

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie



EXTRAKCE UV FILTRŮ KOSMETICKÝCH
PŘÍPRAVKŮ Z VOD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Ráciová Táňa
Vedoucí diplomové práce:	RNDr. Baizová Pavlína, Ph.D. doc. RNDr. Barták Petr, Ph.D.
Studijní program:	B1407 – Chemie
Studijní obor:	Chemie životního prostředí
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2017

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Baizové Pavlíny, Ph.D. a doc. RNDr. Bartáka Petra, Ph.D. s použitím literárních zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Ráčzová Táňa

PODĚKOVÁNÍ:

Chtěla bych velmi moc poděkovat paní RNDr. Baizové Pavlíně, Ph.D. za její skvělé odborné vedení, laskavost, ochotu a cenné rady.

Dále bych chtěla poděkovat panu doc. RNDr. Bartákovi Petrovi, Ph.D. za skvělé vysvětlení postupu práce, ochotu, vstřícnost i čas, který mi věnoval při vypracování mé diplomové práce.

Poděkování rovněž patří mým rodičům a mému příteli za jejich obrovskou podporu při mém studiu.

Tato práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2016_016, IGA, PrF_2017_020).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Táňa Ráczová

Název práce: Extrakce UV filtrů kosmetických přípravků z vod

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: RNDr. Baizová Pavlína, Ph.D.
doc. RNDr. Barták Petr, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2017

Abstrakt: Problematika znečištění vod nežádoucími složkami je stále aktuálním celosvětovým problémem. Jsou intenzivně studovány různé metody pro odstraňování těchto látek z vod. Pro účely analýzy se nejčastěji využívají vícenásobné kapalinové extrakce do organického rozpouštědla a následně jsou vzorky analyzovány metodou plynové chromatografie nejčastěji ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Cílem diplomové práce je identifikovat přítomnost některých UV filtrů ve vzorcích vod a krémů a zjistit, zda-li nejsou přítomny i látky, které jsou životu i životnímu prostředí nebezpečné.

Klíčová slova: UV filtr, sluneční záření, ultrafialové záření, pokožka, extrakce, plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Počet stran: 77

Jazyk:

čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Táňa Ráčzová

Title: Extraction of UV filters cosmetic products from water

Department: Department of Analytical Chemistry

Type of thesis: Diploma

Supervisor: RNDr. Baizová Pavlína, Ph.D.
doc. RNDr. Barták Petr, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: The problematics of water pollution with undesirable component is still the current global problem. Various methods are studied intensively for the removal of these substances from the water. For the analytical purposes, multiple liquid extraction with suitable organic solvent and subsequent gas chromatographic determination, often with mass spectrometric detection, is commonly used. The purpose of the diploma thesis is to identify the presence of some UV filters in the samples of water and creams and to determine whether there are the substances, that are dangerous to the human life and the environment.

Keywords: UV filter, sun solar radiation, UV radiation, skin, extraction, gas chromatography coupled with mass spectrometer

Number of pages: 77

Language: czech

OBSAH

ÚVOD	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 ELEKTROMAGNETICKÉ ZÁŘENÍ.....	12
1.2 ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ.....	13
1.2.1 UVC pásmo (100-290 nm)	14
1.2.2 UVB pásmo (280-320 nm)	14
1.2.3 UVA pásmo (320-400 nm).....	14
1.3 Efekty UV záření.....	15
1.3.1 Vliv UV záření na pokožku	16
1.4 SPF (Sun protecting factor, solární protektivní faktor).....	18
1.5 UV FILTRY.....	19
1.5.1 Vlastnosti UV filtrů	22
1.5.2 Fyzikální (anorganické) UV filtry	22
1.5.3 Chemické UV filtry	23
1.6 UV filtry v UVB oblasti	25
1.6.1 Salicyláty	25
1.6.2 Ensulizol.....	25
1.6.3 PABA	26
1.6.4 Cinnamáty (deriváty skořicové kyseliny).....	26
1.7 UV-filtry v UVA oblasti.....	27
1.7.1 Benzophenony	27
1.7.2 Avobenzon.....	28
1.7.3 Fyzikální blokátory.....	29
2 Separační metody	30
2.1 Extrakce	30
2.1.1 L-L extrakce	30
2.1.2 L-S extrakce (SPE – Solid Phase Extraction).....	31
2.1.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid Phase MicroExtraction)	31
2.2 Derivatizace	32
2.3 Plynová chromatografie	33
2.3.1 Instrumentace.....	33

2.3.2	Nástřik	34
2.3.3	Iontové zdroje	35
2.4	Hmotnostní analyzátory	37
2.5	Analýza MS	38
2.5.1	SIM („Selective Ion Monitoring“).....	38
2.5.2	TIC („Total Ion Current“).....	38
2.5.3	Analýza GC-MS	39
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1	Chemikálie	40
3.2	Přístroje a pomůcky	41
3.3	Odběr vzorku	42
3.3.1	Voda	42
3.3.2	Vzorky krémů	45
4	PRACOVNÍ POSTUP.....	47
4.1	Příprava standardů UV filtrů.....	47
4.2	Příprava reálných vzorků vody	47
4.3	Příprava reálných vzorků ochranných krémů	47
4.4	Extrakce vzorků vod a krémů	47
4.5	Derivatizace	48
4.6	Analýza GC-MS	48
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
5.1	Analýza standardů UV filtrů.....	49
5.2	Analýza vzorků vod	54
5.3	Analýza vzorků krémů.....	59
ZÁVĚR	64	
SUMMARY	65	
LITERATURA	66	
SEZNAM ZKRATEK	73	
PŘÍLOHY	75	

ÚVOD

Ochrana lidského zdraví je prioritou na celém světě. Znečištění vod je stále aktuálním problémem. Speciální přípravky používané člověkem představují efektivní nástroj v ochranně před nežádoucími vlivy životního prostředí, avšak mohou mít i negativní účinek. Důležitou roli hrají i vlivy pracovního prostředí, které mohou mít také negativní důsledky na lidský organismus a hlavně pro životní prostředí. Klimatické změny, sluneční záření, chemické, přírodní i biologické látky mohou způsobit poškození epidermis, alergické reakce na pokožce, vstup mikrobů do vnější vrstvy kůže a v neposlední řadě mohou vyvolat nádorová onemocnění, která jsou velmi nebezpečná. Jedním z hlavních úkolů lidské pokožky je zabránit vstupu okolních látek do těla a tvořit ochrannou bariéru vůči vnějšímu okolí. Nežádoucí látky ve vyšším množství mohou poškodit tuto ochrannou bariéru a způsobit nevratné zdravotní problémy nejen u člověka, ale i u zvířat.

Na ochranu před slunečním zářením se používají kosmetické přípravky obsahující takové ingredience, které jsou schopné vytvářet další bezpečnou ochrannou vrstvu a nazývají se UV filtry. Současným trendem je velký výběr kosmetických krémů, které používají UV látky filtrující UVA nebo UVB oblast ultrafialového záření. Tyto látky se vybírají na základě jejich vlastností a finálních efektů výrobku, ale mohou se používat jen některé druhy UV látek, z důvodu negativního dopadu na lidské zdraví, či životní prostředí, především na vodní organismy. Povolené UV látky jsou uvedeny na seznamu, který je schválený Evropskou unií. V současné době jich je 27 povolených. Do vody se tyto látky dostávají hlavně lidskou činností, buď už chtěnou nebo nechtěnou. Vysoké riziko nesou takové látky, které jsou schopné akumulace v organismech nebo ve vodě a následně mohou vyvolat nežádoucí pozdní účinky.

Velkým problémem může být přidávání UV filtrů do kosmetických přípravků, které se používají běžně každý den v domácnostech např. pleťové krémy, laky na vlasy, šampony, parfémy, rtěnky, pudry na tvář, aj. Jejich běžným používáním může docházet ke kontaminaci vody, která se může projevit v životním prostředí a může nastat velký problém s jejich odstraňováním při čištění odpadních vod.

V současné době je jedním z nejdůležitějších témat analytické chemie v oblasti životního prostředí kvalita vody. Cílem práce je prozkoumat přítomnost UV filtrů v reálných

vzorcích vod i kosmetických přípravků a zjistit, které konkrétní látky obsahují. Byla vyvinuta celá řada metod pro analýzu UV filtrů, ale nejvhodnější účinnou metodou je plynová chromatografie, nejlépe ve spojení s hmotnostní detekcí.

1 TEORETICKÁ ČÁST

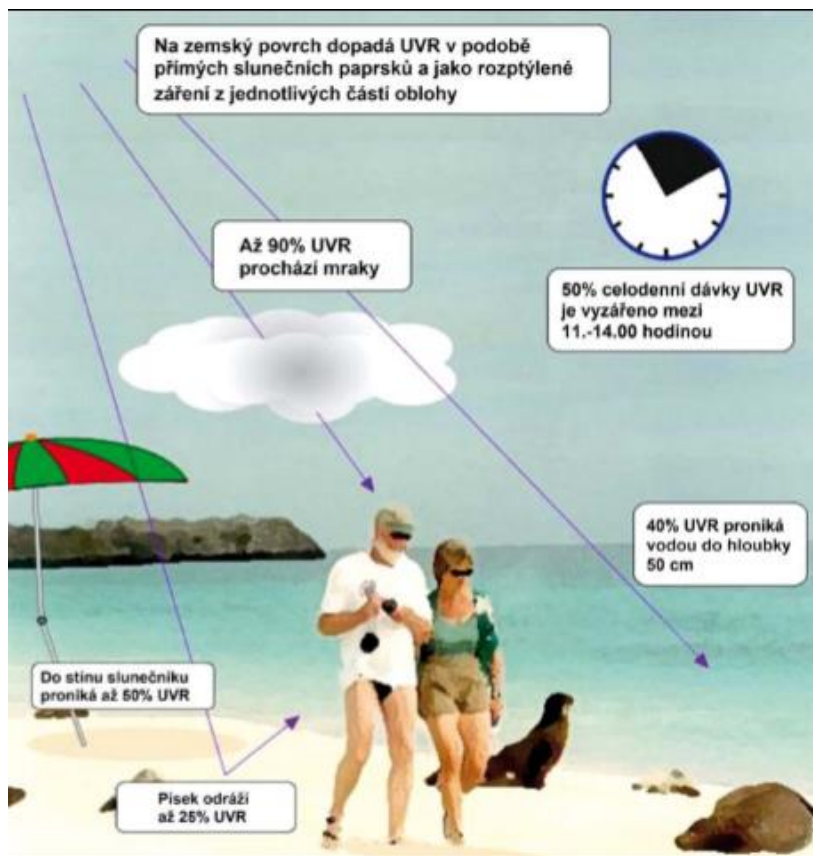
1.1 ELEKTROMAGNETICKÉ ZÁŘENÍ

Nejběžnějším přirozeným zdrojem elektromagnetického záření je Slunce. Slunce produkuje paprsky v širokém pásmu vlnových délek elektromagnetického záření – gama, RTG, UV, viditelné a infračervené. Záření dopadající na zemský povrch je tzv. terestriální záření, které je rozděleno na 3 základní typy: viditelné záření (VIS, 400 – 760 nm), UV záření (UV, 100 – 400 nm) a infračervené záření (IR, 760 – 3000 nm). [1] Ve stratosféře zhruba 30 km nad zemským povrchem se nachází ozónová vrstva, která absorbuje ultrafialového záření C (UVC, vlnová délka 100–290 nm). Na zemský povrch (resp. lidskou kůži) naopak dopadá ultrafialové záření A a B (UVA, vlnová délka 320–400 nm; UVB, vlnová délka 290–320 nm), infračervené (IR, vlnová délka 760 – 3000 nm) a viditelné záření (vlnová délka 400–760 nm). [2,3]

Intenzita UV paprsků vzrůstá odrazem z různých povrchů jako je např. voda, písek nebo sníh. Příkladem může být suchý plážový písek, který je schopný odrazit UV záření v rozmezí 15 – 20% záření nebo mořská voda, která je schopna odrazit 10 – 20 % záření a do půl metrové hloubky dopadá až 40 % UV paprsků. [1]

Viditelné záření (400-760 nm) představuje zhruba 50% energie slunečního záření, které dopadá na zemský povrch. Bylo prokázáno, že ozáření pokožky těmito paprsky vede ke zvýšení produkce radikálů, které mohou vést k oxidačnímu poškození biomolekul jako např. nukleových kyselin nebo nenasycených mastných kyselin. Viditelné záření se může použít k léčbě žloutenky u novorozenců, afektivních poruch v psychiatrii (k léčbě depresí) nebo ve fotodynamické terapii. [2], [4]

Záření v infračervené oblasti (760-3000 nm) tvoří 45% energie terestriálního záření. Tyto paprsky dopadající na pokožku pronikají velmi hluboko do kůže i tkání a dochází k jejich ohřívání. [2]



Obr. 1: Schéma základních fotoklimatologických vlastností UV záření. [3]

1.2 ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ

UV záření je elektromagnetické vlnění se stejnou povahou jakou má světlo, ale liší se velikostí vlnových délek, které jsou mnohem menší než je rozsah vlnové délky světla.

Zdrojem nebezpečného UV záření může být nejen Slunce, ale i např. elektrické oblouky používané pro svářečské účely nebo rtuťové/xenonové výbojky používané pro dezinfekci laboratoří, v lékařství a kosmetice. Ultrafialové záření slunečního spektra lze rozdělit do 3 základních pásem – UVC, UVB, UVA oblast. [2], [5]

Pro člověka je neviditelné, existují však živočichové, kteří toto záření mohou vnímat (ptáci, plazi, hmyz).

1.2.1 UVC pásmo (100-290 nm)

Krátkovlnné záření v pásmu UVC má nejvyšší energii. Je rozptylováno v ionosféře a pohlcováno ozónovou vrstvou Země. Na zemský povrch neproniká. Pokud by tomu tak nebylo, život na Zemi v podobě, jaký ho známe dnes, by pravděpodobně nebyl možný.

Narušení ozónové vrstvy, která je zemským ochranným obalem, představuje vážné nebezpečí pro život na Zemi. Nejvíce ozónu vzniká působením UVC záření o vlnové délce 200 nm. [6] I přes jeho nebezpečnost jej lze využít v germicidních zářičích.

Existuje i vakuová (vzdálená) oblast UV, která zahrnuje škálu vlnových délek 100 – 200 nm. V této oblasti absorbují nasycené sloučeniny. Prakticky tato část spektra nemá velký význam z hlediska dermatologie. [2], [7]

1.2.2 UVB pásmo (280-320 nm)

Středněvlnné UVB záření je považováno za biologicky nejvýznamnější. Představuje asi 1% celého energetického objemu slunečního záření dopadajícího na Zemi. Toto záření má stále dostatečnou energii a dokáže velmi účinně způsobit spálení od slunce, projevující se zarudnutím pokožky a s odstupem času i tvorbou puchýřků. Může dojít i k vyvolání pigmentace pokožky. [2]

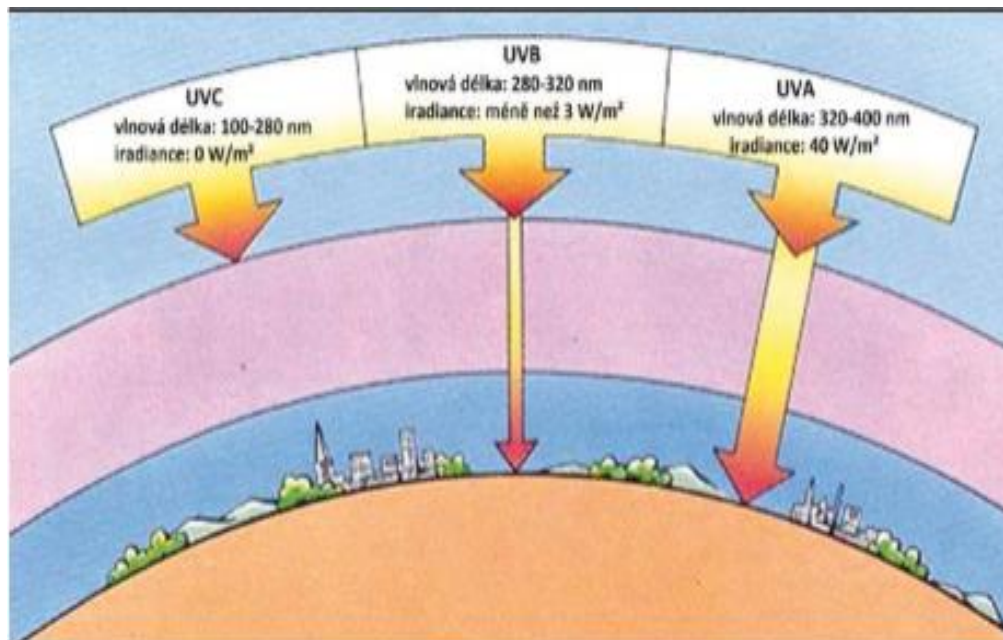
UVB paprsky dokáží proniknout kůží jen do epidermis a mohou být filtrované i okenním sklem. UVB záření se dá považovat za přímý karcinogen, který je pohlcován DNA a může způsobit její poškození. Tyto paprsky také podporují vznik volných kyslíkových radikálů, které jsou vysoce reaktivní a mohou také nepřímo poškozovat DNA. [7], [8]

1.2.3 UVA pásmo (320-400 nm)

Jedná se o měkké nepřímé záření a někdy bývá označováno jako „černé světlo“. Mezi základní nežádoucí účinky patří rychlé stárnutí pokožky a tvorba škodlivých volných radikálů v kůži. [9]

Dlouhovlnné UVA záření je tvořeno 4%, které dopadají na zemský povrch a mohou způsobit vznik erytému i pigmentaci kůže. Narozdíl od UVB záření je schopné proniknout do hlubších vrstev pokožky (škáry). UVA paprsky bývají nejčastěji využívány při léčbě lupénky nebo v soláriích pro rychlé zhnědnutí kůže.

Může se dále dělit na UVA – I v rozsahu vlnových délek 340-400 nm a na UVA-II v rozsahu vlnových délek 320-340 nm. [3]



Obr. 2: Hodnota irradiance (síla elektromagnetického záření na jednotku plochy) poledního slunečního záření při 90° mimo stín ve střední Evropě. [3]

1.3 Efekty UV záření

Každá složka UV záření může uplatnit své různé účinky na buňky, tkáně i molekuly. Okolní UV záření se liší geograficky v závislosti na intenzitě slunečního záření v jednotlivých oblastech na Zemi. Paprsky dopadající na zemský povrch mohou být odraženy, rozptýleny nebo tlumeny atmosférickými částicemi a okolní dávka je charakterizována vrstvou atmosféry. Dávka je nejvyšší v blízkosti rovníku, ve vyšších nadmořských výškách a při co nejmenší oblačnosti na obloze. [7]

1.3.1 Vliv UV záření na pokožku

Během 20. let minulého století se stala velkým módním hitem opálená pokožka, která se může po dlouhodobé i nadměrné expozici slunečním zářením proměnit v nekontrolovatelný nebezpečný problém. Dochází ke zvýšení pravděpodobnosti nežádoucích (časných i pozdních) účinků na lidské pokožce i jiných částech těla.

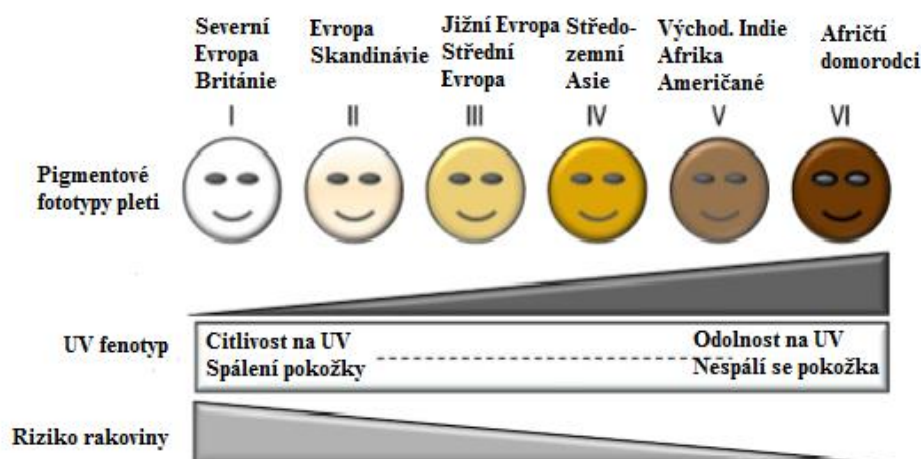
UV záření je po dopadu na kůži zcela absorbováno aminokyselinami, kyselinou urokanovou (chemickým názvem kyselina 3-(4-imidazolyl)akrylová) hromadící se v kůži po vystavení záření; melaninem, který pohlcuje vzniklé volné radikály a v neposlední řadě beta-karotenem, který je prekurzorem vitamínu A. Sluneční záření může vyvolat na lidské kůži celou řadu účinků, které mohou být jak pozitivní, tak i negativní.

