

Nano-ingredientie v prostředcích na slunění

Bc. Markéta Jančíková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta JANČÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T08840**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**

Téma práce: **Nano ingredience v prostředcích na slunění**

Zásady pro vypracování:

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Provedte literární rešerži na dané téma.
2. Pojednejte o významu fotoprotekce a zaměřte se na anorganické UV filtry.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

1. Provedte dermální absorpci emulzních zinkových bělob metodou in vitro.
2. Vhodnými metodami provedte stanovení obsahu zinku v daných preparátech.
3. Výsledky diskutujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

S.S. Sahu, D.A. Casciano:Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks,2009, ISBN:978-0-47074-137-5

M.L.Schlossman:The chemistry and manufacture of cosmetics III. - ingredients, 2002, ISBN: 0-931710-77-4

V.Rogiers, M.Pauwels:Safety assessment of cosmetics in Europe,2008, ISBN:978-3-8055-8655-9

S.Schliemann, P.Elsner:Skin protection.Practical applications in the occupational setting,2007,ISBN-10:3-8055-8218-8

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Hana Bendová**
SZÚ Praha

Datum zadání diplomové práce: **22. února 2010**

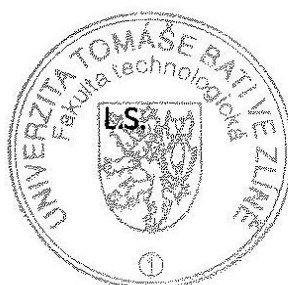
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2010**

Ve Zlíně dne 22. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

děkan



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.

ředitel ústavu

ABSTRAKT

Práce je v první části věnována stanovení dermální absorpce emulzních zinkových bělob různých typů, ve kterých je ZnO rozptýlen ve formě nanočástic metodou in vitro. S použitím nanočástic v prostředcích na slunění totiž roste obava potenciálního rizika na lidské zdraví a i když v současné době není ZnO v seznamu povolených UV filtrů, jedná se o jeho schválení. Ve druhé části je práce zaměřena na stanovení zinku penetrovaného do kůže metodou AAS a ověření možnosti aplikace spektrofotometrického stanovení zinku vybranou metodikou. Principem této metody je barevná reakce zinku s xylenolovou oranží za vzniku komplexu, který je stabilizován kationaktivním tenzidem v prostředí pH 5,5. V případě použití modelových vzorků lze tvrdit, že aplikovaná metodika spektrofotometrického stanovení je pro kosmetické prostředky obsahující tukovou složku vhodná. Co se týče vzorků získaných dermální absorpcí, byly hodnoty získané spektrofotometrickou metodou vyšší než v případě AAS, což bude předmětem dalšího zkoumání. Ze získaných výsledků však lze konstatovat, že zinek nepenetruje níže než do rohové vrstvy a tato vrstva kůže tak plní svou bariérovou funkci.

Klíčová slova: oxid zinečnatý, nanočástice, dermální absorpce, spektrofotometrické stanovení

ABSTRACT

This thesis is in the first part focused on assessment of dermal absorption of emulsive Zinc whites of different types, in which ZnO is dispersed in the form of nanoparticles, using an in vitro method. The inclusion of nanoparticles in sunscreens increases the concern of possible hazards for human health, and although currently ZnO is not included in the list of approved UV filters, the process of its approval is under way. The second parts of this work is aimed on Zinc penetration into skin determined by AAS method and on the possibility to apply new methodology based on spectrophotometry. The principle of this method is a color reaction between Zinc and xylenol orange, resulting in a complex stabilize by a cationic surfactant at pH 5,5. In case of the model samples, the applied spectrophotometric methodology seems to be acceptable for cosmetic products containing fatty components. In case of samples obtained from dermal absorption, the spectrophotometric method provided higher values than ASS. This result will be studied further in the future. The results suggest, that Zinc is not penetrating deeper than into the horny layer, which fulfills its barrier function.

