.3358/shokueishi.38.27
- [71] GIOKAS, Dimosthenis L., Vasilios A. SAKKAS, Triantafyllos A. ALBANIS a Dimitra A. LAMPROPOULOU. Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography–mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1077**(1), 19-27 [cit. 2024-01-04]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.04.074
- [72] ZHANG, Yufeng a Hian Kee LEE. Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, **750**(SI), 120-126 [cit. 2024-01-04]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.04.014
- [73] ČSN. *Kosmetika - Stanovení ochranného slunečního faktoru UVA in vitro EN ISO 24443*. Červen 2022.
- [74] ČSN. *Kosmetika - Analýza kosmetických přípravků - Screening UV filtrů v kosmetických přípravcích a kvantitativní stanovení 10 UV filtrů metodou HPLC ČSN EN 16344*. Únor 2014.
- [75] ČSN. *Kosmetika - Analytické metody - Metoda LC/UV pro identifikaci a kvantitativní stanovení 22 organických UV filtrů používaných v EU v kosmetických výrobcích ČSN EN 17156*. Červenec 2019.
- [76] SKLENÁŘOVÁ, Hana, Marek BERAN, Lucie NOVOSVĚTSKÁ, Daniela ŠMEJKALOVÁ a Petr SOLICH. Sequential Injection Analysis for Automation and Evaluation of Drug Liberation Profiles: Clotrimazole Liberation Monitoring. *Molecules* [online]. 2021, **26**(18) [cit. 2024-03-14]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26185538

- [77] MUKAŘOVSKÁ, Sabina. *Automatizace liberačních testů pro uvolnění klotrimazolu z různě sycených polymerních nanovláken*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA.
- [78] MAREL, David. *Automatizované monitorování liberace sulisobenzonu přes modelovou membránu*. Hradec Králové, 2023. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA.
- [79] BERAN, Marek. *Monitorování liberačních testů*. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA.
- [80] *Český lékopis 2017*. In: . Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 859-404-924-045-6.
- [81] TOUŠKOVÁ, Monika. *Studium reaktivity významných amidů (močoviny a ethylkarbamátu) pro jejich následné stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie*. Pardubice, 2023. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [82] BEDÁŇOVÁ, Iveta a Vladimír VEČEREK. *Základy statistiky pro studující veterinární medicíny a farmacie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2007. ISBN 978-80-7305-026-9. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:a3264bd0-0a44-11e8-bdb0-005056827e51>
- [83] KRMÁŠKOVÁ, Iveta. *Stanovení SPF a UVA-PF in vitro*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [84] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *AOAC Official Methods of Analysis* [online]. 2016, 1-18 [cit. 2024-04-11]. Dostupné z: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf

PŘÍLOHA

Tabulka P 1 Návratnost metody

Látka	Plocha píku (průměr) [mV.s]	Skutečná koncentrace [mg/10 ml]	Stanovená koncentrace [mg/10 ml]	Návratnost [%]
Benzofenon	342,7	0,525	0,521	99,2
Oxybenzon	2742,0	1,500	1,480	98,7
Oktokrylen	2278,8	2,450	2,430	99,2
Homosalát	400,2	2,025	2,019	99,7
Ethylhexyl salicylát	247,8	1,231	1,230	99,9

Tabulka P 2 Intradenní a mezidenní opakovatelnost benzofenonu

Počet měření	Intradenní opakovatelnost			Mezidenní opakovatelnost		
	t _R [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]	t _R [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]
1	1,677	209,9	12,8	1,676	211,7	12,9
2	1,679	212,1	12,9	1,679	210,9	12,8
3	1,673	217,7	13,2	1,677	209,9	12,8
4	1,671	208,2	12,7	1,679	211,9	12,9
5	1,680	210,5	12,8	1,676	210,2	12,8
Průměr	1,676	211,7	12,9	1,677	210,9	12,8
SD	0,003	3,2	0,17	0,0014	0,8	0,05
RSD	0,2	1,5	1,3	0,08	0,4	0,4

Tabulka P 3 Intradenní a mezidenní opakovatelnost oxybenzonu

Počet měření	Intradenní opakovatelnost			Mezidenní opakovatelnost		
	tr [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]	tr [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]
1	1,907	431,7	9,2	1,900	430,4	9,1
2	1,892	427,2	9,1	1,905	439,9	9,3
3	1,895	424,3	9,0	1,903	439,1	9,3
4	1,904	437,1	9,3	1,904	442,1	9,4
5	1,903	431,9	9,2	1,903	440,3	9,4
Průměr	1,900	430,4	9,2	1,903	438,4	9,3
SD	0,01	4,379	0,1	0,001	4,1	0,1
RSD	0,3	1,01	1,1	0,09	0,9	1,1

Tabulka P 4 Intradenní a mezidenní opakovatelnost oktokrylenu

Počet měření	Intradenní opakovatelnost			Mezidenní opakovatelnost		
	tr [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]	tr [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]
1	2,947	162,2	6,9	2,935	162,1	6,9
2	2,927	160,1	6,8	2,939	170,3	7,3
3	2,927	161,5	6,9	2,936	172,5	7,4
4	2,936	163,5	7,0	2,934	170,4	7,3
5	2,936	163,3	7,0	2,935	168,1	7,2
Průměr	2,935	162,1	6,9	2,936	168,7	7,2
SD	0,007	1,3	0,08	0,002	3,6	0,2
RSD	0,2	0,8	1,2	0,01	2,1	2,4

Tabulka P 5 Intradenní a mezidenní opakovatelnost ethylhexylsalicylátu

Počet měření	Intradenní opakovatelnost			Mezidenní opakovatelnost		
	tr [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]	tr [min]	Plocha píku [mV.s]	c [%]
1	5,101	24,7	5,1	5,097	23,9	5,0
2	5,108	25,5	5,3	5,067	24,7	5,1
3	5,092	24,4	5,1	5,102	24,9	5,2
4	5,099	26,1	5,4	5,095	23,8	4,9
5	5,093	24,9	5,2	5,101	24,8	5,1
Průměr	5,097	25,1	5,2	5,092	24,4	5,1
SD	0,006	0,6	0,1	0,01	0,5	0,1
RSD	0,1	2,4	1,9	0,2	2,0	2,0

Tabulka P 6 Intradenní opakovatelnost homosalátu

Počet měření vzorku	Intradenní opakovatelnost			
	tr 1 [min]	tr 2 [min]	Plocha píku (suma) [mV.s]	c [%]
1	4,868	5,572	52,8	10,3
2	4,855	5,561	50,0	9,8
3	4,879	5,589	51,7	10,1
4	4,864	5,571	55,2	10,8
5	4,872	5,579	52,7	10,3
Průměr	4,868	5,574	52,5	10,3
SD	0,008	0,009	1,7	0,3
RSD	0,2	0,2	3,2	2,9

Tabulka P 7 Mezipidenní opakovatelnost homosalátu

Den	Mezipidenní opakovatelnost			
	tr 1 [min]	tr 2 [min]	Plocha píku (suma) [mV.s]	c [%]
1	4,868	5,574	53,3	10,4
2	4,857	5,560	51,8	10,1
3	4,857	5,559	52,0	10,2
4	4,854	5,557	52,3	10,2
5	4,862	5,569	52,0	10,2
Průměr	4,859	5,564	52,3	10,2
SD	0,005	0,007	0,6	0,1
RSD	0,1	0,1	1,03	0,9