Hlavní projevy onemocnění kůže mohou být způsobeny tzv. fotodermatózou, což je onemocnění vyskytující se u člověka precitlivělého na UV záření. Příznaky se mohou projevit buď působením vnějších faktorů (fototoxické a fotoalergické reakce) nebo projevy symptomů spojených s nestabilitou DNA. Při fototoxických reakcích dochází k poškození buněk vlivem chromoforu, který je zaktivován vlivem působení UV záření (největší projevy při UVA). [1]

Podle druhu a délky ozáření můžeme pozorovat nežádoucí efekty časná a pozdní. [7] Mezi časná projevy změny kůže zahrnujeme primární erytém (červené zarudnutí kůže), změny imunologické, hyperplazii kůže (zmnožení buněk a tkání), časnou pigmentaci pokožky nebo může docházet k syntéze vitamínu D.

Pozdní účinky mohou být projeveny pigmentací kůže a při nadměrné i opakované expozici sluncem mohou způsobit postupné stárnutí kůže až fotokarcinogenezi, při které dochází ke vzniku kožních nádorů. Vysokým rizikovým faktorem může být i výskyt melanomu v rodinné anamnéze. [10], [11] Rakovina kůže bývá diagnostikována u více než milionu pacientů ročně a riziko vzniku se může zvyšovat s rostoucí věkem. Karcinom může být rozdělen na dvě základní kategorie – melanom a kožní nádor nemelanomového typu (NMSC), závislý na typu původu buňky a na jejím klinickém chování. Vznik tohoto onemocnění ovlivňuje i pigmentace kůže. (Obr. 3) [7]

V neposlední řadě může na kůži docházet i ke změnám ve struktuře kolagenu. [12], [13]



Obr. 3: Vliv pigmentace na riziko rakoviny kůže. [7]

Podle různých účinků UV záření působícího na lidskou pokožku můžeme typy pleti rozlišit do 4 skupin. (Tab. 1).

Nejvyšší riziko onemocnění hrozí lidem s velmi světlou pokožkou, s blond nebo ryšavými vlasy, jejichž pokožka neobsahuje ochrannou složku tzv. melanin. [2] Dalšími rizikovými faktory jsou lidé s atypickým tvarem a vyšším množstvím znamének na těle. [7]

Tab. 1: Stručný přehled možností fototypů lidské pokožky. [8]

Typ pleti	Charakteristika pleti	Spálení pokožky	Opálení pokožky	Zarudnutí kůže bez ochranné složky
I	světlá kůže, silné pihy, ryšavé vlasy, modré oči	těžké bolestivé zarudnutí pokožky	po 1-2 dnech oloupání	5 - 10 min
II	lehce tmavší kůže, pihy velmi řídké, blond vlasy, modré oči, zelené i šedé oči	těžké bolestivé zarudnutí pokožky	malé loupání kůže	10 - 20 min
III	světlé hnědá kůže, nepřítomnost pih, tmavě hnědé vlasy, hnědé a šedé oči	zřídka	mírné	20 min
IV	hnědá pleť	velmi zřídka	rychlé a silné	až 45 min

Dlouhodobé vystavování člověka na otevřeném slunci může velmi negativně ovlivnit i lidské oko. Paprsky mohou přispívat k rozvoji katarakty (šedý zákal), makulární degeneraci (ztráta zraku), až melanomu uvei (rakovina střední vrstvy oční koule). [10], [11]

UV záření může mít na lidskou kůži i blahodárny účinek. Menší dávka slunečního záření s maximem vlnové délky 320 nm je nezbytná pro syntézu vitamínu D₃ z 7-dehydrocholesterolu. Samotný vitamín D lze považovat za jednu z ochranných látek proti rakovině kůže. [2] Význam vitamínu D je důležitý při resorpci vápníku a fosfátu ze střev, čímž reguluje a optimalizuje množství látek v krvi, které jsou velmi důležité pro stavbu kostí. U dospělých jedinců se nedostatek vitamínu D může projevit řídnutím kostí a u dětí v podobě křivice. Může docházet i ke zvýšení kazivosti zubů. [2], [11]

Mezi pozitivní účinky slunečního záření ovlivňující životní prostředí patří světlo, teplo nebo fotosyntéza rostlin. [11] Bez slunečních paprsků by nebyl možný život na Zemi.

1.4 SPF (Sun protecting factor, solární protektivní faktor)

Celkovou míru ochrany proti slunečním paprskům vyjadřuje číslo SPF. Tento faktor je vyjadřován jako násobek MED (Minimal Erythema Dose – minimální erytémové dávky), tedy jako dávky slunečního záření, při které dochází k začervenání pokožky. Vyjadřuje poměr energií UV záření potřebné pro vznik erytému na pokožce s ochrannou složkou a vznik téhož erytému bez použití ochranné složky u stejného jedince. [11] Výsledné efekty této ochrany nesouvisí pouze s SPF faktorem, ale i s UV indexem (v poledních hodinách nejvyšší). Je to jednotka užívaná při měření intenzity ultrafialového slunečního záření a dle jeho velikosti se volí vhodná ochrana pokožky k zabránění riziku jejího spálení při vystavení na přímém slunci. Míra absorpce slunečních paprsků není lineární. Přípravky s ochranným faktorem SPF 15 mohou absorbovat 93 % UV záření a přípravky s SPF 30 mohou absorbovat až 97% UV záření. [2]

SPF umožňuje lidským jedincům nejen prodloužit pobyt na otevřeném slunci bez spálení, ale působí jako ochranný faktor před onemocněním kůže a dalších částí těla (př. bez SPF 10 člověk vydrží na slunci 10 min, s SPF 10 vydrží až 100 min bez zarudnutí kůže). [2]

Tab. 2: Přehled označení stupňů UV ochrany dle doporučení EU (2006/647/ES). [8]

Stupeň ochrany	Hodnota SPF	Doporučený podíl UVA faktoru
Nízká ochrana	6	min. 1/3
	10	
Střední ochrana	15	
	20	
	25	
	30	
Vysoká ochrana	50	
	50+	

1.5 UV FILTRY

Interakce UV záření s kůží je předmětem značného výzkumu. K ochraně pokožky byly vyvinuty tzv. sunscreensy, které obsahují jako hlavní ochranné složky UV filtry, které UV záření absorbují. Jejich zvýšené používání může vést ke kontaminaci životního prostředí a k nadměrné expozici prostřednictvím potravního řetězce.

Stále se zvyšují obavy ohledně osudu životního prostředí z potenciálního vlivu těchto filtrů používaných v kosmetických přípravcích jako jsou např. kosmetické krémy, laky na vlasy, šampony, balzámy na rty či jiné přípravky pro osobní péči nebo dokonce i používáním přídavných látek do plastů a jiných materiálů pro zabránění degradace polymerů a pigmentů. [11], [14] Některé druhy živočichů mají silnou tendenci k biologickému hromadění těchto filtrů v tukových tkáních např. některé druhy ryb. [9], [15]

Účinnost sunscreenů proti slunečnímu záření udává SPF faktor v souladu s Evropským sdružením kosmetiky a parfumerie (COLIPA). [10] V ochranných přípravcích se běžně používá koncentrace UV filtrů v rozmezí 0,1 - 10 %. [16], [17]

Řada marketingových strategií vede spotřebitele k domněnku, že opalovací krémy jsou určeny k ochraně proti poškození kůže a zároveň umožní postupné opalování. Obě funkce plní kosmetický přípravek, když dokáže absorbovat UVA i UVB záření. Aby se zabránilo vážnému poškození kůže a vzniku spálenin, je nutné splnění specifických atributů opalovacích krémů. UV filtry musí být především fotostabilní a musí efektivně rozptýlit absorbovanou energii přes fotofyzikální a fotochemické cesty, které vylučují vznik

singletového kyslíku, dalších reaktivních kyslíkových radikálů a jiných škodlivých reaktivních meziproductů. [18]

UV filtry jsou rozděleny do dvou základních skupin – anorganické (fyzikální) a organické (chemické). [19] V současné době existuje několik desítek filtrů povolených směrnici Evropské Unie o kosmetice pro komerční využití, z nichž většina je organického typu a pouze 2 anorganického typu – oxid titaničitý a oxid zinečnatý.

Tab. č. 3: Seznam většiny UV filtrů aktuálně povolených v EU. [2], [20]

Název INCI	Název IUPAC	Max. povolená konc. [%]	Ochrana
PABA	4-aminobenzoová kyselina	8	UVB
Benzophenone-3	2-hydroxy-4-methoxybenzophenon (OXYBENZON)	10	UVA/UVB
Benzophenone-4	2-hydroxy-4-methoxy benzophenon-5-sulfonová kyselina	5	UVB
Benzophenone-8	dioxybenzon	3	UVA
Benzophenone-10	2-hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenon	4	UVB
Benzyl salicylate	benzylsalicylát	7	UVB
Ethylhexyl dimethyl PABA	2-ethylhexyl 5-dimethylaminobenzoát	10	UVB
Octocrylene	octyl cyanofenylcinnamát	10	UVB/UVA
Methyl anthranilate	methyl o-aminobenzoát	5	UVB
Ethylhexyl methoxycinnamate	2-ethylhexyl ester kyseliny 4-methoxyskořicové	20	UVB
Butylmethoxydibenzoyl methane	butyl 4-methoxy-dibenzoylmethan	10	UVA

Dométrizole trisiloxane	2(2'-hydroxy-5-methylfenyl-2-yl)-6[3(1,1,1,3,5,5,5-heptamethyltrisiloxan)-3-yl]2-methylpropyl-4-methylfenol	15	UVA/UVB
Homosalate	3,3,5-trimethylcyklohexyl 2-hydroxybenzoát	15	UVB
Phenylbenzimidazole sulfonic acid	2-fenylbenzimidazole-5-sulfonová kyselina	4	UVB
Ethylhexyl salicylate	2-ethylhexyl 2-hydroxybenzoát	5	UVB
Phenylsalicylate	fenyl 2-hydroxybenzoát	5 – 10	UVB
Ethylhexyl triazone	octyl triazon	–	UVA/UVB
Terephthalylidene dicamphor sulfonic acid	3,3'-(1,4-fenylenedimethylen)bis[7,7'-dimethyl-2-oxobicyklo[2,2,1]heptan-1-methansulfonová kyselina]	10	UVA/UVB
3-Benzylidene camphor	1,7,7-trimethyl-3-(fenylmethylen)bicyklo[2,2,1]heptan-2-on	2	UVB
3-(4-Methylbenzylidene) camphor	1,7,7-trimethyl-3-[(4-methylfenyl)methylen]bicyklo[2,2,1]heptan-2-on	4	UVB
Ethyl-2-cyano-3,3'-difenyl akrylová kyselina	etocrylen	10	UVB
Titanium dioxide	oxid titaničitý	25	UVA/UVB IR
Zinc oxide	oxid zinečnatý	20	UVA/IR

1.5.1 Vlastnosti UV filtrů

UV filtry chrání lidské tělo před škodlivými účinky UV záření různými mechanismy (Obr. 5). Dopadem záření na povrch kůže může docházet jak k odrazu, tak i k absorpci záření. K odrazu i rozptylu záření dochází vlivem anorganických UV filtrů a naopak k absorpci slunečního záření dochází vlivem UV organických sloučenin. [12] [21]

Přehled fyzikálních a chemických UV filtrů odrážejících nebo absorbujících sluneční záření je uveden v následující tabulce č. 4.

Tab. č. 4: Příklady UV ochranných látek dle jejich mechanismu působení. [7]

UV absorbující látky	UV odrážející látky	UV záření
deriváty kyseliny skořicové deriváty PABA deriváty kyseliny salicylové	oxid titaničitý oxid zirkoničitý oxid zinečnatý	UVB
deriváty benzofenonu deriváty dibenzoylmethanu deriváty kafru deriváty hydantoinu	oxidy železa	UVA

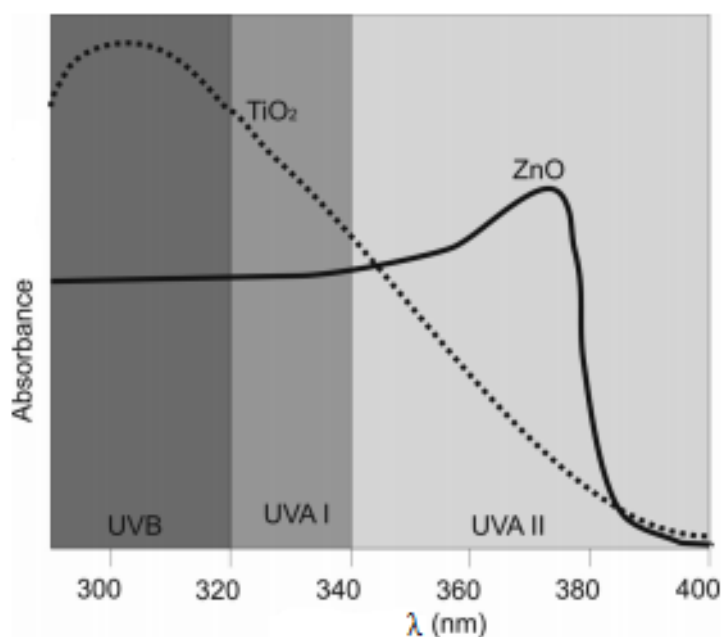
1.5.2 Fyzikální (anorganické) UV filtry

Anorganické UV filtry, jako jsou např. kaolin, mastek, kalamín, fosfáty nebo uhličitany ve formě nanomateriálů a čistý hydroxyapatit, jsou schopné záření dopadající na kůži rozptýlit, odrazit nebo absorbovat.

Anorganické UV filtry nabízejí některé velmi důležité výhody oproti filtrům organickým: dávají širší spektrum ochrany (krytí UVA i UVB), jsou fotostabilní, zatímco některé organické UV filtry (př. avobenzon) nejsou fotostabilní a mohou vyvolat různé alergie. Vzhledem k uvedenému poslednímu faktoru je umožněno široké využití těchto filtrů v dětských opalovacích krémech, které se snaží o co nejmenší podráždění kůže.

V současné době ve Spojených státech amerických a v Brazílii existují pouze dva anorganické filtry, oxid titaničitý a oxid zinečnatý, schválené FDA a podle agentury ANVISA

(Brasil, 2006) mají komerční využití. Tyto oxidy jsou připraveny jako nanomateriálové částice, které vykazují nejmenší odraz viditelného záření, a tím jsou schopny produkovat menší účinek bílého zbarvení při aplikaci na kůži a také mají zvláštní schopnosti z hlediska fotoprotektivní účinnosti. [22]

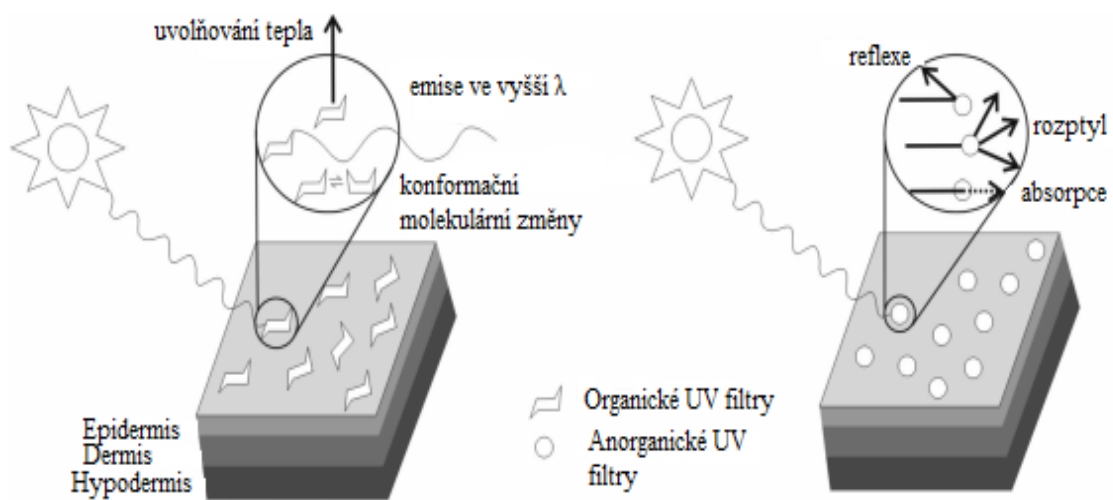


Obr. 4: Schématické znázornění působení UVA a UVB absorpce záření u TiO₂ a ZnO filtrů. [22]

1.5.3 Chemické UV filtry

Organické UV filtry jsou obvykle aromatické sloučeniny s karbonylovou skupinou, a s postranním řetězcem, s různým stupněm nenasycenosti. [23] Po předání energie z UV fotonů mohou tyto filtry působit třemi způsoby: (a) podrobí se konformační molekulární změně, (b) emitují záření na vyšší vlnové délce, nebo (c) dopadající uvolněná energie působí ve formě tepla.

Při pohlcování fotonů může docházet k uvolňování volných radikálů, které následně mohou způsobit poškození kolagenu, elastinu nebo DNA. [22]

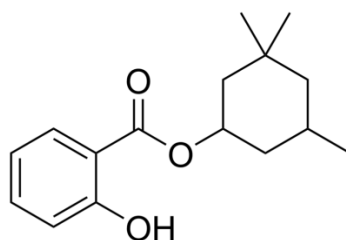


Obr. 5: Mechanismus působení organických (vlevo) a anorganických (vpravo) UV filtrů. [22]

1.6 UV filtry v UVB oblasti

1.6.1 Salicyláty

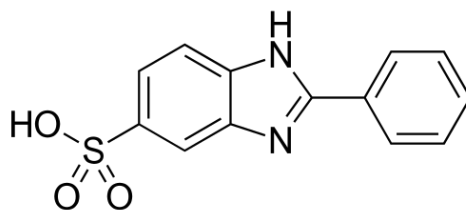
Do této skupiny se zařazují dvě hlavní nejpoužívanější komponenty – homosalat a ethylhexyl salicylát, které chrání především v oblasti UVB. [24] Jejich výhodou je nerozpustnost ve vodě, která vede k vysoké fotostabilitě, účinnosti i po působení vody a potu. Sami o sobě jsou slabými UVB absorbéry, ale obvykle se používají v kombinaci s dalšími UV filtry pro zlepšení jejich vlastností. [25]



Obr. 6: Homosalat [26]

1.6.2 Ensulizol

Chemickým názvem 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina se používá v nemastných hydratačních výrobcích, což je výhodou oproti většině ochranných krémů, které jsou většinou olejové povahy. [27], [28]



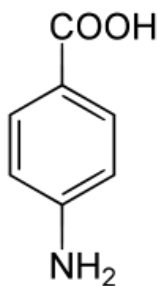
Obr. 7: Ensulizol [28]

1.6.3 PABA

p-aminobenzoová kyselina, která patřila mezi první účinné chemické filtry na ochranu proti slunečnímu záření v UVB oblasti. Jejich výhodou byla široká dostupnost, avšak jejich nevýhodou je alkoholový základ a řada nežádoucích účinků.

Mnohem více užívané jsou její deriváty - 2-ethylhexyl dimethyl PABA (padimát O) disponoval nižšími nežádoucími účinky, a proto se postupně stal nejvíce využívanou složkou s výbornou ochranou proti UVB záření. [29]

Dříve byly používány v kosmetickém průmyslu pro jejich dobré ochranné účinky, ale dnes studie prokazují, že PABA může mít karcinogenní účinky a může vyvolat různé alergické reakce. Kvůli nežádoucím účinkům původní formulace PABA se tyto deriváty využívají méně, dokonce někteří výrobci na svých výrobcích uvádějí "PABA – free" (bez použití PABA). [25]



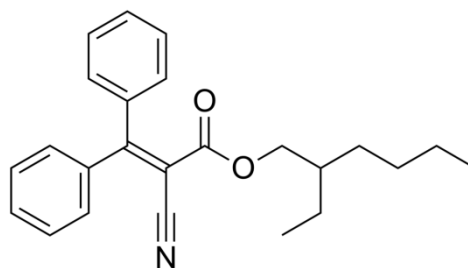
Obr. 8: p – aminobenzoová kyselina (PABA) [30]

1.6.4 Cinnamáty (deriváty skořicové kyseliny)

Tyto látky jsou velmi hojně používány v kosmetickém průmyslu. Nejčastějšími používanými látkami jsou 2-ethylhexyl 4- methoxycinnamát a octocrylen.