Keywords: zinc oxide, nanoparticles, dermal absorption, spectrophotometric determination

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Haně Bendové za odborné vedení, dále pak doc. Ing. R. Janišovi, CSc., za cenné rady, připomínky a názory. Mé poděkování patří i paní Věře Zbrankové z Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí UTB za měření AAS a Ing. Věře Kašpárkové z Centra polymerních materiálů FT za proměření velikosti částic ZnO u předložených zinkových bělob. Dále všem ostatním, kteří se podíleli na této práci a v neposlední řadě své rodině a blízkým za jejich podporu.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 FOTOPROTEKCE	13
1.1 UMĚLÁ FOTOPROTEKCE	14
1.1.1 Organické UV filtry.....	15
1.1.2 Anorganické UV filtry.....	16
1.2 HODNOCENÍ BEZPEČNOSTI UV FILTRŮ.....	18
2 NANOTECHNOLOGIE	20
2.1 CHARAKTERISTIKA NANOMATERIÁLŮ A JEJICH NEBEZPEČÍ	20
2.1.1 Gastrointestinální trakt (GIT).....	27
2.1.2 Inhalace	27
2.1.3 Kůže	28
2.2 NANOČÁSTICE V PROSTŘEDCÍCH NA SLUNĚNÍ.....	29
2.2.1 Oxid titaničitý.....	30
2.2.2 Oxid zinečnatý.....	31
2.3 ODHAD RIZIKA NANOMATERIÁLŮ	32
3 METODY STANOVENÍ	34
3.1 STANOVENÍ DERMÁLNÍ ABSORPCE KOSMETICKÝCH PŘÍŠAD METODOU IN VITRO	34
3.1.1 Princip metody	35
3.2 METODY STANOVENÍ ZINKU	37
4 CÍL PRÁCE	41
II PRAKTICKÁ ČÁST	42
5 DERMÁLNÍ ABSORPCE METODOU IN VITRO	43
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE.....	43
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	43
5.3 METODIKA	43
6 CHEMICKÉ STANOVENÍ ZINKU	47
6.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE.....	47
6.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	47
6.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ ZINKU	47
6.3.1 Příprava reagensí.....	48
6.3.2 Příprava modelových vzorků.....	48
6.3.3 Příprava vzorků získaných dermální absorpcí.....	49
6.3.4 Kalibrační křivka.....	50
6.4 STANOVENÍ ZINKU METODOU AAS.....	51
6.4.1 Mineralizace zinkových bělob.....	51

6.4.2	Stanovení modelových vzorků	51
6.4.3	Stanovení vzorků získaných dermální absorpcí	51
7	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC OXIDU ZINEČNATÉHO A JEJICH DISTRIBUCE	52
8	VÝSLEDKY A DISKUSE	53
8.1	KALIBRACE	53
8.1.1	Stanovení koncentrace modelových vzorků	56
8.2	METODIKA HYDROLÝZY ZINKOVÝCH BĚLOB	57
8.2.1	Stanovení zinkové běloby s izopropylalkoholem	58
8.2.2	Stanovení zinkové běloby s toluenem	59
8.3	STANOVENÍ ZINKU V ZINKOVÝCH BĚLOBÁCH	60
8.4	ROZDÍL MEZI STANOVENÍM ZINKU METODOU AAS A SPEKTROFOTOMETRIÍ	61
8.5	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC ZNO A JEJICH DISTRIBUCE	63
8.6	VÝSLEDKY VZORKŮ DERMÁLNÍ ABSORPCE	64
8.6.1	Porovnání analýz	70
	ZÁVĚR	73
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK	88
	SEZNAM PŘÍLOH	89

ÚVOD

Je všeobecně známo, že sluneční záření má negativní vliv na lidské zdraví, díky UV záření, které může vyvolat vznik rakoviny kůže. Rakovina kůže v současné době patří mezi nejčastěji se vyskytující civilizační onemocnění. Je tedy nutné se před tímto zářením chránit. Účinné opatření zajišťuje použití prostředků na slunění.