Octocrylen je velmi fotostabilní a přidává se do kosmetických opalovacích krémů nejen pro ochranu před slunečními paprsky, ale i pro zlepšení odolnosti proti vodě. Velmi hojně se používá v kombinaci s jinými UV filtry pro zlepšení jejich vlastností. [24]

Cinnamáty z velké části nahradili PABA deriváty, ale jsou řádově méně účinné oproti padimátu O. [25]



Obr. 9: Octocrylen [31]

1.7 UV-filtry v UVA oblasti

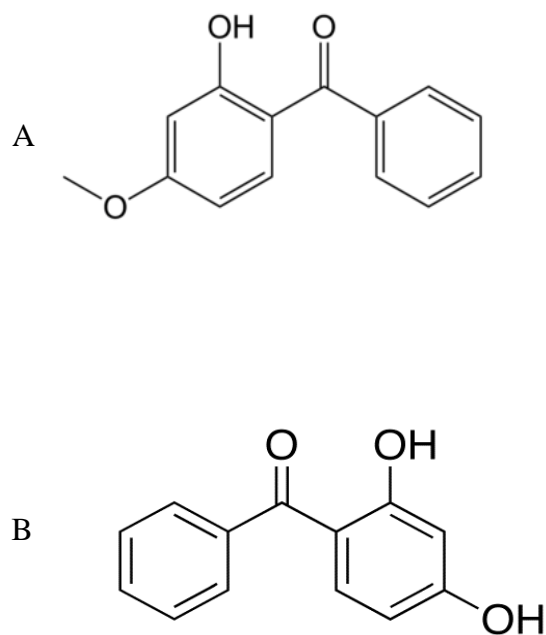
1.7.1 Benzophenony

Benzophenony jako UV filtry jsou široce používány v kosmetických výrobcích, aby se zabránilo škodlivým účinkům UV záření. Jsou schopné ochrany v UVA i UVB oblasti.

Mohou být používány jako fotoiniciátory v aplikaci UV-vytvrzování [3], jako jsou inkousty, nebo průhledné nátěry v polygrafickém průmyslu. Benzophenon brání ultrafialovému (UV) světlu v poškození vůně a barvy v produktech, jako jsou parfémy a mýdla. Mohou být přidávány do plastového obalu k zabránění fotodegradace v balení polymerů. Jeho použití umožňuje výrobcům balit výrobek do obalu z čirého skla nebo plastu, jinak by bez něj bylo zapotřebí použít neprůhledný nebo tmavý obal.

V biologických aplikacích, byly benzophenony široce používány jako fotofyzikální sondy k identifikaci a mapování interakcí peptidů a proteinů. Používá se také ve stomatologii jako součást zubních náhrad. [32]

Častou negativní vlastností této skupiny lipofilních organických UV filtrů je, že se vstřebávají nejen do pokožky, ale i přes kůži do krevního oběhu, kde mohou dále působit a projevit své nežádoucí účinky, např. dochází k měřitelným změnám hladin pohlavních hormonů. Z hlediska této systémové absorpce jsou nejrizikovější právě benzophenony, konkrétně oxybenzon, který při vystavení extrémnímu teplu a slunci může vyvolat dermatitidu a pro svou nedostatečnou fotostabilitu může být i zdrojem tvorby kyslíkových radikálů. [2], [25] Používají se různé formulace benzophenonů s různými polohami substituentů na benzenovém jádře. (Obr.10)



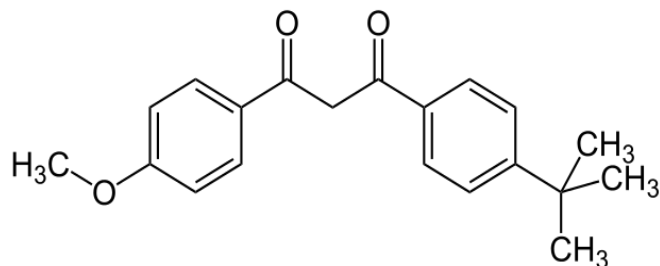
Obr. 10: A) Benzophenon-3 [33], [34], B) Benzophenon-1 [35]

1.7.2 Avobenzon

Avobenzon, neboli butylmethoxydibenzoylmethan poskytuje vynikající širokospektrální ochranu s důrazem na UVA část spektra. [36] Patří mezi nejlepší a také nejčastěji používané filtry v této oblasti.

Povolená koncentrace v ochranných slunečních přípravcích je 10%. Kvůli jeho omezené fotostabilitě se používá v kombinaci s jinými filtry, například s octocrylenem.

Použití v kosmetice je velmi široké a senzibilita malá, může však vyvolat alergickou i fotoalergickou reakci. [20], [25], [37]



Obr. 11: Avobenzon [38]

1.7.3 Fyzikální blokátory

1.7.3.1 Oxid titaničitý a zirkoničitý

Tyto oxidy nepenetrují do kůže a zůstávají jako fyzikální ochranná bariéra na povrchu pokožky, čímž se snižuje riziko kontaktních a alergických reakcí. [39] Mikronizované krystaly těchto látek vytvářejí prakticky neviditelný ochranný film, který např. v přípravku Daylong Baby bezpečně chrání před sluncem již od nejnižšího kojeneckého věku. [40] Materiály zhotovené z těchto filtrů jsou vhodné pro děti a pacienty s citlivou pokožkou.

Oxid titaničitý je ideální ochranný prostředek, který je inertní a bezpečný. Tvoří minerální ochrannou sluneční clonu pro oblast UVA, UVB a IR záření v mikronizované formě, dále se používá jako pigment, v krémech výrazně zvyšuje hodnotu SPF a jeho max. povolená koncentrace v ochranných slunečních přípravcích může být až 25%. Jeho nevýhodou mohou být viditelná bílá rezidua pigmentu po jeho aplikaci. [20]

I navzdory veškerým pokrokům v technologiích výroby je eliminace zbytku pigmentů náročná, protože často se používá kombinace chemických a fyzikálních filtrů. [25]

Oxid zinečnatý se používá rovněž jako oxid titaničitý. Používá se jako ochranná bariéra v UVA a IR oblasti. Působí chladivě, mírně antisepticky a protizánětlivě, neutralizuje nižší mastné kyseliny potu a odstraňuje nepříjemné zápachy. Povolená koncentrace v ochranných slunečních přípravcích je 20%. Velké využití nachází v kosmetickém průmyslu jako součást pudrů na pleť. [20]

2 Separační metody

2.1 Extrakce

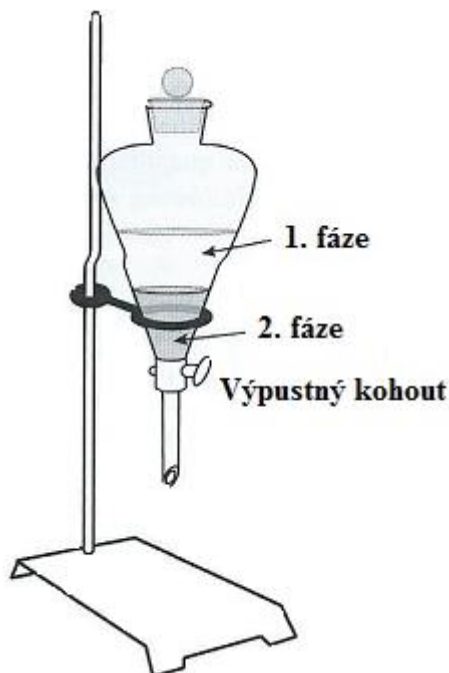
Extrakce patří mezi typické příklady separačních metod a může být použita pro izolaci analytu. Její princip je založen na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází, které mohou mít různá skupenství. Extrakce bývá často prováděna tak, aby při ní došlo nejen k účinné separaci, ale i k nakoncentrování analytu z relativně velkého objemu fáze vzorku do malého objemu kontaktní fáze – extrakčního činidla. K dosažení vysoké účinnosti separace lze přispět vhodnými podmínkami extrakce a znalostí vedlejších rovnováh. Podle charakteru analyzované látky volíme pH prostředí i extrakční činidlo. Extrakce hraje významnou roli v souvislosti s izolací UV filtrů ze vzorku, kdy se nejčastěji využívá extrakce kapaliny kapalinou nebo kapaliny tuhou fází.

2.1.1 L-L extrakce

Extrakce kapalina-kapalina se provádí pomocí dvou nemísitelných fází, pro přenos jedné nebo více rozpuštěných látek z jedné fáze do druhé. [41] Typická laboratorní extrakce je izolace organických sloučenin z vodného roztoku, kdy organické sloučeniny přechází z vodné fáze do fáze organické. Některé druhy iontů nebudou přecházet mezifází. [42] Nejběžněji se volí vhodná organická rozpouštědla (např. chloroform, benzen a další) podle vlastností analytu. [41]

L-L extrakce je prováděna buď manuálně intenzivním protřepáváním dvou nemísitelných kapalin v dělicí nádobě o požadovaném objemu nebo v různě konstruovaných extraktorech. Analyty silně polární a iontové povahy během extrakce dávají přednost vodné polární fázi a naopak analyty neiontové povahy pak fázi organické nepolární. Při této extrakci platí Liebigovo pravidlo – “podobné v podobném rozpouštěj” a další podmínkou je ustavení fázové rovnováhy mezi 2 nemísitelnými kapalinami. [41]

Pro stejné nebo různé objemy dvou kapalných fází, bude rozpuštěná látka přecházet ve větší míře do rozpouštědla, ve kterém je více rozpustná. Většina organických sloučenin se rozdělí do organické fáze, soli i iontové formy rozpuštěných látek zůstávají ve vodné fázi. Při extrakci vytřepáváním v dělicí nálevce se smíchá a protřepe vzorek s nemísitelnými rozpouštědly (schéma Obr. 12) a dochází k ustavení rovnováhy látek mezi oběma fázemi. Tyto dvě fáze jsou odděleny otevřením kohoutu pro odtok vodné a organické fáze do nádoby.



Obr. 12: Ilustrace L-L extrakce v dělicí nálevce. [42]

2.1.2 L-S extrakce (SPE – Solid Phase Extraction)

Extrakce se provádí rozmícháním tuhého adsorbentu ve vzorku nebo je roztok vzorku promýván kolonou, ve které je umístěný tuhý sorbent. Vhodnou volbou podmínek separace dochází k zachycování požadovaného analytu v koloně a nežádoucí složky odtékají pryč. Analyt se poté vymyje vhodným elučním činidlem z kolony nebo se z ní uvolní teplem.

2.1.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid Phase MicroExtraction)

Mikroextrakci můžeme definovat jako extrakci, kde použitý objem fáze, do kterého se extrahuje, je velmi malý ve srovnání s objemem extrahovaného vzorku. Většinou extrakce není úplná, dochází k vyextrahování pouze části analyzovaných látek. Kolik látky rozpuštěné v roztoku se vyextrahuje do extrakční fáze, závisí na několika faktorech - na afinitě látky k extrakčnímu činidlu, rozdělovacím koeficientu látky mezi vzorkem a extrakční fází a také na fyzikálně chemických vlastnostech analytu. [43]

S touto metodou bývá často spojena analýza plynovou chromatografií. Sorbent bývá nanesen na tenkém křemenném vlákne, které se nachází uvnitř duté jehly. Při extrakci je

vlákno z jehly vysunuto a exponováno analyzovanému prostředí. V zasunutém stavu je vlákno s analytem uchováno před vlastní analýzou. Jehla se zasouvá do dávkovacího zařízení chromatografu, vlákno se vysune, analyt se desorbuje do proudu nosného plynu, dále je veden na kolonu a následně do detektoru. [41]

2.2 Derivatizace

Derivatizací se rozumí chemická reakce, při které dochází k zavádění určitých funkčních skupin do molekuly analytu pomocí vhodného derivatizačního činidla. Nejčastěji se používá na přeměnu netěkavého analytu na analyt těkavý detekovatelný metodou plynové chromatografie. Využívá se především pro zvýšení chemické stability UV filtrů pro následující analýzu. Ve spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem je možné po derivatizaci analytu detekovat i velmi nízké koncentrace.

Derivatizace má několik výhod: [44], [45]

- zlepšení chromatografické separace
- snížení polaritý analytů (zvýšení těkavosti) blokování polárních funkčních skupin (např. -OH -NH₂ -COOH aj.)
- snížení meze detekce
- odstranění nežádoucí sorpce v koloně
- zlepšení identifikace analytu po převedení na vhodný derivát v následné nezávislé konfirmační analýze

Nicméně, i přes uvedené výhody je derivatizace velmi pracná i časově náročná a představuje i některé nevýhody:

- snížení životnosti analytické kolony
- nežádoucí vedlejší reakce probíhající během derivatizační reakce
- nebezpečné vlastnosti derivatizačních činidel (exploze, jedy, karcinogeny) [46]

2.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) se řadí mezi nejmodernější a nejčastěji používané separační metody. Význam GC pro rozvoj metodologie analýzy byl oceněn udělením Nobelovy ceny Martinovi a Syngovi v roce 1952. [47]

GC je separační metoda, která slouží k identifikaci především plyných a těkavých kapalných látek. Ač je metoda GC používána již přes 60 let, v současnosti podléhá stále novým vývojovým trendům. [48]

Ke stanovení UV filtrů je GC metodou robustní. Pro analýzu UV filtrů (např. octyl triazon) pomocí GC analýzy je nutné provést jejich derivatizaci vzhledem k jejich nízké těkavosti. Nejčastěji se GC používá ve spojení s hmotnostní detekcí, ale vzhledem k vysoké absorpenci UV sloučenin je možné využít i UV/VIS detektor buď s jednou vlnovou délkou nebo detektor s diodovým polem (DAD). [49] GC se oproti jiným separačním technikám prokazuje s lepší mezí detekce (LOD) při analýze velmi nízkých koncentrací analytu (ng/l). [50]

V současné době jsou k dispozici rozsáhlé knihovny hmotnostních spekter pro porovnání s naměřenými spektry, což vede k usnadnění identifikace složitých neznámých látek. [51] Spojení GC-MS se velmi často využívá k detekci drog, analýze vzorků životního prostředí, požárnímu vyšetřování, vyšetřování výbušnin a identifikaci neznámých vzorků. [50]

2.3.1 Instrumentace

V plynové chromatografii se vzorek odpaří a je veden pomocí inertního plynu přes kolonu. Můžeme rozlišit dva typy kolon: náplňové a kapilární. Náplňové kolony mají stacionární fázi zakotvenou na vhodném nosiči (nejčastěji se používá křemelina o průměru částic 0,1 – 0,15 mm), kdy se uplatňuje separace na základě rozdělování analytu (GLC) nebo mají pevnou stacionární fázi (GSC), kdy se naopak uplatňuje princip separace na základě adsorpce nebo síťového efektu. Náplňové kolony bývají zhotoveny ze skla nebo z nerezové oceli o průměru 0,3 – 0,6 cm a dosahují délky až několika metrů. Kapilární kolony jsou kolony, které mají kapalnou stacionární fázi nanesenou na vnitřní stěnu kapilár bez pevného nosiče. Tyto kolony dosahují délky až několik desítek metrů. [52] Jsou zhotoveny z křemenného materiálu, jehož povrch je pokrytý vrstvičkou polyimidu. Tato vrstvička

odstraní křehkost křemene a kolony jsou pružné. Analyty jsou zachycovány podle jejich afinity ke stacionární fázi a jsou různě časově separovány. Separované látky prochází kolonou k detektoru a jsou charakterizovány pomocí retenčního času, který se používá pro kvalitativní vyhodnocení vzorku. [53]

S použitím GC-MS jsou separované látky opouštějící kolonu GC vedeny přes interface do iontového zdroje, kde vznikají nabitě iontové fragmenty (např. elektronová ionizace). Vzniklé nabitě ionty jsou separovány ve vhodném hmotnostním analyzátoru (např. kvadrupól, TOF) podle hodnot m/z a následně samostatně detekovány. Z naměřených dat získáme chromatogram a hmotnostní spektrum, které slouží k identifikaci molekuly. Ke zjištění kvantitativní analýzy z chromatogramu se využívá plocha/výška píku. [54]

2.3.2 Nástřik

Přesnost plynové chromatografie ovlivňuje zařízení dávkování vzorku. Tento přístroj musí dávkovat vzorek reprodukovatelně. Kapalný vzorek se musí ihned po nadávkování odpařit, aniž by došlo k rozložení analytu. [55]

Kapalný vzorek je dávkován zpravidla injekční stříkačkou (0,1 – 10 μl) přes pryžové septum. Pro plynný vzorek se používají plynotěsné injekční stříkačky nebo obtokové dávkovací kohouty.

Známe několik metod nástřikování vzorků. Nástřik do kolony (*on column*), který se využívá pro náplňové i kapilární kolony. Analyt se dávkuje v objemu 1 – 10 μl . Horní část kolony je vyhřívána na teplotu o 10 – 30 $^{\circ}\text{C}$ nižší než je teplota varu použitého rozpouštědla. Analyt musí být rychle nadávkován, aby vytvořil kapalnou film na stěně kolony. Za 30 – 60 vteřin dochází k prudkému zvýšení teploty a dochází ke zplynění vzorku. Nástřik pomocí děliče toku (*split injection*) se používá pro užší kapilární kolony s malou kapacitou. Při více koncentrovaných vzorcích se pomocí děliče toků oddělí malá část od hlavního toku nosného plynu a do kolony se tedy dostane jen definovaný zlomek nástřikového množství (0,1 – 10%), což odpovídá 0,01 – 2 μl vzorku. Jako poslední typ dávkování se používá nástřik bez děliče toku (*splitless injection*), který se využívá pro velké objemy dávkovaného analytu pro stopovou analýzu. Princip je obdobný jako s děličem toku, avšak s tím rozdílem, že dělič je v tomto případě po určité době uzavřen a do kolony se dostává mnohem větší množství vzorku. Delší doba vstupování vzorku do kolony může způsobit rozšiřování zón. K jejich

zabránění se používá rozpouštědlo s vyšším bodem varu (oktan), které zkondenzuje a vytvoří kapalný film v hlavě kolony, ve kterém jsou pohlceny všechny analyty. Jakmile je vzorek zachycen, zvýší se teplota kolony a proběhne separace. [56] Může se použít i koncentrátor na počátku kolony, ve kterém dochází k zachycování vzorku ze vzduchu nebo vodného roztoku na adsorbent (pórovitý polymer nebo grafitované saze). Poté je vzorek termicky desorbován přímo do kolony. Účinnou aplikací je mikroextrakce pevnou fází. [56]

Množství vzorku musí být dostatečně malé, aby došlo k ustavení rovnováhy a musí se volit takový optimální průtok kolonou, aby byl optimální k průtoku injektorem (objemová rychlost injektoru musí být taková, aby se objem injektoru vypláchl za dobu menší než 1 vteřina). Během analýzy se musí zajistit minimalizace vlivu mimokolonových příspěvků. [57]

2.3.3 Iontové zdroje

Nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, kde vznikají nabitě ionty v plynné fázi, které se mohou po svém vzniku rozpadat (fragmentovat). Analyt vystupující z chromatografické kolony je veden přes interface do iontového zdroje, kde dochází nejprve k ionizaci, následně fragmentaci a akceleraci iontů. V současné době se využívají desítky typů iontových zdrojů (měkké nebo tvrdé techniky podle dodané energie), ale ve spojení GC-MS se nejčastěji používají dva typy ionizace: chemická (CI) a elektronová (EI). [58]

2.3.3.1 Elektronová ionizace

Elektronová ionizace (EI) se řadí mezi tvrdé ionizační techniky, kdy ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie od letících elektronů, která se projeví fragmentací molekulového iontu (někdy se projeví i v takovém rozsahu, že molekulární ion zcela chybí ve spektru). Vznikají nejčastěji kladně nabitě radikály molekuly, které fragmentují a poskytují různě bohatá fragmentační spektra. [58] V iontovém zdroji je umístěna žhavená katoda (W nebo Re vlákno), na které dochází k emisi elektronů. Elektrony jsou urychlovány směrem k anodě, ionizační energie bývá nejčastěji 70 eV.

Principem této ionizace je přiblížení emitovaných elektronů s valenčními elektrony molekuly, dochází k ovlivnění jejich magnetických polí a k předávání energie letících elektronů molekule analytu. Vznikající nabitě ionty jsou pomocí vytěšňovací elektrody

vypuzeny z iontového zdroje, dále fokusovány (zaostřeny) a urychlovány pomocí dalších elektrod do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich separaci podle m/z . Ionizace elektronovým nárazem není příliš efektivní a pouze jen jedna molekula z milionu prochází primární reakcí. [59], [60]

2.3.3.2 Chemická ionizace

Chemická ionizace (CI) naopak patří mezi měkké ionizační techniky, ale konstrukcí i principem je obdobná EI s tím rozdílem, že v iontovém zdroji je umístěn reakční plyn (např. methan). Nejprve ve zdroji emitujícím elektrony dochází k ionizaci molekul reakčního plynu, které následně ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu. V porovnání s EI je tato technika méně účinná, ale molekulový ion ve spektru je mnohem intenzivnější. [59], [60], [61]

CI je technika, která produkuje ionty s malým přebytkem energie a získá se hmotnostní spektrum s menší fragmentací, ve kterém je molekulární ion snadno rozpoznatelný. V důsledku toho, je chemická ionizace komplementární k ionizaci elektrony. V první řadě se vytváří ionty přes kolizi molekul, které mají být analyzovány s primárními ionty přítomnými ve zdroji. Ion-molekulární kolize tak bude indukována v určité části zdroje. Za tímto účelem se musí přidávat dostatečné množství reakčního plynu 50 – 100 mPa, aby docházelo k častým kolizím. Vytvořený ion bude kolidovat s jinými molekulami reakčního plynu, proběhne série reakcí, čímž se vytvoří ionizační plazma. Vzniklé kladné a záporné ionty vzorku budou reagovat s ionty v ionizační plazmě.

Ionizační plazma bude obsahovat nízkoenergetické elektrony, které se nazývají tepelné elektrony. Jedná se buď o elektrony, které byly použity pro první ionizaci a později zpomaleny nebo elektrony produkované ionizačními reakcemi. Tyto pomalé elektrony mohou být spojeny s molekulami, čímž se získají negativní ionty elektronového záchytu. Ionty vytvořené z molekuly odebráním protonu nebo hydridu, nebo přidáním protonu nebo jiného iontu, se nazývají ionty pseudomolekulární. [62]

2.4 Hmotnostní analyzátory

Klíčovou součástí MS je hmotnostní analyzátor, ve kterém za vakua dochází k separaci vzniklých iontů podle hodnot m/z . Jako nejčastější a nejběžnější hmotnostní analyzátor se v moderních přístrojích MS používá kvadrupól. Je velmi oblíbený pro svou jednoduchost a nízkou cenu. Proti klasické konstrukci není vyžadováno vysoké vakuum. Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi tyčovými elektrodami kruhového průřezu o délce 20 – 30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vkládáno kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě tyče je vedeno naopak záporné stejnosměrné napětí a na všechny čtyři tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Nastavením hodnot veličin stejnosměrného napětí, amplitudy i frekvence radiofrekvenčního pole jsou předurčeny trajektorie drah, po kterých se budou pohybovat určité ionty mezi tyčemi podle jejich m/z . Nabité ionty jsou přiváděny do středu osy kvadrupólu a následně dochází k jejich oscilaci. V určitém okamžiku, kdy určitý ion má stabilní oscilaci je při jeho určitém poměru m/z vypuzen na detektor. Nastavení veličin kvadrupólu se během analýzy mění a detektor zachycuje postupně ionty o různém poměru m/z .

Ve spojení GC-MS lze použít jako hmotnostní analyzátor i iontovou past (IT), která pracuje na stejném principu jako kvadrupól, avšak s tím rozdílem, že se využívají pouze tři elektrody - jedna kruhová, dvě vyklenuté do prostoru kruhu. V tomto prostoru dochází k tvorbě oblaku iontů, kde mohou být ionty zachycovány po dobu milisekund, někdy i déle. Iontová past využívá základního plynu helia o nízkém tlaku (desetiny Pa), který třením brzdí pohyb iontů a pomáhá k seskupení do oblaku v iontové pasti. Změnou veličin umožníme průchod iontů podle určitých hodnot m/z k detektoru. Iontová past je jako analyzátor velmi citlivý, malý, snadno automatizovatelný, ale má nižší rozlišení a jeho dynamický rozsah je omezený. V prostoru pasti mohou probíhat rušivé reakce.

Další variantou analyzátoru může být analyzátor doby letu (TOF), který se využívá především v tandemu s jiným analyzátozem nebo analyzátor iontová cyklotronová rezonance, který obsahuje magnetický i elektrostatický sektor, ale má vysoké nároky na prostor, cenu i omezené použití ve špičkových laboratořích. [56]

2.5 Analýza MS

Hmotnostní spektrometr může snímat spektra analytu ve 2 různých módech – SIM a TIC. Režim SIM (selektivní monitorování iontů; selective ion monitoring) selektivně monitoruje určitou hodnotu m/z narozdíl od režimu TIC (celkový iontový proud; total ion current), kdy se měří celé spektrum. V přístroji ve spojení GC – MS lze využívat běžně oba dva režimy.

2.5.1 SIM („Selective Ion Monitoring“)

Tento termín se používá pro popis fungování MS přístroje, ve kterém jsou zaznamenávány intenzity některých specifických iontových svazků místo celého hmotnostního spektra a jen tyto fragmenty jsou detekovány. Jedná se o rychlou efektivní analýzu, a to zejména v případě, že analytik má předchozí informace o vzorku, nebo hledá pouze několik konkrétních látek. [63] Výhodou měření je extrémně nízký detekční limit, protože během měření je sledováno jen malé množství fragmentů, a tím nedochází ke snížení citlivosti přístroje. Během skenování nedochází k matričním vlivům ve vzorku, protože sledujeme pouze určitou fragmentační část. V tomto případě je důležité ověřit, zda sledovaný pík odpovídá skutečnému zkoumanému analytu – využitím referenčního standardu, který se přidá k analytu a analýza se provede stejným způsobem znovu. [64]

2.5.2 TIC („Total Ion Current“)

TIC lze nazývat i jako tzv. celkový iontový proud. Při sběru údajů v plném režimu skenování musí být v přístroji nastaven rozsah hmotnostních fragmentů podle jejich m/z . Nejběžnějším typickým rozsahem bývá od m/z 50 až 500. Hmotnostní rozsah se volí podle typu vzorku, podle typu použitého rozpouštědla a jiných možných interferencí. MS by neměl být nastaven v takovém rozmezí, ve kterém jsou sledovány velmi nízké hmoty z důvodu zvýšení šumu, kde může docházet k nežádoucí detekci vzduchu (ve spektru se objeví dusík m/z 28 nebo oxid uhličitý m/z 44) i k jiným druhům interferencí. TIC poskytuje mnohem více informací než SIM a používá se při určování neznámých látek ve vzorku. Při první analýze se nejčastěji změří celé spektrum v režimu TIC a poté se ze získaných dat volí podmínky pro SIM. [63]

2.5.3 Analýza GC-MS

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem je nejvíce využívaná analytická technika pro identifikaci a kvantifikaci organických látek ve složitých matricích. Plynový chromatograf-hmotnostní spektrometr jsou nepostradatelné zejména v oblasti environmentální vědy, forenzní chemie, zdravotní péče, zdravotního a biologického výzkumu, bezpečnosti potravin a mnoha dalších. Přístrojové vybavení se pohybuje v ceně od několika desítek tisíc až po téměř milion dolarů.

GC-MS je synergická kombinace dvou silných mikroanalytických technik. Plynový chromatograf separuje analyty v čase, a hmotnostní spektrometr poskytuje informace, které pomáhají při strukturální identifikaci každé složky. Tato kombinace má několik výhod. Nejprve dochází k separaci látek složité směsi a získaná hmotnostní spektra jednotlivých sloučenin mohou být použita pro kvalitativní i kvantitativní účely.

Hmotnostní spektrometrie využívá ionizační techniky, které vyžadují analyt v plynné fázi a jsou ideálně vhodné pro analýzu GC-MS. GC-MS může získat kompletní hmotnostní spektrum, které poskytuje přímý důkaz o jmenovité hmotnosti a charakteristické fragmentaci (vzor nebo chemický otisk prstu), která může být použita jako základ pro identifikaci látek z chromatogramu (vedle retenčního času). Ke kvantifikaci analytu se využívá geometrického tvaru píku, kdy se integruje výška nebo plocha píku. [65]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

K experimentálnímu měření byly použity tyto chemikálie: extrakční rozpouštědlo tetrachlorethylen, methanol (penta, Praha, Česká republika), kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich), bezvodý síran sodný p.a. (Lachema, Neratovice, Česká republika), plynný dusík. K derivatizaci byly použity tyto chemikálie: BSTFA (Sigma-Aldrich), pyridin, hexan (Penta).

K analýze reálných vzorků byly použity tyto standardy UV filtrů:

- Oxybenzon (Sigma – Aldrich)
- Benzophenon (Sigma – Aldrich; čistota $\geq 99\%$)
- Homosalat (Sigma – Aldrich)
- Octocrylen (Sigma – Aldrich; čistota $\geq 98\%$)
- 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamát (Sigma - Aldrich)
- 2-ethylhexylsalicylát (Sigma – Aldrich, čistota 99 %)

Použité reálné vzorky:

- 1,5 l vzorku přírodní vody v oblasti Výkleky
- 1,5 l vzorku vody z bazénu v oblasti Chropyně
- 1,5 l vzorku vody z bazénu v oblasti Přerov

Použité reálné vzorky ochranných krémů:

- ASTRID s ochranným faktorem SPF 20
- LADIVAL gel na ochranu proti slunci s velmi vysokou ochranou 50+ pro alergickou pokožku
- NIVEA SUN mléko na opalování s karotenem s nízkým faktorem SPF 6
- Denní krém na pleť AnvAge Oriflame s ochranným faktorem SPF 15

3.2 Přístroje a pomůcky:

Analytické váhy (Mettler Toledo AB204)

Ultrazvuková lázeň

pH metr

Centrifuga (Eppendorf 5702)

Blokový termostat (Evaterm) pro sušení proudem dusíku (N₂ 99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie)

Laboratorní sklo:

- dělicí nálevka (1000 ml)
- malé a velké skleněné vialky
- skleněná baňka s plochým dnem
- kádinky a odměrné baňky
- pipety, odměrný válec

Laboratorní pomůcky - stojan, kruh, svorky, plastové zkumavky

Automatické pipety a plastové špičky

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Agilent 7890A & 5975C (Agilent, Palo Alto, USA)

Křemenná kapilární kolona HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (Agilent, Palo Alto, USA)

Nosný plyn v GC – He 4.8 (99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie)

3.3 Odběr vzorku

3.3.1 Voda

Pro analýzu UV filtrů byly odebírány vzorky reálných vod na 4 různých místech. Každý vzorek byl odebírán do čisté 1500 ml PET láhve a ihned bezpečně transportován do chladu, následně k analýze.

Jako první vzorek byla odebrána voda z lomu v obci **Výkleky** (Obr. 12). Tento lom patří mezi moravské kamenolomy společnosti Českomoravský štěrk, a.s. Nachází se na Moravě asi 20 km východně od Olomouce a asi 15 km severovýchodně od Přerova. Toto přírodní “koupaliště“ láká mnohé ke koupání či potápění. Voda zde bývá velmi čistá až průzračná. Z hlediska teorie by v této přírodní vodě v letních horkých měsících mohl být zvýšený obsah UV filtrů, které se do vody dostanou s určitou pravděpodobností nanášením ochranných opalovacích krémů, které se vymývají z těla do vody během koupání.

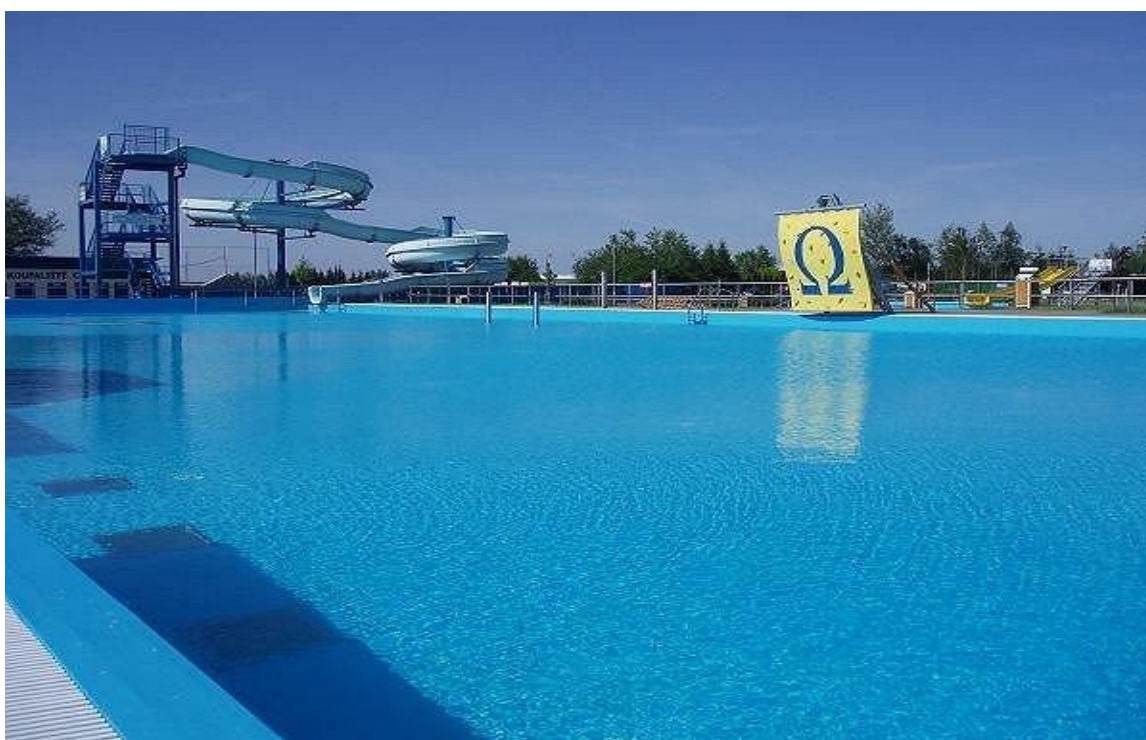


Obr. 12: Lom Výkleky

Druhým odběrným místem je venkovní koupaliště, které se nachází ve městě **Chropyně** (Obr. 13). Koupaliště má dlouholetou tradici. Již původní koupaliště bylo velmi oblíbeným cílem návštěvníků nejen z Chropyně, ale z velmi širokého okolí, zejména díky ohřívání vodě, tehdy díky spolupráci s firmou Technoplast Chropyně.

Po rekonstrukci, která proběhla po 30-ti letech provozu, dostalo koupaliště nový nádech a přilákalo spoustu milovníků vodních zážitků. Prozatím poslední fáze rekonstrukce proběhla v roce 2007. V roce 2016 došlo také na rekonstrukci posledního bazénu, a to dětského brouzdaliště. Koupaliště bývá zpřístupněno jen v době letní sezóny.

Voda ve všech bazénech je vyhřívána za použití tepelných čerpadel. K dispozici jsou zábavné vodní atrakce - tobogán, lezecká stěna, masážní lavice a divoká řeka.



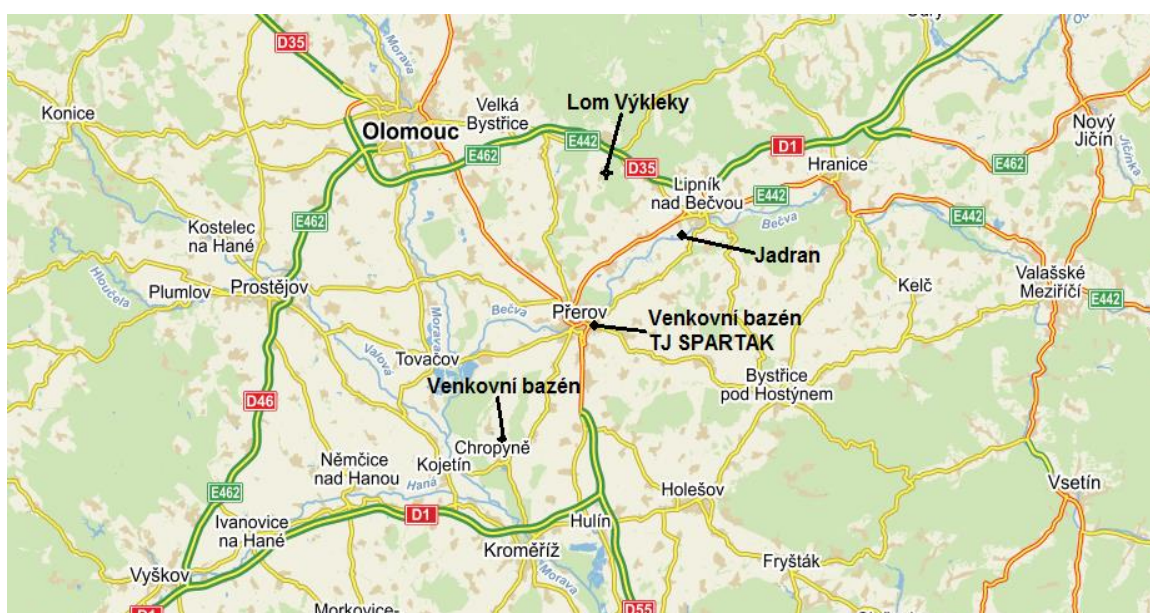
Obr. 13: Městské koupaliště Chropyně

Posledním odběrným místem je malý venkovní bazén nacházející se v centru **Přerova** jako součást sportovní haly TJ Spartak (Obr. 14). Koupaliště je využíváno opět jen v době letní sezóny popř. i mimo ni podle počasí.

Je přístupné jak pro sportovce využívající sportovní halu, tak i pro veřejnost za určitý poplatek podle doby návštěvy. Vzorek vody byl odebírán z hloubky 50 cm od hladiny.



Obr. 14: Venkovní bazén TJ Spartak



Obr. 15: Mapa odběrových míst vzorků vody

3.3.2 Vzorky krémů

K identifikaci přítomnosti UV filtrů byly použity vzorky ochranných opalovacích krémů o různé ochraně nebo ochranné krémy na denní aplikaci od různých distributorů (Obrázek 16-18), které byly přímo z originálního obalu naváženy na analytických vahách (100 mg), kvantitativně převedeny do 500 ml destilované vody v kádince a celkový vzorek se dále připravil pro následnou extrakci, způsobem uvedeným v pracovním postupu v kapitole 4.3.



Obr. 16: Ochranný opalovací přípravek ASTRID s SPF 20



Obr. 17: Ochranný přípravek LADIVAL s SPF 50+ pro citlivou pokožku



Obr. 18: Denní pleťový krém NovAge s SPF 15

4 PRACOVNÍ POSTUP

4.1 Příprava standardů UV filtrů

Standardy UV filtrů byly naváženy na analytických váhách do vialek s přesností na 4 desetinná místa a rozpuštěny (zhomogenizovány) v methanolu, následně derivatizovány a analyzovány metodou GC-MS.

4.2 Příprava reálných vzorků vody

Velkým odměrným válcem bylo odměřeno 500 ml vzorku vody, který se nechal odplynit v ultrazvuku po dobu 4 minut. Posléze se vzorek upravil z mírně zásaditého pH (dle použitého vzorku vody) na kyselé pH 4 pomocí 1 M kyseliny chlorovodíkové. Vzorek byl takto připraven k následující extrakci.

4.3 Příprava reálných vzorků ochranných krémů

Vzorek krému se nejprve navážil na analytických vahách (100 mg) a následně byl kvantitativně převeden do 500 ml destilované vody. Následně se vzorek nechal opět odplynit v ultrazvuku po dobu 4 minut a poté bylo upraveno pH z 6-10 podle druhu krému na pH 4 opět 1M-HCl. Takto připravený vzorek se dále nechal extrahovat vytřepáváním.