Přítomnost nano ingrediencí v těchto prostředcích však zvyšuje obavu z možných nežádoucích účinků na lidské zdraví, z důvodu jejich pravděpodobnější penetrace kůží. Je proto velmi důležité porozumět jejich chování v biologických systémech, znát jejich vlastnosti a zajistit jejich bezpečnost.

I přes zájem výzkumných týmů je však stále nedostatek informací týkající se identifikace potenciálních zdravotních rizik spojených např. s expozicí nebo vlastnostmi nanočástic. S tím souvisí i požadavek vládních i nevládních organizací, v reakci na rostoucí význam nanotechnologií, o přísnější kritéria při hodnocení bezpečnosti nanomateriálů.

Většina testů, kterými jsou hodnoceny nanomateriály, se v posledních letech provádějí na buněčných kulturách. Nicméně výsledky těchto studií jsou zavádějící, a proto je potřeba validovat tyto metody s metodami prováděnými na zvířatech.

Velká pozornost, odborníků a veřejnosti je věnována problematice nanomateriálů. Z tohoto důvodu je práce zaměřena na stanovení penetrace oxidu zinečnatého ve formě nano, který je používán v kosmetických prostředcích ke slunění.

Informace o penetraci kůží slouží jako jeden z podkladů pro zhodnocení bezpečnosti nejen příslušných ingrediencí, ale i finálního výrobku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FOTOPROTEKCE

Na zemský povrch dopadá sluneční záření o vlnové délce v rozsahu od 280 nm (oblast ultrafialového záření) do 2500 nm (pásmo infračerveného záření). Až 45 % připadá infračervenému záření, 50 % záření viditelnému a zbývající část, tedy 5% ultrafialovému záření.

A přesto, že ultrafialové (UV) záření tvoří pouhých 5% z celkového slunečního záření, je odpovědné za nežádoucí účinky na lidské zdraví. Může vyvolat jak akutní (zánět, opálení, imunologické změny a hyperplazie), tak chronické (stárnutí a fotokarcinogeneze) poškození kůže [1].

Podle vlnové délky [2] se UV záření dělí na UVC (200- 290 nm), které je pohlceno atmosférou a na zemský povrch nedopadá, dále UVB (290 – 320 nm) a UVA (320 -400 nm), které je často dále děleno na UVA₂ (320 – 340 nm) a UVA₁ (340-400 nm). Jeho intenzita není stálá. Mění se v závislosti na ročním období, denní době, zeměpisné šířce, nadmořské výšce, apod. Za více rizikové, z hlediska ohrožení lidského zdraví, je považováno UVB záření. Akutní expozice tomuto záření se projevuje zánětem, jehož projevem je sluneční erytém (zarudnutí pokožky), otok, pálení a bolest. Je mu také přisuzována zodpovědnost za vývoj a vznik rakoviny kůže, což je spojeno s nadměrným a dlouhodobým sluněním a schopností organismu celoživotní kumulace UV záření. Pigmentace a aktinické stárnutí kůže (neboli sluneční elastóza) je vyvolána UVA složkou záření. Hovoří se o ní také jako o pravděpodobném faktoru, podporujícím vznik rakoviny kůže [2].

Pohlcení fotonů UV záření různými chromofory (látky schopné absorbovat UV záření), které jsou přirozenou součástí kůže, např. lipidy, melanin, DNA, RNA, voda, vonné aminokyseliny jako thyrosin, má za následek různé fotobiologické a fotochemické procesy, které mohou být sekundárně umocněny vznikem reaktivních kyslíkatých sloučenin. Jde o děje, které jsou pro člověka škodlivé, a jak již bylo řečeno výše, rozsah poškození závisí na vlnové délce záření. Zvláště pyrimidiny kožních DNA buněk podléhají různým fotochemickým modifikacím, za vzniku cyklobutanových thyminových dimerů, adičních sloučenin a dalších sloučenin [3]. V literatuře se uvádí [1], že již po 1- 3 hodinách po ozáření UVB složkou záření je snížena syntéza DNA, RNA i bílkovin. Díky specifickým enzymům se již po 24 hodinách od expozice syntéza bílkovin, RNA i DNA vrací zpět do původního stavu. Existuje však riziko mutace DNA kožních buněk v případě dlouhodobého a častého slunění. Jedná se např. o změny v replikaci DNA či smrti buňky díky přítomnosti mutage-