4.4 Extrakce vzorků vod a krémů

Připravené vzorky vody a krémů pro extrakci byly převedeny do 1000 ml dělicí nálevky a následně byla provedena opakovaná extrakce, kdy pro 1. extrakci bylo ke vzorku přidáno 20 ml extrakčního rozpouštědla tetrachlorethylenu a pro 2. extrakci bylo použito 10 ml extrakčního činidla pomocí pipety. Následně byla směs extrahována intenzivním vytřepáváním po dobu 5 minut. Po dokonalém vytřepání se nechal vzorek ustálit v dělicí nálevce a rozvrstvit na vodnou a organickou fázi. Organická fáze byla odebrána do plastových zkumavek a vodná fáze byla bezpečně zlikvidována do odpadu. Plastové zkumavky byly

vloženy do centrifugy, kde dochází k dokonalému rozdělení zbytkového objemu obou fází, které se neoddělily během vytřepávání.

Plastové zkumavky s extraktem se nechaly centrifugovat za určitých podmínek (max. otáčky po dobu 6 minut nebo 3200 ot./min po dobu 3 minut). Ze zkumavek pomocí automatické pipety byla opatrně odstraněna část vodné fáze (pokud byla přítomná) a organická vrstva tetrachlorethylenu byla převedena do skleněné baňky pro vysušení bezvodým síranem sodným. Po vysušení byl vzorek převeden do velké skleněné vialky a nechal se na topné desce pod proudem dusíku při teplotě 60°C odpařovat do objemu cca 3-4 ml. Vzorek byl převeden pomocí automatické pipety do malé skleněné vialky a odpařen do sucha.

4.5 Derivatizace

Vzorky před analýzou GC-MS bylo nutno derivatizovat v uzavřených vialkách přidávkem 50 µl pyridinu, 50 µl BSTFA a po těchto přísadách se nechaly vzorky zreagovat na topné desce při 80 °C po dobu 30 minut. Po proběhnutí reakce vzorky byly ochlazeny na laboratorní teplotu, zředěny 400 µl hexanu a analyzovány pomocí GC-MS.

4.6 Analýza GC-MS

Analýza vzorků byla prováděna na GC Agilent 7890A, který byl vybaven MS detekcí Agilent 5975C. Dávkování vzorku bylo provedeno automatickým dávkovačem na křemennou kolonu (HP-5MS) s dávkovacím pulsem (20 psi; 0,2 min), v objemu 1 µl. Nástřík i spoje GC-MS byly vyhřívány na teplotu 280°C. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 0,9 ml/min. Během separace byl použit teplotní program v rozmezí 50 – 300°C. Po nadávkování vzorku se na počátku udržovala teplota kolony na 50°C po dobu 2 minut, poté se teplota zvyšovala rychlostí 10°C/min na 300°C a na této teplotě se kolona udržovala po dobu 15 minut.

Hmotnostní detekce využívala iontového zdroje - elektronovou ionizaci (EI), který byl na počátku analýzy vypnutý z důvodu odstranění rozpouštědla (solvent delay – 6 min). Reálná data byla získána v módu TIC (29 – 520 m/z) a SIM (178, 195, 285 m/z).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza standardů UV filtrů

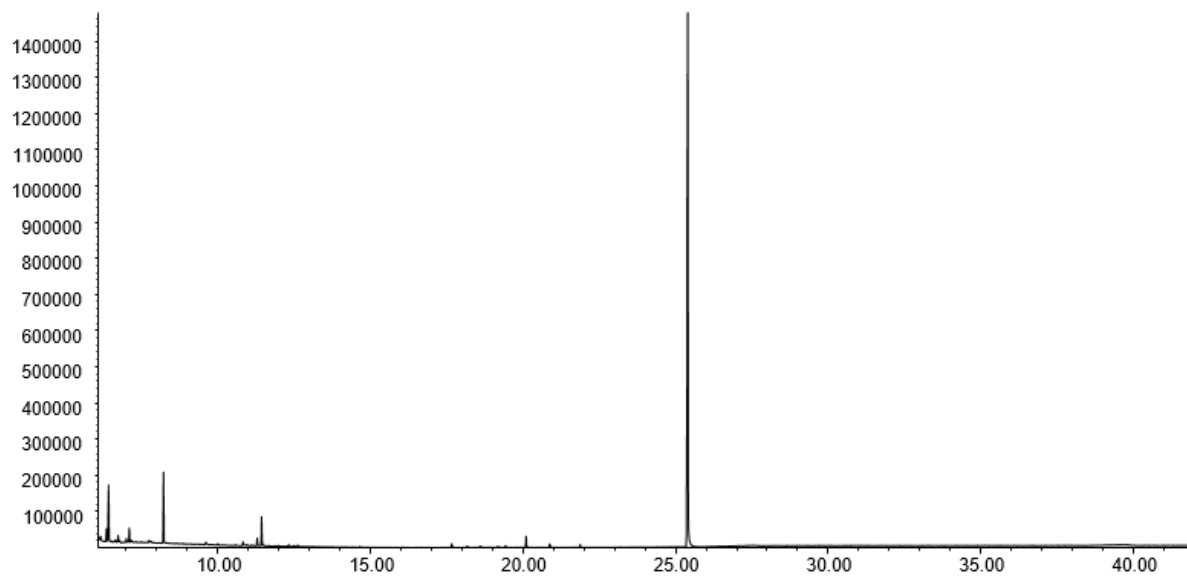
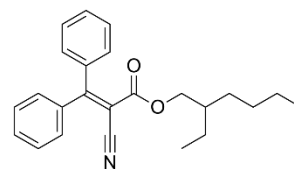
Jednotlivé standardy UV filtrů byly připraveny o koncentraci 100 µg/l rozpuštěním v methanolu, následně derivatizovány a analyzovány metodou plynové chromatografie spojenou s hmotnostním spektrometrem.

Analýzou standardů byly zjištěny retenční a hmotnostní charakteristiky jednotlivých UV filtrů (Tab. 5). Z naměřených dat jsme získali příslušné chromatogramy a hmotnostní spektra jednotlivých UV filtrů pro srovnání a identifikaci jednotlivých látek v reálných vzorcích vod a krémů. Chromatogramy jednotlivých standardů jsou uvedeny na obrázcích 19-25 a jejich naměřená hmotnostní spektra, jsou uvedena v příloze. Z níže uvedených naměřených chromatogramů byly zjištěny retenční časy, podle kterých byly identifikovány konkrétní látky. Z naměřených hmotnostních spekter byly zjištěny charakteristické hodnoty m/z použité pro citlivou detekci v režimu SIM.

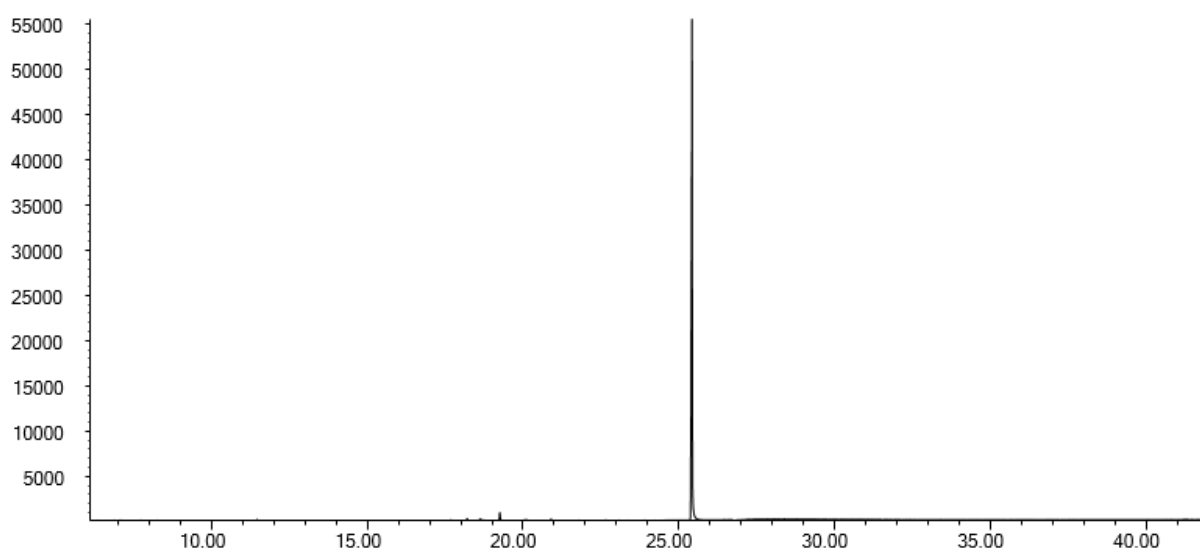
Tab. 5: Retenční a hmotnostní charakteristiky standardů UV filtrů.

UV filtry	m/z	t _R (min)
BP	105	16,84
EMS	195	20,34
HMS	195	20,73
BZ3	285	21,38
EMC	178	23,44
OCR	178	26,07

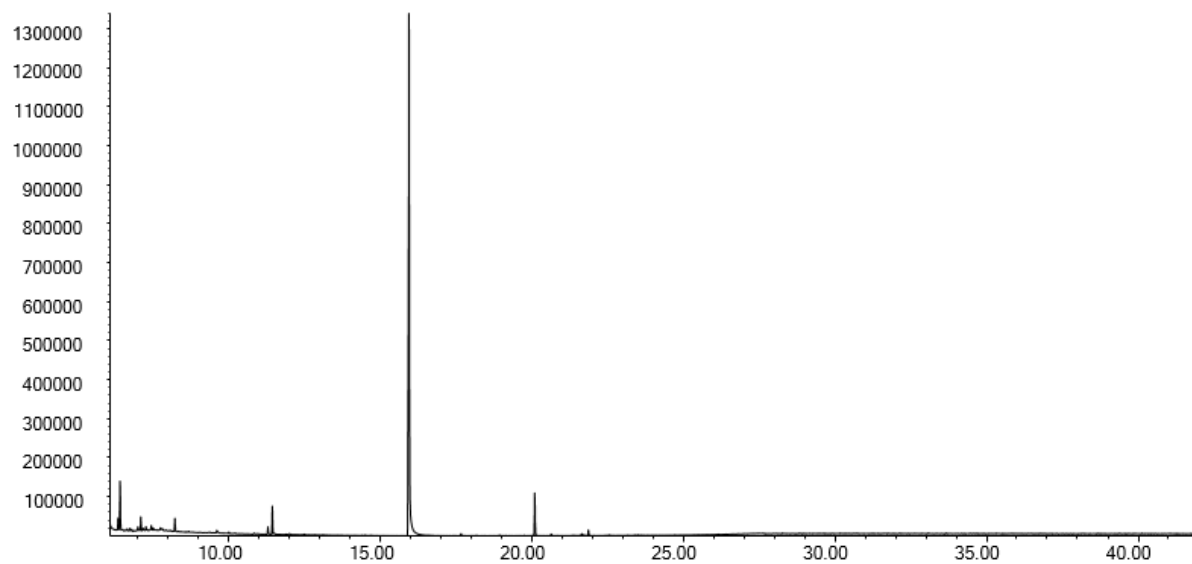
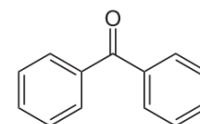
Jako reálné vzorky k prokázání přítomnosti konkrétních UV filtrů byly použity vzorky vody v přírodních rezervacích, ve veřejně přístupných bazénech a vzorky ochranných krémů na opalování nebo ochranné pleťové krémy na denní aplikaci obličeje/dekoltu.



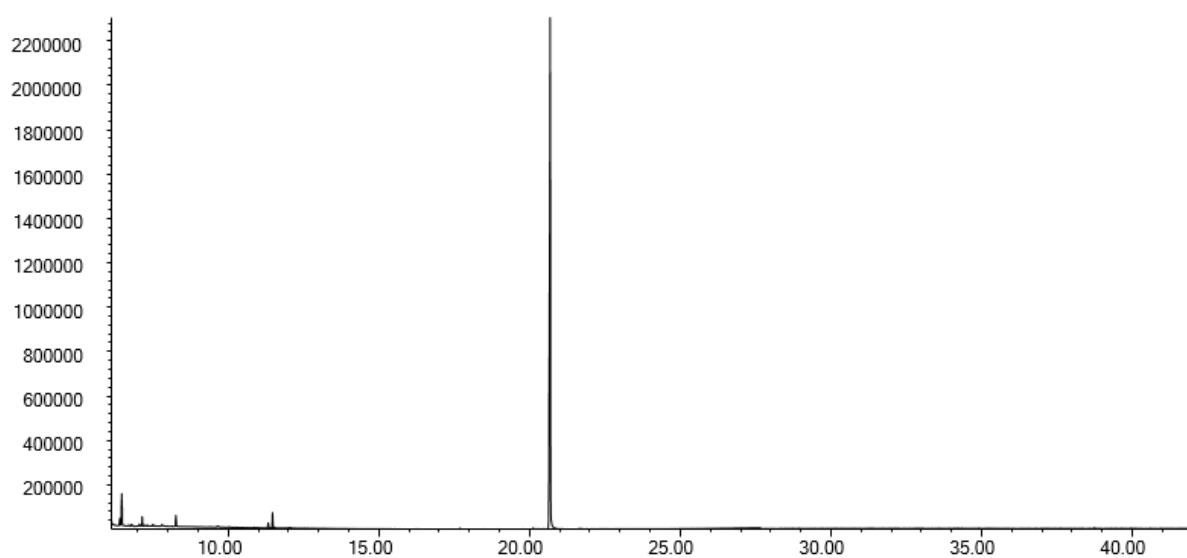
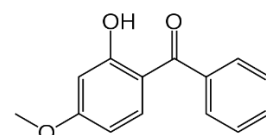
Obr. 19: Chromatogram octocrylenu v módu TIC.



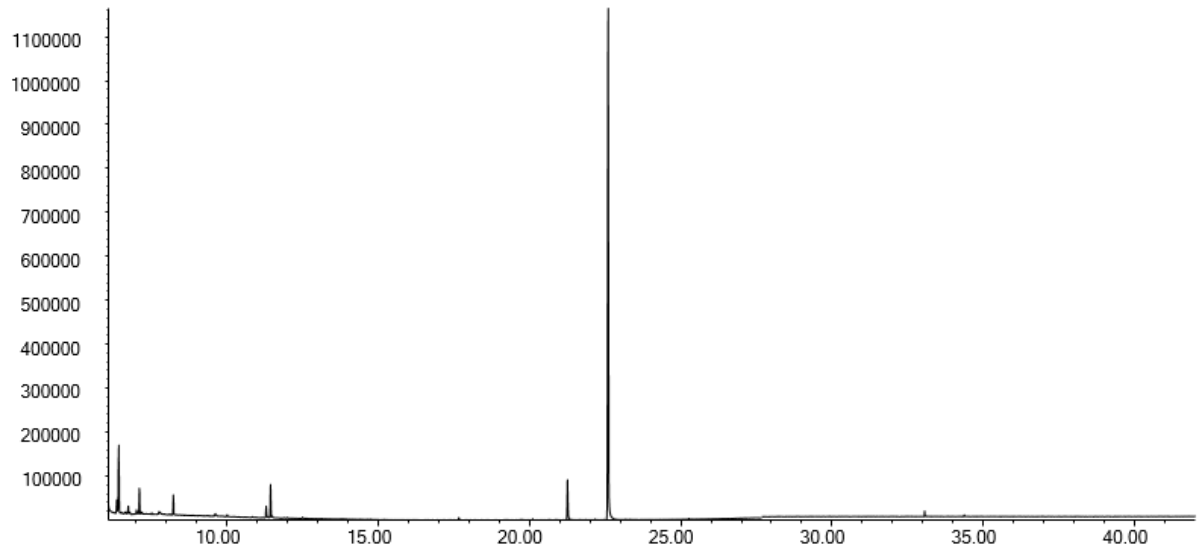
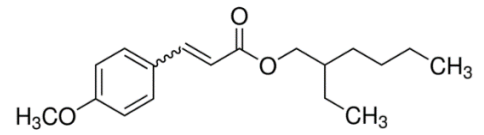
Obr. 20: Chromatogram octocrylenu v módu SIM.



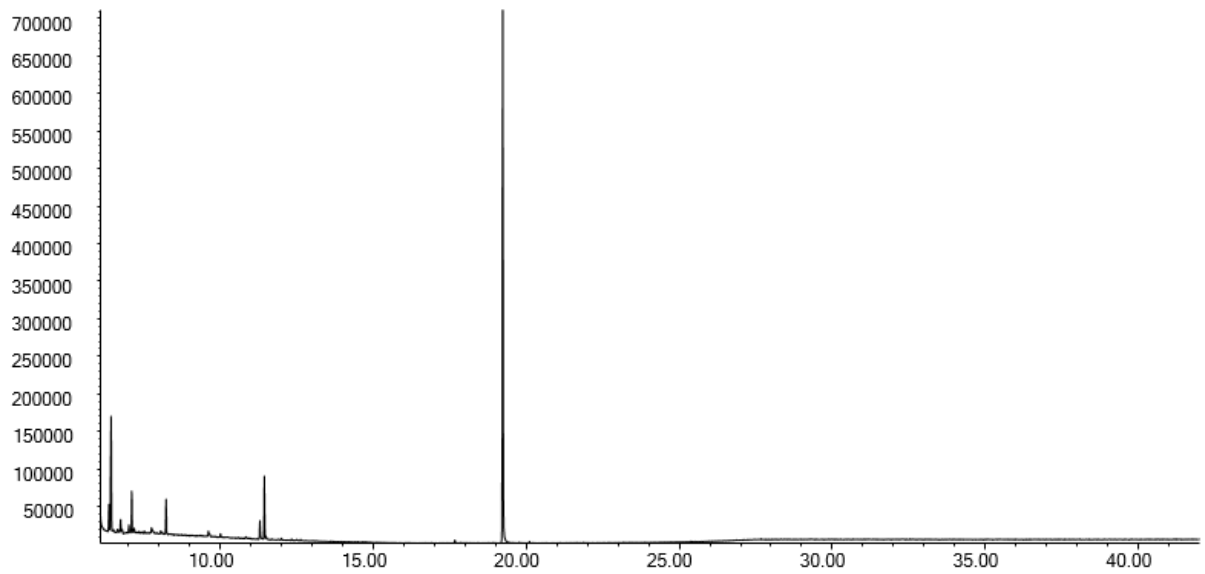
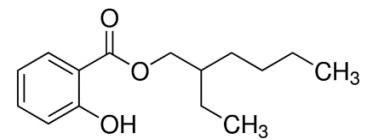
Obr. 21: Chromatogram benzophenonu v módu TIC.



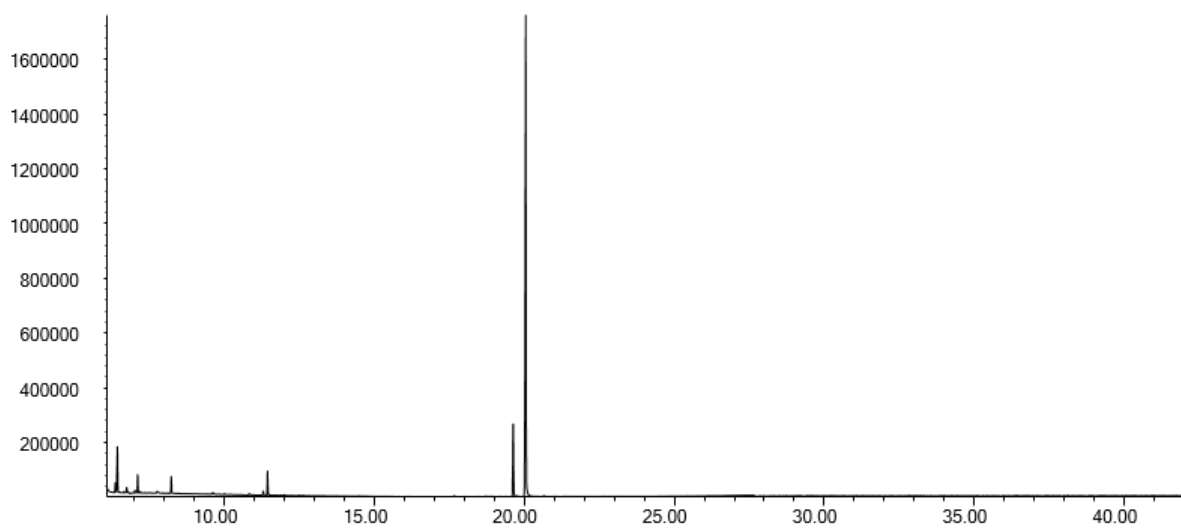
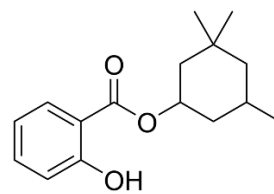
Obr. 22: Chromatogram oxybenzonu v módu TIC.



Obr. 23: Chromatogram 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamátu v módu TIC.



Obr. 24: Chromatogram 2-ethylhexylsalicylátu v módu TIC.



Obr. 25: Chromatogram homosalatu v módu TIC.

5.2 Analýza vzorků vod

Použité reálné vzorky byly vody z přírodního lomu Výkleky a dva vzorky vody z veřejně přístupných bazénů v Chropyni a Přerově. Z naměřených chromatografických a spektrálních dat byla zjištěna přítomnost některých UV látek. Z chromatogramů (Obrázek 26-31) jsou vidět příslušné chromatografické píky pro UV látky: octocrylen, oxybenzon, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamát, 2-ethylhexylsalicylát, homosalat a benzophenon. Z naměřených ploch píků byly vypočítány koncentrace jednotlivých UV látek v jednotlivých vzorcích vody (tab. 6).

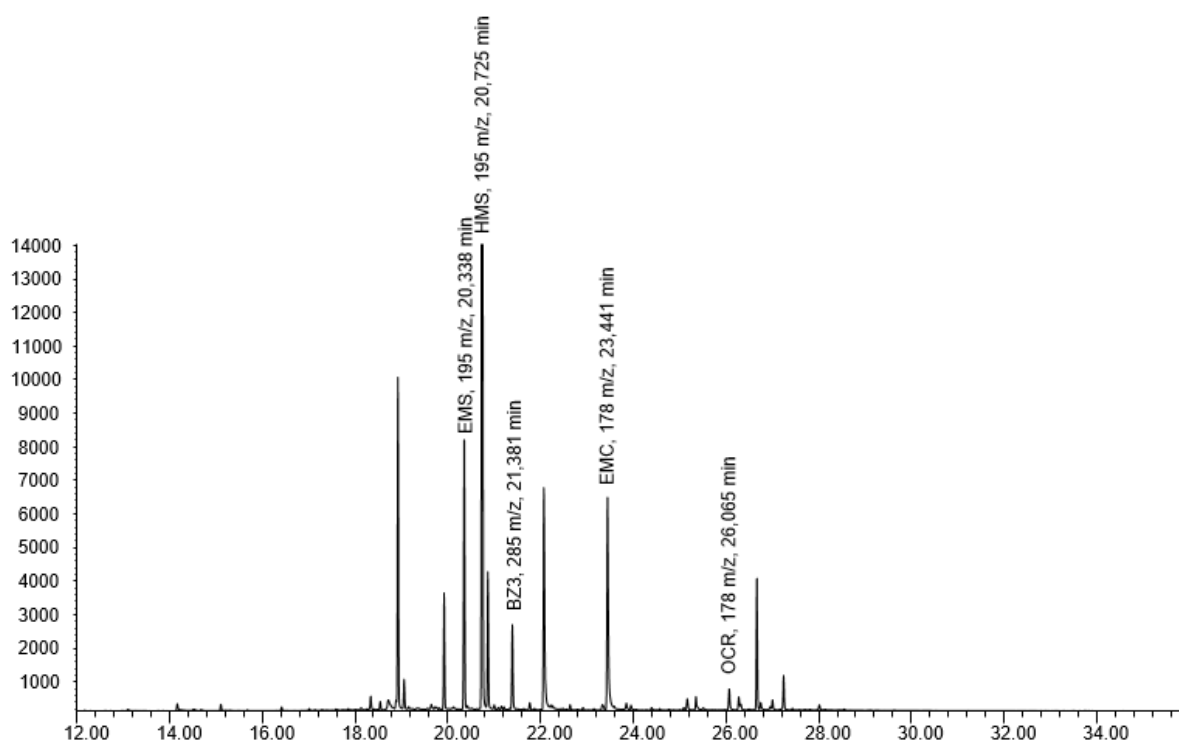
Tab. 6: Tabulka zjištěných koncentrací jednotlivých UV filtrů ve vzorcích vody.

Název UV látky	Koncentrace [µg/l]		
	Výkleky	TJ Spartak	Chropyně
octocrylen	0,07	0,58	6,93
benzophenon	2,04	0,02	3,26
oxybenzon	6,82	n. d.	12,92
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamát	0,21	0,12	0,004
2-ethylhexylsalicylát	1,49	0,80	0,70
homosalat	0,96	0,71	3,97

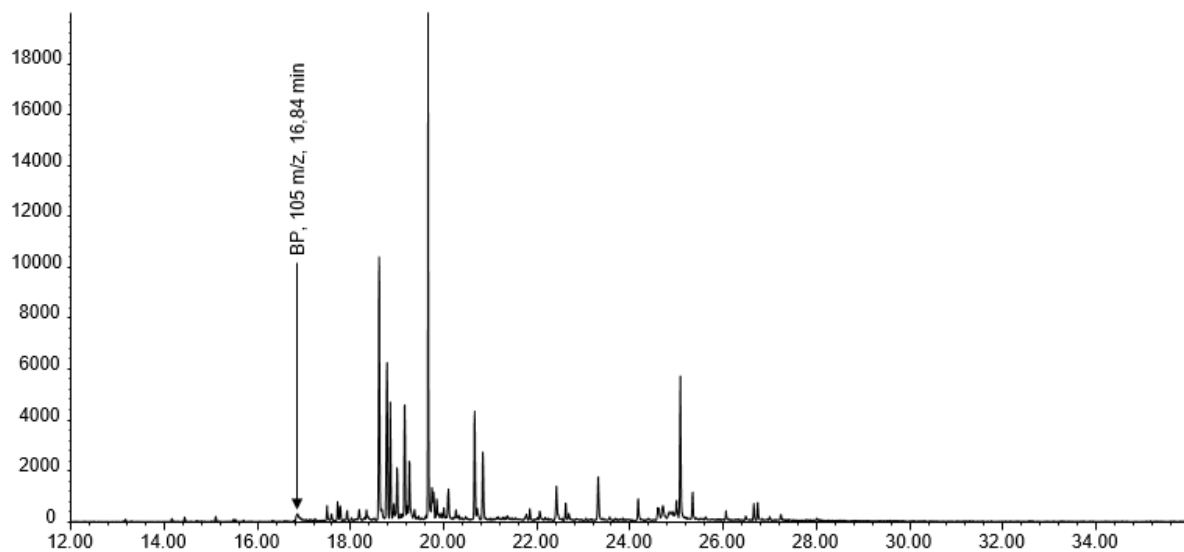
Z tabulky (Tab. 6) zjištěných koncentrací je zřejmé, že ve všech 3 vzorcích vody byly identifikovány všechny studované UV látky (s výjimkou oxybenzonu, který nebyl detekován ve vzorku z bazénu TJ SPARTAK). Ve vzorku vody z Výklek byla stanovena nejvyšší koncentrace oxybenzonu a nejnižší koncentrace octocrylenu. Ve vzorku vody z Přerova (TJ SPARTAK) byla zjištěna nejvyšší koncentrace 2-ethylhexylsalicylátu a nejnižší koncentrace benzophenonu. V tomto vzorku nebyla potvrzena přítomnost oxybenzonu. A v posledním vzorku vody z Chropyně byla prokázána nejvyšší koncentrace oxybenzonu a nejmenší koncentrace 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamátu. Celkový obsah sledovaných látek byl nejvyšší ve vzorku vody v Chropyni 27,8 µg/l a nejnižší ve vzorku vody TJ SPARTAK 2,23 µg/l.

Zvyšující se pravděpodobnost přítomnosti těchto látek ve vzorcích vody ovlivňuje zejména lidský faktor. UV látky se do vody dostanou z lidské pokožky, která byla ošetřena krémem s příslušným ochranným SPF faktorem proti slunečnímu záření. Člověk, který opakovaně aplikuje ochranný krém na pokožku celého těla a opakovaně vstupuje do bazénu nebo přírodní rezervace (povolené koupání) zvyšuje pravděpodobnost přítomnosti UV látek ve vyšších koncentracích, což může vést k nežádoucím účinkům. V přírodní rezervaci, kde se může objevit vysoká koncentrace UV látek, může velmi negativně působit na všechny vodní organismy žijící v této vodě. Některé UV látky mohou mít negativní důsledek i na lidské zdraví.

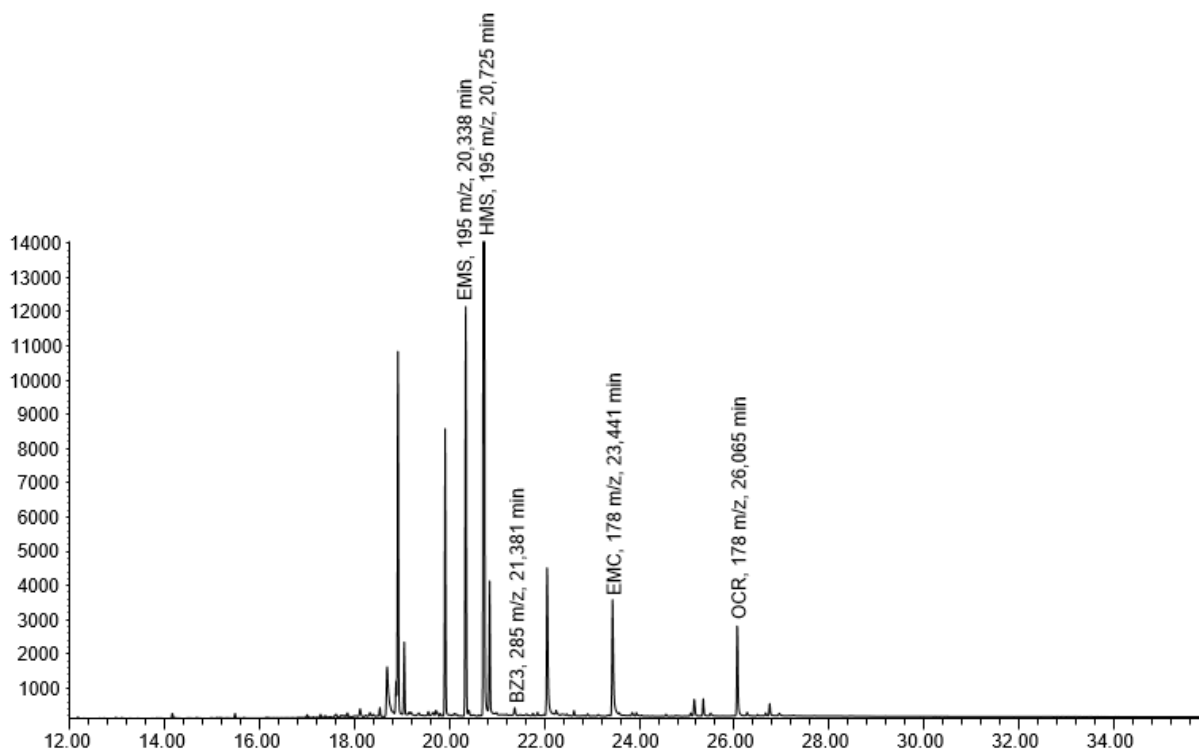
Cílem této práce bylo ověření přítomnosti UV filtrů ve vodách a jejich stanovení. Některé druhy jsou velmi nebezpečné.



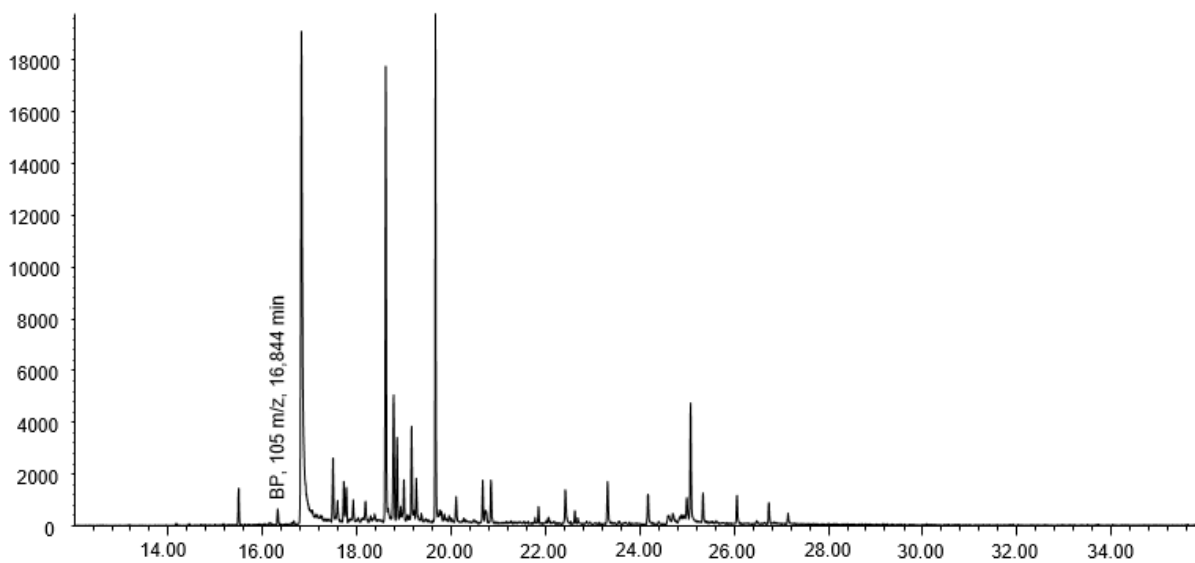
Obr. 26: Chromatogram vzorku vody z Výklek “(SIM 178, 195, 285 m/z) ”.



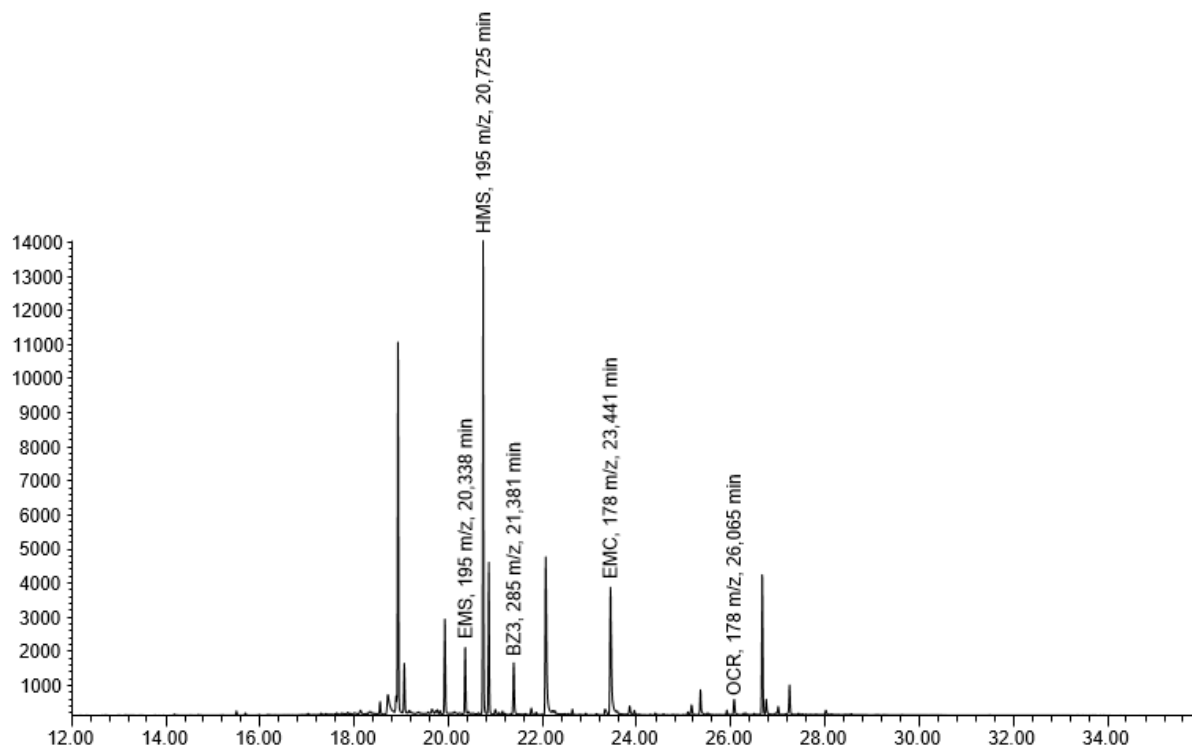
Obr. 27: Chromatogram vzorku vody z Výklek “(TIC, rekonstruovaný iontový chromatogram, 105 m/z, benzophenon)”.



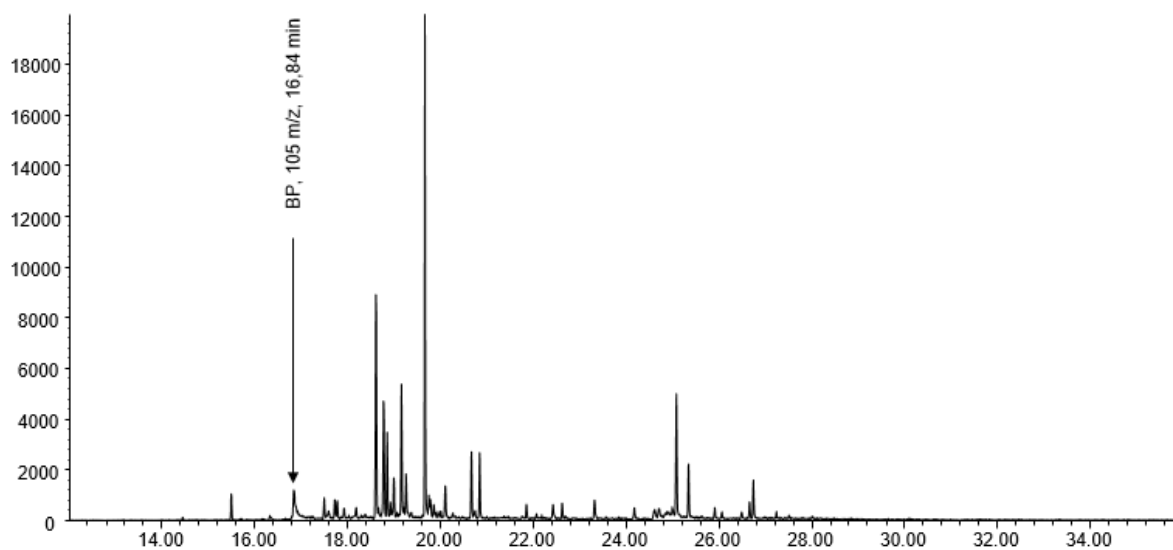
Obr. 28: Chromatogram vzorku vody z bazény v Chropyni “(SIM 178, 195, 285 m/z)”.



Obr. 29: Chromatogram vzorku vody v Chropyni “(TIC, rekonstruovaný iontový chromatogram, 105 m/z, benzophenon)”.



Obr. 30: Chromatogram vzorku vody z bazénu TJ SPARTAK “(SIM 178, 195, 285 m/z)”.