nu. Tyto změny mohou být přeneseny na potomstvo při mitóze buněk [3]. Světová zdravotnická organizace (WHO) [4] navíc varuje, že vystavení dětí UV záření s sebou nese vyšší riziko vzniku a vývoji rakoviny kůže v pozdějším věku, než je tomu u dospělých. Díky těmto faktům WHO nedoporučuje, aby děti mladší 6 měsíců byly vystavovány slunečnímu záření.

Z důvodu prokazatelných škodlivých účinků UV záření Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila sluneční záření mezi lidský karcinogen [5]. Dále pak ve spolupráci se Světovou zdravotnickou organizací (WHO) reagovala na celosvětový rostoucí trend výskytu rakoviny kůže nabádáním veřejnosti k ochranným opatřením proti tomuto záření. Lidé by se podle WHO měli vyvarovat polednímu slunci, nosit ochranný oděv, pokrývku hlavy, sluneční brýle a neměli by zapomínat na použití vhodných prostředků na ochranu proti slunečnímu záření [6].

1.1 Umělá fotoprotekce

Ačkoli je kůže do jisté míry schopna se před UV zářením chránit sama zesílením epidermis (hyperplazií) či pigmentací, patří umělá fotoprotekce k neodmyslitelnému ochrannému opatření [1]. Umělou fotoprotekci zajišťují i prostředky ke slunění, které jsou považovány za nejefektivnější. Jejich účinnost je dána obsahem účinných složek, které se nazývají UV filtry. Mohou být jak organické tak anorganické povahy a liší se od sebe svým mechanismem působení. Pro zajištění vyšší účinnosti a širokospektrální ochrany, jsou v prostředcích na slunění zakomponovány oba zmiňované typy UV filtrů [7].

Dle nového nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) ze dne 24. března 2009 je filtrem UV záření látka, která je výhradně nebo převážně určena k ochraně kůže před určitým ultrafialovým zářením prostřednictvím absorpce (organické látky, tzv. chemické filtry), odrazu nebo rozptýlení (anorganické látky, tzv. fyzikální blokátory) tohoto záření. V Evropské unii je použití aktivních ingrediencí (UV filtrů) v prostředcích ke slunění upraveno Směrnicí 76/768/EHS, která je do právního řádu České republiky převedena vyhláškou č. 448/2009 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky. V USA a Kanadě jsou opalovací prostředky klasifikovány jako léčiva. Jsou na ně kladeny přísnější požadavky a spadají pod kontrolu zdravotních ústavů. V USA jde o Úřad pro kontrolu potravin a léků (FDA), v Kanadě přímo o Ministerstvo zdravotnictví. [8].

1.1.1 Organické UV filtry

Organické filtry jsou látky, které jsou schopny chránit před UV zářením pouze absorpcí. Jsou účinné v určitém rozmezí vlnových délek. Podle toho jsou také děleny na UVA, UVB absorbenty a širokospektrální UVA/UVB absorbenty [9]. Z důvodu sjednocení názvů veškerých kosmetických přísad, tedy i UV filtrů, vydala Evropská komise rozhodnutí 26/257/ES, kterým byla zavedena společná nomenklatura přísad používaných v kosmetických prostředcích (INCI - International nomenclature of cosmetic ingredients), tedy názvosloví, podle kterého musí být uvedeny názvy ingrediencí na obalech kosmetických prostředků. Konkrétní názvy dle INCI nomenklatury zmíněných organických filtrů jsou uvedeny na konci strany pod čarou. UVB absorbenty jsou běžně používány už po desetiletí, zatímco většina UVA a širokospektrálních filtrů byla vyvinuta v posledních letech, z důvodu nutného zvýšení ochrany před UVA složkou záření. Mezi UVA absorbenty patří např. avobenzon, známý pod názvem Parsol (1978). Velmi rozšířeny jsou také nedávno vyvinuté deriváty kafru. Mezi nejstarší komerčně dostupné UVB absorbenty patří salicyláty. Kyselina p – aminobenzoová (PABA), která byla velmi oblíbená, však již nepatří do seznamu povolených UV filtrů, používají se pouze její deriváty a to PEG- 25 PABA a octyl dimethyl PABA. Rostoucí potřeba širokospektrální ochrany vedla k vývoji nových filtrů, které dokonce vykazují lepší fotostabilitu. Jde o Tinosorb M (methyl-bis-benzothiazolyl tetramethylbutylfenol), Tinosorb S (anisothiazin) a již zmíněné deriváty kafru (MexorylXI, Mexoryl SD) [10]. Některé organické filtry, jako např. benzofenony mohou způsobovat fotoalergické kontaktní alergie [11].

Názvy organických UV filtrů dle INCI názvosloví jsou zvýrazněny tučným písmem

*Sulisobenzonene sodium : **benzophenone- 5***

*Octyl dimethyl PABA(Padimate O) : **Ethylhexyl dimethyl PABA***

*Ethoxylated ethyl – 4 - aminobenzoate : **PEG – 25 PABA***

*Avobenzon : **Butyl methoxydibenzoylmethan***

*Tinosorb S (Bemotrizinol) : **bis – ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl***

*Tinosorb M (Bisotrizole): **Methylene bis – triazolyl tetramethylphenol***

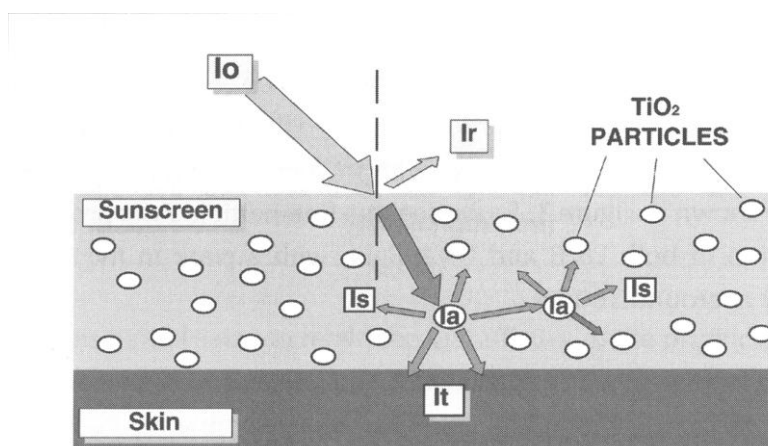
*Mexoryl XI : **Drometrizole trisiloxane***

*Mexoryl SD: **3-Benzylidene camphor***

1.1.2 Anorganické UV filtry

Jako anorganický filtr, se v prostředcích ke slunění používá oxid titaničitý (TiO_2). Ochranné účinky před škodlivým působením UV záření vykazuje i oxid zinečnatý (ZnO), který však není na seznamu povolených UV filtrů pro kosmetické prostředky. Kombinací obou těchto oxidů se však docílí širokospektrální ochrany [2,3], přičemž ZnO se ukázal být lepším blokátorem v oblasti UVA, včetně UVA_1 (380 nm). TiO_2 je účinnější v oblasti UVB a UVA_2 [12]. Oba tyto filtry jsou kromě kosmetického hojně využívány i v jiných průmyslových odvětvích, nejvíce však jako bílé pigmenty. I řada jiných anorganických materiálů, jako například oxid železitý nebo nitrid boru vykazují schopnost chránit kůži před UV zářením, jako fotoprotektivní látka se však nepoužívají, jelikož jsou jen málo účinné [13]. Mezi takové látky patří např. oxid vápenatý legovaný cerem.