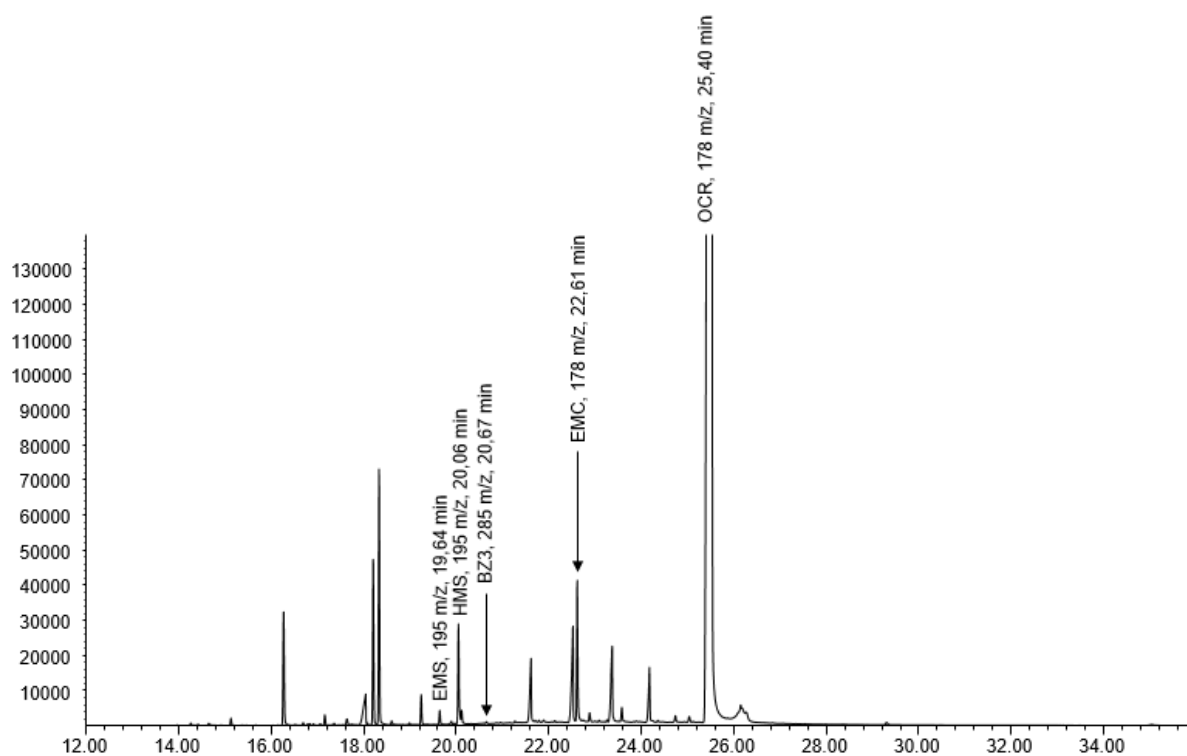


Obr. 31: Chromatogram vzorku vody z bazénu TJ SPARTAK “(TIC, rekonstruovaný iontový chromatogram, 105 m/z, benzophenon)”.

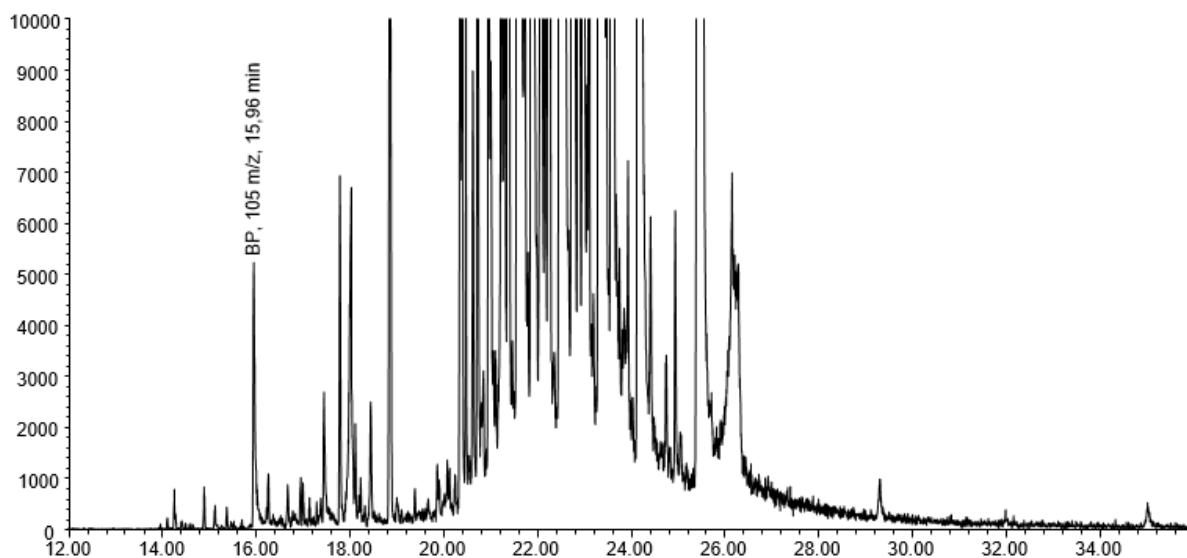
5.3 Analýza vzorků krémů

Použité reálné vzorky byly 3 druhy krémů: ASTRID ochranný krém na opalování s SPF 20, LADIVAL ochranný krém pro citlivou pokožku s SPF 50+ a ochranný denní krém na pleť s SPF 15. V těchto 3 vzorcích byla prokázána přítomnost 6-ti studovaných UV látek metodou GC-MS. Výsledky jsou interpretovány v jednotlivých chromatogramech v módu SIM, ve kterých jsou znázorněné píky jednotlivých UV filtrů (Obrázek 32, 34 a 36). Benzophenon byl analyzován v módu TIC s využitím rekonstruovaných iontových chromatogramů (105 m/z, Obr. 33, 35 a 37)

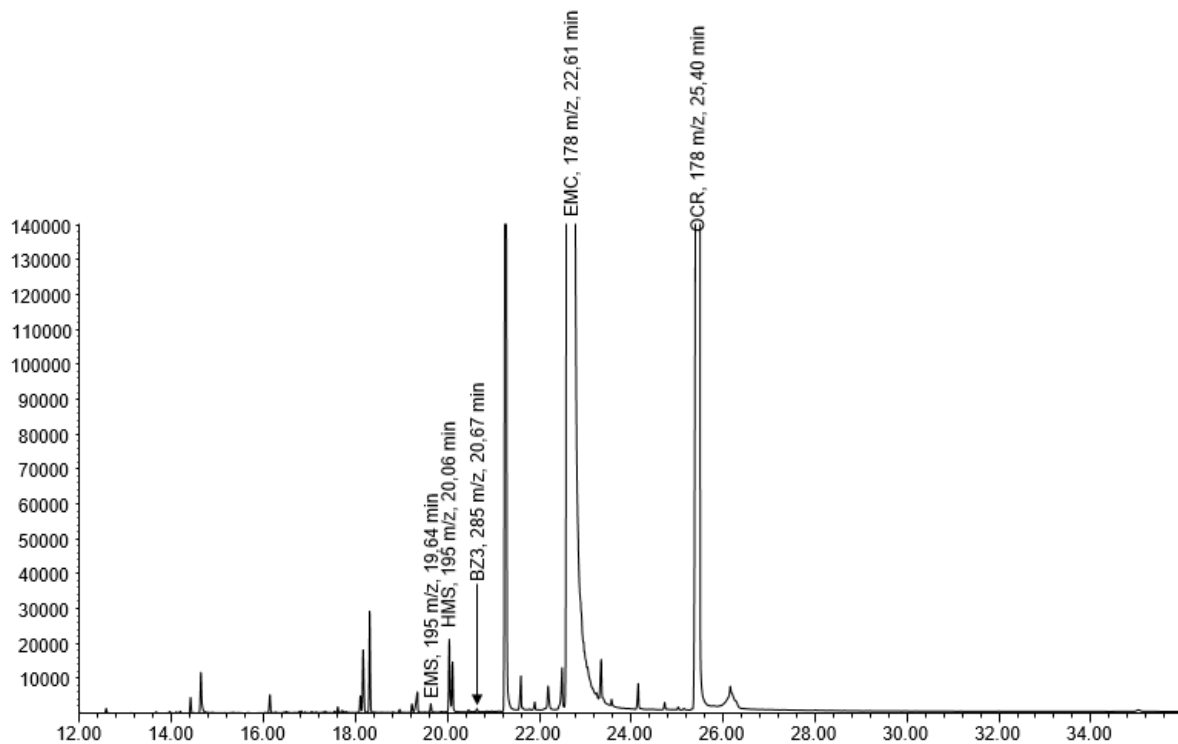
V 1. vzorku ASTRID (Obr. 32) a ve 2. vzorku LADIVAL (Obr. 36) je patrné, že octocrylen má největší zastoupení. Naopak ve 3. vzorku NovAge (Obr. 34) je vidět, že největší zastoupení patří 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamátu.



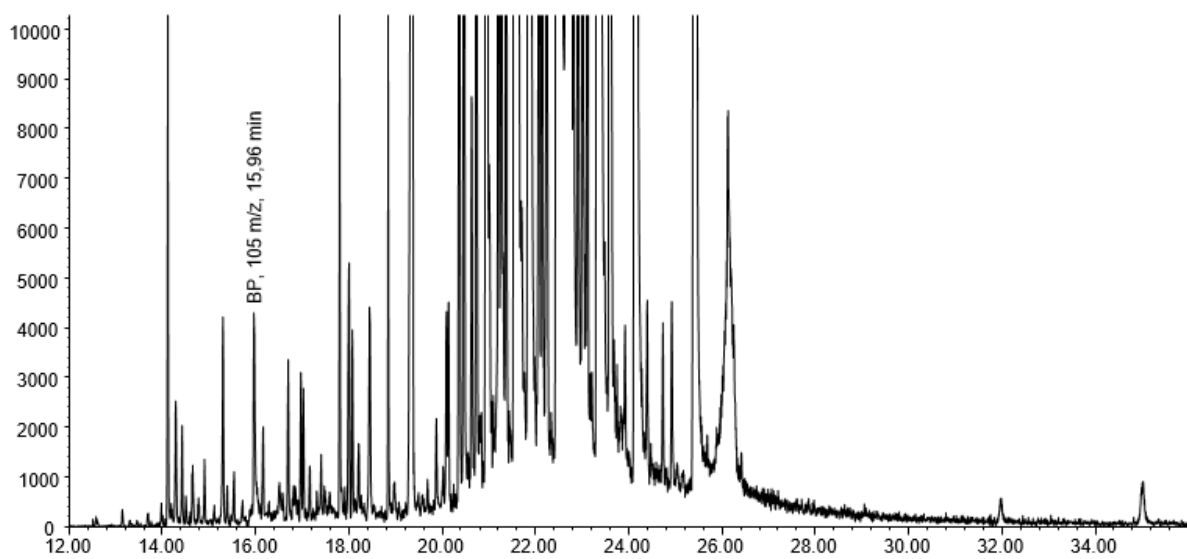
Obr. 32: Chromatogram vzorku krému ASTRID “(SIM 178, 195, 285 m/z)”.



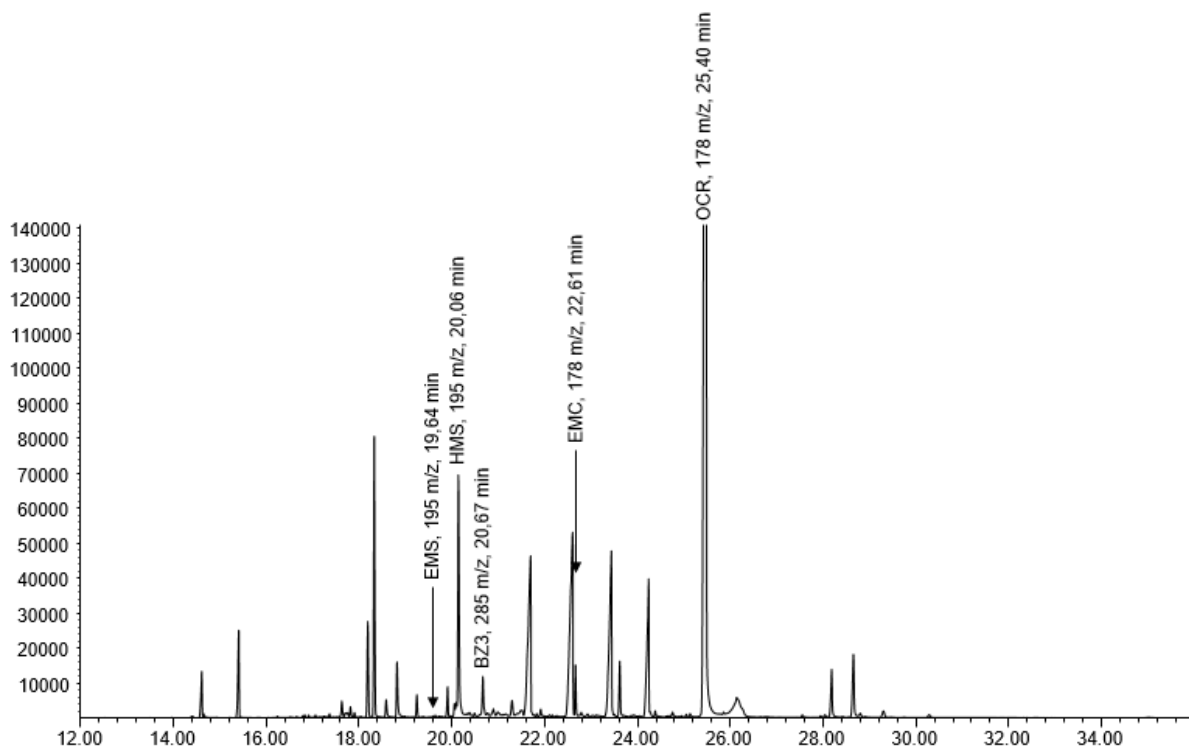
Obr. 33: Chromatogram vzorku krému ASTRID “(TIC, rekonstruovaný iontový chromatogram, 105 m/z, benzophenon)”.



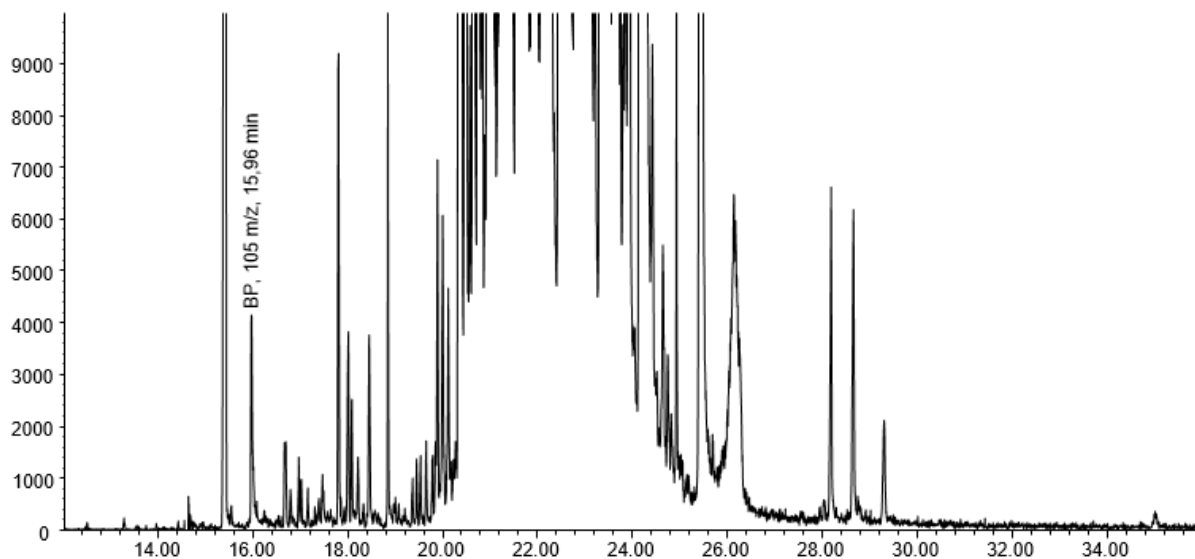
Obr. 34: Chromatogram vzorku denního krému NovAge ORIFLAME “(SIM 178, 195, 285 m/z)”.



Obr. 35: Chromatogram vzorku denního krému NovAge ORIFLAME “(TIC, rekonstruovaný iontový chromatogram, 105 m/z, benzophenon)”.



Obr. 36: Chromatogram vzorku krému LADIVAL “(SIM 178, 195, 285)”.



Obr. 37: Chromatogram vzorku krému LADIVAL “(TIC, rekonstruovaný iontový chromatogram, 105 m/z, benzophenon)”.

Identifikované UV látky ve vzorcích byly na závěr porovnávány s obsahy složení uvedených na originálních obalech všech 3 krémů (Tab.3).

Hlavní složkou, která byla prokázána ve 2 vzorcích krémů (Astrid a Ladival) byla přítomnost octocrylenu, a kromě toho byly zjištěny stopy oxybenzonu, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamátu, 2-ethylhexylsalicylátu, homosalatu a benzophenonu. Ve vzorku krému NovAge byla hlavní složkou prokázána přítomnost UV filtru 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamátu a kromě toho, byly zjištěny stopy octocrylenu, oxybenzonu, 2-ethylhexylsalicylátu, homosalatu a benzophenonu.

Tab. 7: Obsahy složení látek uvedených na originálních obalech krémů.

Název	Obsah složení		
UV látky	ASTRID	LADIVAL	NovAge
octocrylen	ano	ano	ano
benzophenon	ne	ne	ne
oxybenzon	ne	ne	ne
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamát	ano	ne	ano
2-ethylhexylsalicylát	ano	ne	ne
homosalat	ne	ne	ne

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo provést kvalitativní a kvantitativní analýzu šesti UV látek v reálných vzorcích vod a krémů s využitím metody plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem.

V experimentální části práce byly použity dva vzorky vody z veřejně přístupných bazénů z Chropyně a Přerova a jeden vzorek vody z přírodní rezervace ve Výklekách. Ve 2. experimentální části byly testovány vzorky ochranných krémů proti slunečnímu záření. V jednotlivých vzorcích (vod i krémů) byla prokázána přítomnost octocrylenu, benzophenonu, oxybenzonu, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnámatu, 2-ethylhexyl salicylátu a homosalatu. Z těchto uvedených látek je velmi nebezpečný oxybenzon, který je schopný akumulace v tkáních. Koncentrace jednotlivých látek se pohybovaly v desítkách až stovkách $\mu\text{g/l}$.

Znečištění vod těmito látkami může být způsobeno především lidskou činností. Avšak hladina UV filtrů např. ve vodách je relativně nízká ($\mu\text{g/l}$), což nemusí vést k nežádoucím účinkům. Otázkou ale zůstává, do jaké míry jsou kontaminovány např. podzemní vody či okolí kolem vody nebo do jaké míry je ovlivněn život vodních organismů popř. i další dopady na životní prostředí.

SUMMARY

The purpose of the diploma thesis was to perform qualitative and quantitative analysis of the six ultraviolet substances in real samples of the water and creams with using of gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The two samples of water from the publicly available pools from Chropyně and Přerov and one sample of water from a natural reserve in Výkleky were used in experimental part. In 2. experimental part of the work were tested samples of protective creams against sun exposure have been tested in the next part of the experimental section. In individual samples (water and creams) were proven the presence of the octocrylene, benzophenone, oxybenzone, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate, 2-ethylhexylsalicylate and homosalate. The concentrations of individual substances were in the tens to hundreds of $\mu\text{g/l}$.

The contamination of water by UV substances may be produce mainly by human activities. However, the level of UV filters, for example in the waters, is relatively low, which it may not lead to undesirable effects. But there is still important question about contamination of groundwater, the vicinity around water bodies and the life of aquatic organisms or the other impact on the environment.

LITERATURA

- [1] Z. Freitinger Skalická, Z. Hon, L. Navrátil: Biologický účinek ultrafialového záření. *Kontakt* 12 (2010) 480-486.
- [2] M. Miletín: Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření. *Praktické lékárenství* 7 (2011) 34-38.
- [3] M. R. Litvák: Jaký a jak silný je UV filtr na cestách?. *Dermatologie pro praxi* 9 (2015) 58-62.
- [4] A. Rajnochová Svobodová: Poškození kůže působením slunečního záření, možnosti ochrany a prevence. Univerzita Palackého Lékařská fakulta, Olomouc (2012).
- [5] E. A. Dutra, D. Almança, E. R. M. Kedor-Hackmann a M. I. R. M. Santoro: Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3 (2004) 381-385.
- [6] A. Lajčíková a L. Pekárek: UV záření a jeho vliv na zdraví. *Hygiena* 54 (2009) 57-61.
- [7] J. D'orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz a T. Scott: UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2013) 12222-12248.
- [8] E. S. Pérez: Efektivní fotoprotekce. *Praktické lékárenství* 8 (2012) 187-189.
- [9] D.L. Giokas, A. Salvador a A. Chisvert: UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 360-374.
- [10] M. Jirásková a L. Jirásková: Je opalování pro děti vhodné, nebo jim škodí?. *Pediatric pro praxi* 3 (2007) 150-153.
- [11] S. El-Boury, C. Couteau, L. Boulande, E. Paporis a L. J. M. Coiffard: Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection factor (SPF) determined by in vitro method. *International Journal of pharmaceutics* 340 (2007) 1-5.