Jak bylo zmíněno již v kapitole 1.1, anorganické filtry, tedy fyzikální blokátory, jsou schopny zmírnit prostup záření rohovou vrstvou kombinací odrazu, rozptylu I_s a dokonce i částečnou absorpcí I_a . Nezadržené záření I_r těmito blokátory je kůži dále šířeno. Na obr. 1 jsou dle Hewitta [13] ukázány procesy, ke kterým dochází při dopadu slunečního záření I_0 na kůži chráněnou filmem s obsahem TiO_2 .



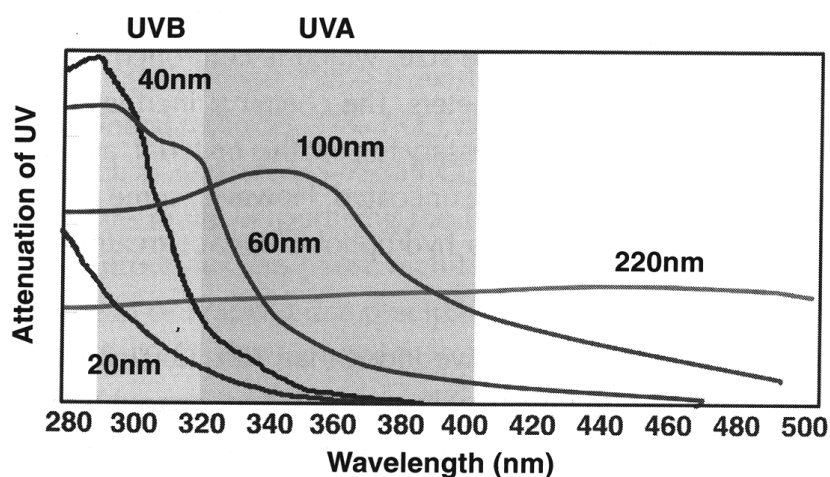
Obr. 1. Mechanismus účinku TiO_2

Jak je z obrázku patrné, z povrchu rohové vrstvy je odraženo asi 4% dopadajícího záření. Jde o proces, ke kterému dochází i v případě, že pokožka není chráněna žádným prostředkem na slunění. Převážná část, tedy 96% záření kůži prochází. Pro zajištění co nejlepší ochrany je tedy potřeba maximalizovat procesy absorpce, rozptylu i odrazu [13].

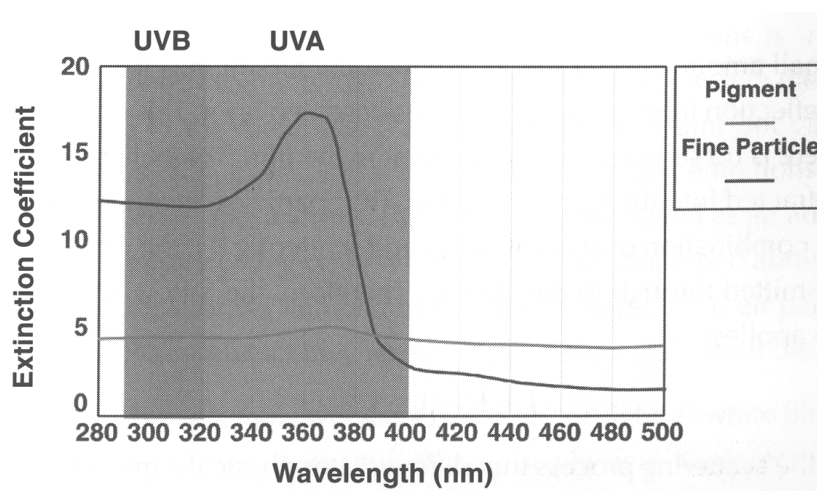
Anorganické UV filtry nepůsobí nepříznivě na pokožku díky jejich biologické netečnosti. Jsou fotostabilní, netoxické a nereagují s organickými složkami v receptuře výrobku [2].

Zůstávají na povrchu pokožky, zatímco organické filtry prostupují do rohové vrstvy. Jsou tedy účinnější [2,8]. Problém však může způsobovat průkaz fotoreaktivity v případě TiO_2 [11]. Zamezení fotoreaktivních pochodů je docíleno ochranným nátěrem (dimethicon, křemen), který je stabilní během výroby i při aplikaci na kůži [3,12]. V případě prostředku na slunění s vyšším slunečním ochranným faktorem (SPF – sun protection factor) jak 30 je nutné použít kombinace s organickými filtry, jelikož dosažení ochrany za použití pouze anorganických filtrů není možné. Významná nevýhoda anorganických filtrů spočívá v zanechání matného vzhledu na kůži po aplikaci, což je kosmeticky nepřijatelné. TiO_2 navíc zanechává bělejší vzhled než ZnO , což je způsobeno jeho vyšším indexem lomu (2,6 TiO_2 – 1,9 ZnO). Snižováním velikosti částic se však transparentnost i účinnost UV filtrů zvyšuje [12].

Na obr. 2 je dle Hewitta [13] znázorněna účinnost UV filtrů TiO_2 při různých vlnových délkách v závislosti na velikosti částic TiO_2 . Obr. 3, který je přebrán od Hewitta [13] zobrazuje účinnost pigmentu ZnO o běžně dostupné velikosti a jemně namletých částic.



Obr. 2. Účinnost částic TiO_2 při různých vlnových délkách



Obr. 3. Účinnost pigmentu a jemných částic ZnO při různých vlnových délkách

V případě TiO_2 je dle Hewitta [13] dosaženo dobré transparentnosti, ochrany jak před UVA i UVB zářením při dosažení optimální velikosti částic mezi 40 - 60 nm. Pro dokonalou transparentnost je možné snížit velikost částic až k 20 nm. Takto malé částice však mají přirozenou schopnost aglomerace. I z tohoto důvodu je používán ochranný nátěr např. dimethiconem nebo křemenem. Velikost částic ZnO, které jsou schopny snížit dopad UV záření, se pohybují v rozmezí 40 – 100 nm. Jak je patrné z obrázku č. 3, jemně namleté částice mají maximální účinnost při vlnové délce 360 nm.

O anorganických filtrech se hovoří v souvislosti s potenciálními zdravotními riziky, v případě použití těchto filtrů v nano- formě. V dalších kapitolách mé diplomové práce se tedy budu věnovat této problematice.

1.2 Hodnocení bezpečnosti UV filtrů

Látky sloužící jako UV filtry by obecně měly být netoxické, nedráždivé, voděodolné, tepelně i fotostabilní, snadno aplikovatelné, bezbarvé, bez chuti a zápachu. Nesmí způsobovat kontaktní alergie a zároveň musí zajišťovat ochranu po celou dobu expozice na slunci. Musí také být na kůži stabilní, aby nedocházelo vlivem UV záření k rozkladným produktům filtru. Nejdůležitější je však jejich bezpečnost. K tomu, aby mohly být schváleny a jako bezpečné použity do receptury, musí splňovat velmi přísné požadavky např. na akutní toxicitu, chronickou a subchronickou toxicitu, dráždění, genotoxicitu, fototoxicitu, reprodukční toxicitu, fotogenotoxicitu, karcinogenitu a v případě USA a Kanadě i fotokarcinogenitu [8]. Bezpečnost filtrů je zjišťována pomocí metod in vivo a in vitro. Jednou z in