- [12] S. M. Díaz-Cruz, M. Llorca a D. Barceló: Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 873-887.
- [13] L. C. Cefali, J. A. Ataide, P. Moriel, M. A. Foglio a P. G. Mazzola: Plant-based active photoprotectants for sunscreen. *International Journal of Cosmetics science* 38 (2016) 346-353.
- [14] M. E. Balmer, H. R. Buser, M. D. Müller a T. Poiger: Occurrence of some organic UV filters in wastewater in surface waters and in fish from Swiss lakes. *Environmental science & Technology* 39 (2005) 953-962.
- [15] P. Y. Kunz a K. Fent: Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217 (2006) 86-99.
- [16] D. D. Orsi, 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* 64 (2006) 509-515.
- [17] A. Salvador a A. Chisvert: Sunscreen analysis: A critical survey on UV filters determination. *Analytica Chimica Acta* 537 (2005) 1-14.
- [18] N. Serpone, D. Dondi a A. Albini: Inorganic and organic of UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta* 360 (2007) 794-802.
- [19] S. Ramos, V. Homem, A. Alves a L. Santos: Science of the total environment advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment - A review. *Science of Total Environment* 526 (2015) 278-311.
- [20] Epitesty, Hlavní ochranné sluneční UV filtry [online]. [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/index.php?inc=uvf>
- [21] S. Ramos, V. Homem, A. Alves a L. Santos: A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environment International* 86 (2016) 24-44.

- [22] E. B. Manaia, R. Cristina, K. Kaminski, M. A. Corrêa a L. A. Chiavacci: Inorganic UV filters. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences* 49 (2013) 201-209.
- [23] M- S. Díaz-Cruz a D. Barceló: Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 708-717.
- [24] M. H. A. Barel, M. Paye: *Handbook of Cosmetics Science and Technology*. Taylor & Francis, New York (2001).
- [25] M. Petrovajová a V. Hegyi: Čo nového vo fotoprojekcii? *Pediatrica pre prax* 15 (2014) 102-105.
- [26] J. Jiménez-Díaz, J. M. Molina, A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros a A. Navaló: Simultaneous determination of the UV-filters benzyl salicylate, phenyl camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 936 (2013) 80-87.
- [27] D. Dondi, A. Albini, M. Petrovajová a V. Hegyi: Interactions between different UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences* 5 (2006) 835-843.
- [28] In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-05-1].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Phenylbenzimidazole_sulfonic_acid
- [29] K. Ettlér: *Fotoprotekce kůže*. Triton, Praha (2004).
- [30] E. Pierrel, O Hamelin, T. Douki, S. Kieffer-Jaquinod, U. Mu a M. Ozei: Article Involvement of Mitochondrial Ferredoxin and Para-Aminobenzoic Acid in Yeast Coenzyme Q Biosynthesis. *Chemistry & Biology* 17 (2010) 449-459.
- [31] V. S. Ferreira a J. B. G. Trindade: Voltammetric analysis of sun-block preparations containing octocrylene and its association with 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyl methoxycinnamate. *Microchemical Journal* 106 (2013) 378-383.

- [32] Benzophenone. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-08-10].
Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Benzophenone>
- [33] Y. Zhang a H. K. Lee: Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1249 (2012) 25-31.
- [34] M. S. Díaz-Cruz, P. Gago-Ferrero, M. Llorca a D. Barcelo: Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Analytical and Bioanalytical chemistry* 402 (2012) 2325-2333.
- [35] N. Negreira, 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* 638 (2009) 36-44.
- [36] D. Dondi a A. Albini: Interactions between different UVB / UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection commercial suncreams and consequent loss of UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences* 5 (2006) 835-843.
- [37] L. R. Gaspar a P. M. B. G. Maia Campos: Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. *International Journal of Pharmaceutics* 307 (2006) 123-128.
- [38] U. En a F. Cosméticas: Evaluation of the avobenzone photostability in solvents used in cosmetic formulations. *Pharmaceutical Industry* 18 (2011) 63-71.
- [39] A. Salvador, J. R. Adell, A. Requeni a J. G. March: Analytical methodologies for atomic spectrometric determination of metallic oxides in UV sunscreen creams. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22 (2000) 301-306.

- [40] P. V. Végh: Opalování - navýsost aktuální téma. *Edukafarm news* 2 (2010) 1.
- [41] P. Z. Opekar, Z. Plzák, I. Jelínek a P. Rychlovský: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha (2010).
- [42] M. B. Tissue: *Basics of analytical chemistry and chemical equilibria*. Wiley, New Jersey (2013).
- [43] T. Horák, J. Čulík, M. Jurková, P. Čejka, V. Kellner, J. Dvořák a D. Hašková: Possibilities of utilization of modern sample preparation methods for gas chromatographic analysis of beverages and especially beer. *Kvasný průmysl* 56 (2010) 358-366.
- [44] W. Lin, H. Chen a W. Ding: Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1065 (2005) 279-285.
- [45] L. Nováková, M. Douša a kol.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Europrint, Praha (2013).
- [46] M. Mezcua, J. Hurtado, F. Mochol, A. R. Fern a A. Ag: Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography – tandem mass spectrometry in wastewater. *Talanta* 73 (2007) 314-320.
- [47] G. J. K. Ševčík: *Plynová chromatografie a její aplikace v organické analýze*. PŘF UK, Praha (2002).
- [48] P. Wojtowicz, H. Janečková, D. Friedecký a T. Adam: Techniky metabolomiky v biomedicině. *Chemické listy* 107 (2013) 3-11.
- [49] J. M. Halket, D. Waterman, A. M. Przyborowska, R. K. P. Patel a P. D. Fraser: Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC / MS and LC / MS / MS. *Journal of Experimental Botany* 56 (2005) 219-243.

- [50] Gass chromatography. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry
- [51] M. Staňková, P. Ondra a P. Kurka: Možnosti diagnostiky intoxikací antidepresiv. Chemické listy 101 (2007) 916-922.
- [52] J. Kalous a F. Renger: Analytická chemie I. Univerzita Pardubice, Pardubice (1998).
- [53] K. Volka a kol.: Analytická chemie II. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha (1995).
- [54] GC/MS [online]. [cit. 2016-10-26]. Dostupné z: <http://www.eag.com/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/>
- [55] A. J. Dean: Moderní metody v chemické laboratoři. Nakladatelství technické literatury, Praha (1974).
- [56] P. Klouda: Moderní analytické metody. Pavel Klouda, Ostrava (2003).
- [57] GC [online]. [cit. 2017-10]. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf
- [58] D. Friedecký a K. Lemr: Úvod do hmotnostní spektrometrie. Klinická biochemie a metabolismus 20 (2012) 152-157.
- [59] A. D. Skoog, F. J. Holler a T. A. Nieman: Principles of instrumental analysis. Saunders College Pub, Philadelphia (1998).
- [60] MS [online]. [cit. 2016-10]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS
- [61] MS [online]. [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/matejka/ACH2-02-MS.pdf>
- [62] E. Hoffmann a V. Stroobant: Mass spectrometry Principles and Applications. Wiley, England (2007).

- [63] GC/MS. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-10-30]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry
- [64] V. Lange, P. Picotti, B. Domon a R. Aebersold: Selected reaction monitoring for quantitative proteomics. *Molecular Systems Biology* 222 (2008) 1-14.
- [65] O. D. Sparkman, Z. Penton a F. Kitson. *Gas chromatography and mass spectrometry*. Academic Press, USA (2011).

SEZNAM ZKRATEK

BP - benzophenon

BSTFA – N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid

BZ3 – oxybenzon

CI – chemická ionizace

DAD – detektor s diodovým polem

EI – elektronová ionizace

EMC – 2-ethyhexyl 4-methoxycinnamát

EMS – 2-ethylhexylsalicylát

FDA – food and drug administration; úřad pro kontrolu léčiv a potravin

GC – plynová chromatografie

GC-MS – plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem

GLC – gas liquid chromatography; plynová rozdělovací chromatografie

GSC – gas solid chromatography; plynová adsorpční chromatografie

HMS – homosalat

IR – infračervené záření

LC – kapalinová chromatografie

LC-MS – kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem

LC-UV – kapalinová chromatografie s UV/VIS detektorem

LOD – limit detekce

MED – minimální erytémová dávka

MS – hmotnostní spektrometrie

NMSC – kožní nádor nemelanomového typu

OCR – octocrylen

IT – iontová past

RTG - rentgenové záření

SIM – selective ion monitoring; selektivní monitorování iontů

SPF – sun protection factor; solární protektivní faktor

TIC – total ion current; celkový iontový proud

TOF – time of flight, analyzátor doby letu

UV – ultrafialové záření

UVA – pásmo A v ultrafialovém záření

UVB – pásmo B v ultrafialovém záření

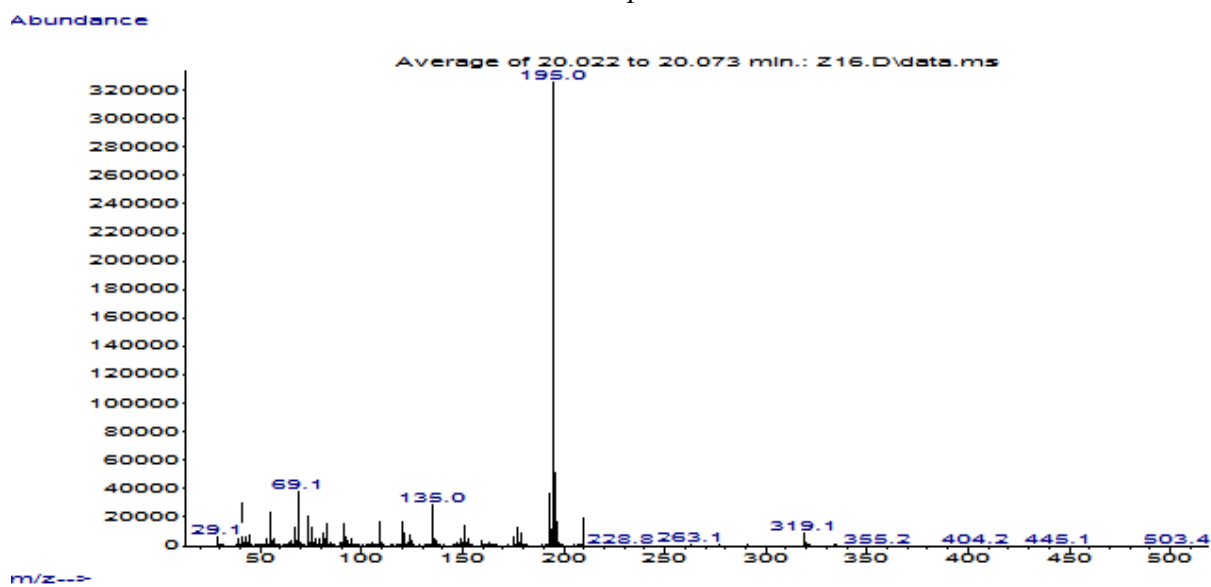
UVC – pásmo C v ultrafialovém záření

VIS – viditelné záření

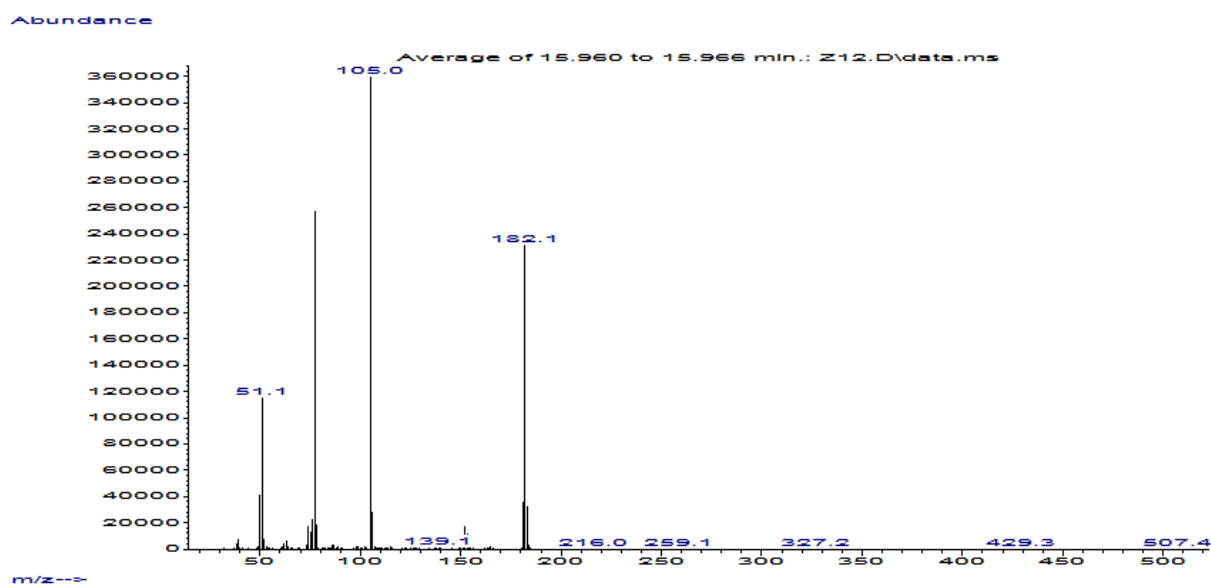
λ – vlnová délka

PŘÍLOHY

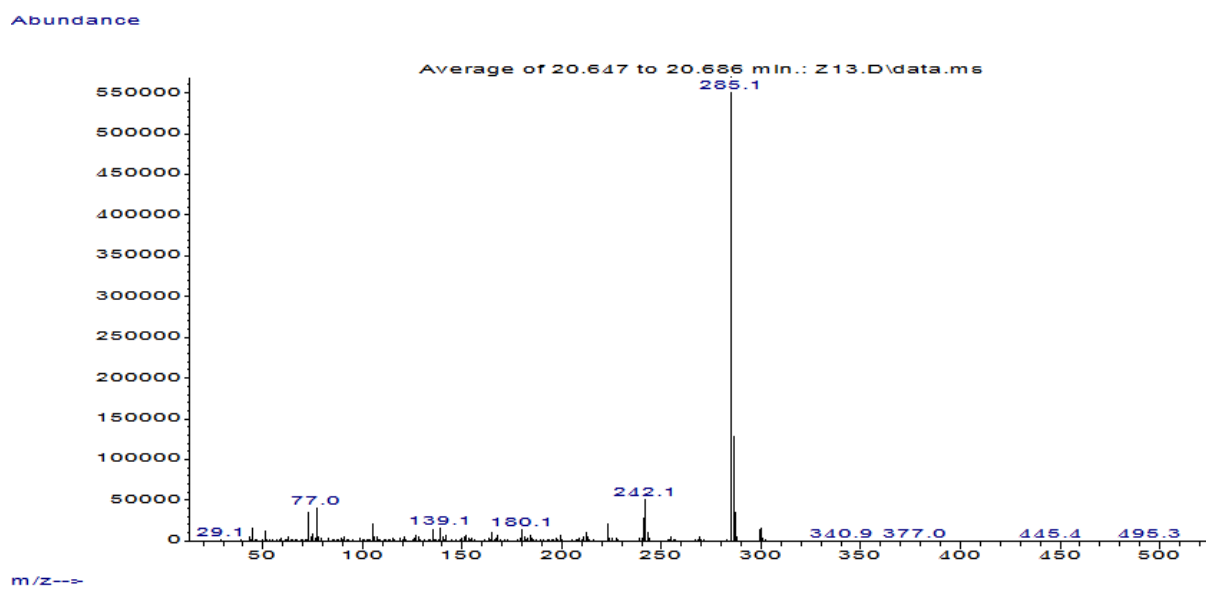
1. Hmotnostní spektrum: OCTOCRYLEN



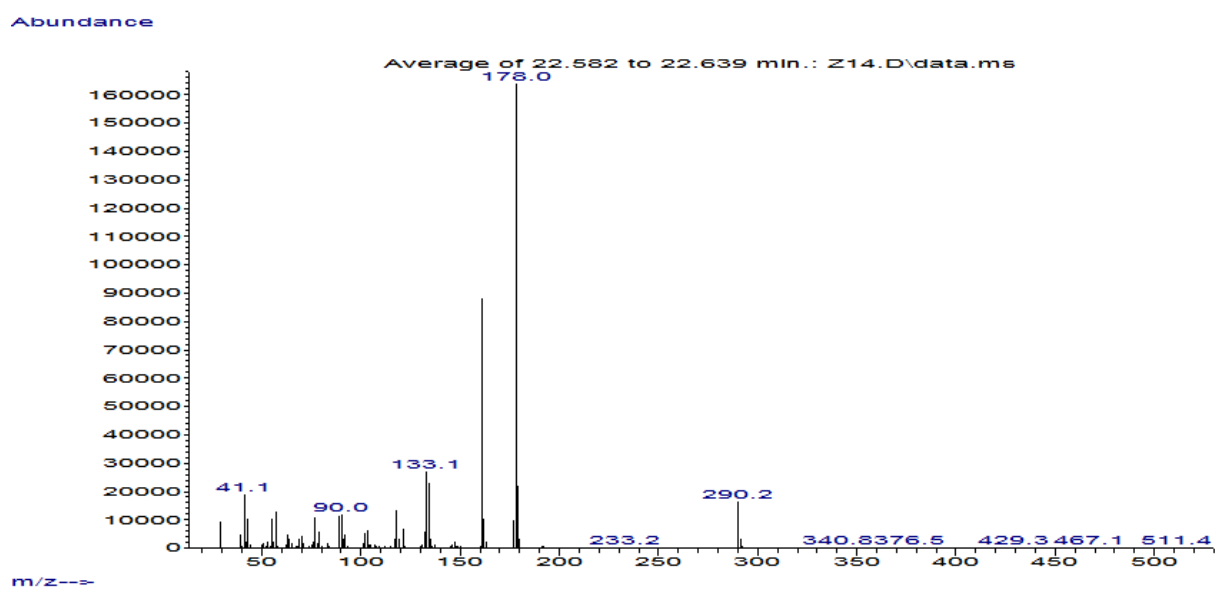
2. Hmotnostní spektrum: BENZOPHENON



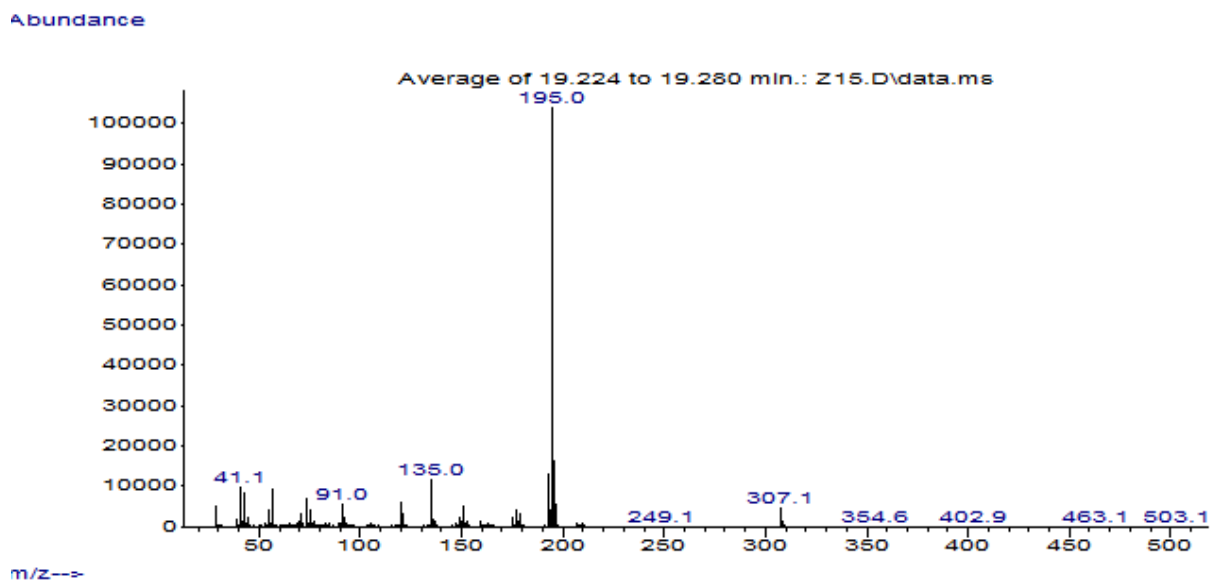
3. Hmotnostní spektrum: OXYBENZON



4. Hmotnostní spektrum: 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamát



5. Hmotnostní spektrum: 2-ethylhexylsalicylát



6. Hmotnostní spektrum: HOMOSALAT