vitro metod je i hodnocení bezpečnosti kosmetických ingrediencí dermální absorpcí [14]. K tomuto účelu v březnu 2006 vydal Výbor pro kontrolu spotřebního zboží (SCCP- Scientific committee on consumer products) stanovisko k Základním kritériím pro in vitro hodnocení dermální absorpce kosmetických přísad (SCCP/0970/06) [15]. Cílem této metody je získat kvalitativní a kvantitativní informace o látkách, které mohou být přítomny v lidské kůži, popř. proniknout do lidského těla (touto metodou se budu zabývat v kapitole 3.1 a experimentální části) [14,15]. Množství prošlých látek se poté bere v úvahu při výpočtu hranice bezpečnosti (MoS- Margins of Safety) spolu s použitím výsledků toxikologických testů, a to toxicitě po opakované dávce, jejímž výsledkem je hodnota NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) [15]. Ingredience je považována za bezpečnou, pokud hodnota MoS je vyšší než 100 [16]. Kromě dermální absorpce jsou prováděny i další testy, např. na nepřítomnost potenciálu dráždivosti ingrediencí a finálních kosmetických prostředků [8]. Ke konečnému vyhodnocení bezpečnosti kosmetických prostředků slouží návod SCCP (SCCP/0690/03), jehož 6. revidované vydání vyšlo v roce 2006, o Zkoušení kosmetických ingrediencí a hodnocení jejich bezpečnosti [16].

Prostředky ke slunění musí být bezpečné nejen při použití spotřebiteli, ale i pro životní prostředí, do kterého přecházejí při běžném a obvyklém způsobu používání [3].

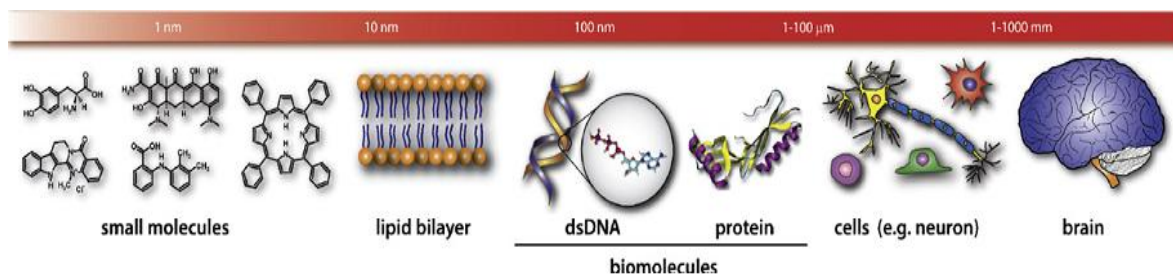
Hranice bezpečnosti je hodnocení rizika toxikologických účinků kosmetické ingredience při definované expozici a dávce. Tato hodnota určuje, s jakou jistotou lze tvrdit, že systémová expoziční dávka (SED – systemic exposure dose) dané kosmetické ingredience je při aplikaci bezpečná. MoS je tedy specifický faktor „nejistoty“, používaný při hodnocení ingrediencí používaných v kosmetických prostředcích. Při tomto hodnocení je využíváno výsledků toxicity po opakované dávce, a to hodnot NOAEL (no-observed – adverse – effect - level). NOAEL označuje dávku testované látky, při které ještě nebyl pozorován toxický účinek.

2 NANOTECHNOLOGIE

Nanotechnologie je obecný termín pro velké množství různých vědeckých disciplín, které se zabývají vývojem a využitím materiálů v nano-rozměrech. Současné aplikace nanotechnologií zahrnují obory, jako jsou např. strojírenství, medicína, potravinářský, textilní a kosmetický průmysl i sportovní odvětví, atd [17]. Snižování velikosti materiálů pod určitý limit má za následek objevení buď nových, nebo změněných vlastností materiálu. Nanotechnologie, i když jsou již široce užívány, otevírají mnoho nových možností. Na druhou stranu přinášejí i potenciální rizika pro lidské zdraví i možné negativní dopady na životní prostředí. Nanotechnologie jsou tudíž předmětem velkého zájmu jak odborné veřejnosti, tak různých organizací [18]. Jedná se např. o FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léků USA), BfR (Spolkový institut pro odhad rizika, Německo), TGA (Státní ústav pro kontrolu léčiv, Austrálie), Vědecká společnost národní akademie věd (Velká Británie) a další.

2.1 Charakteristika nanomateriálů a jejich nebezpečí

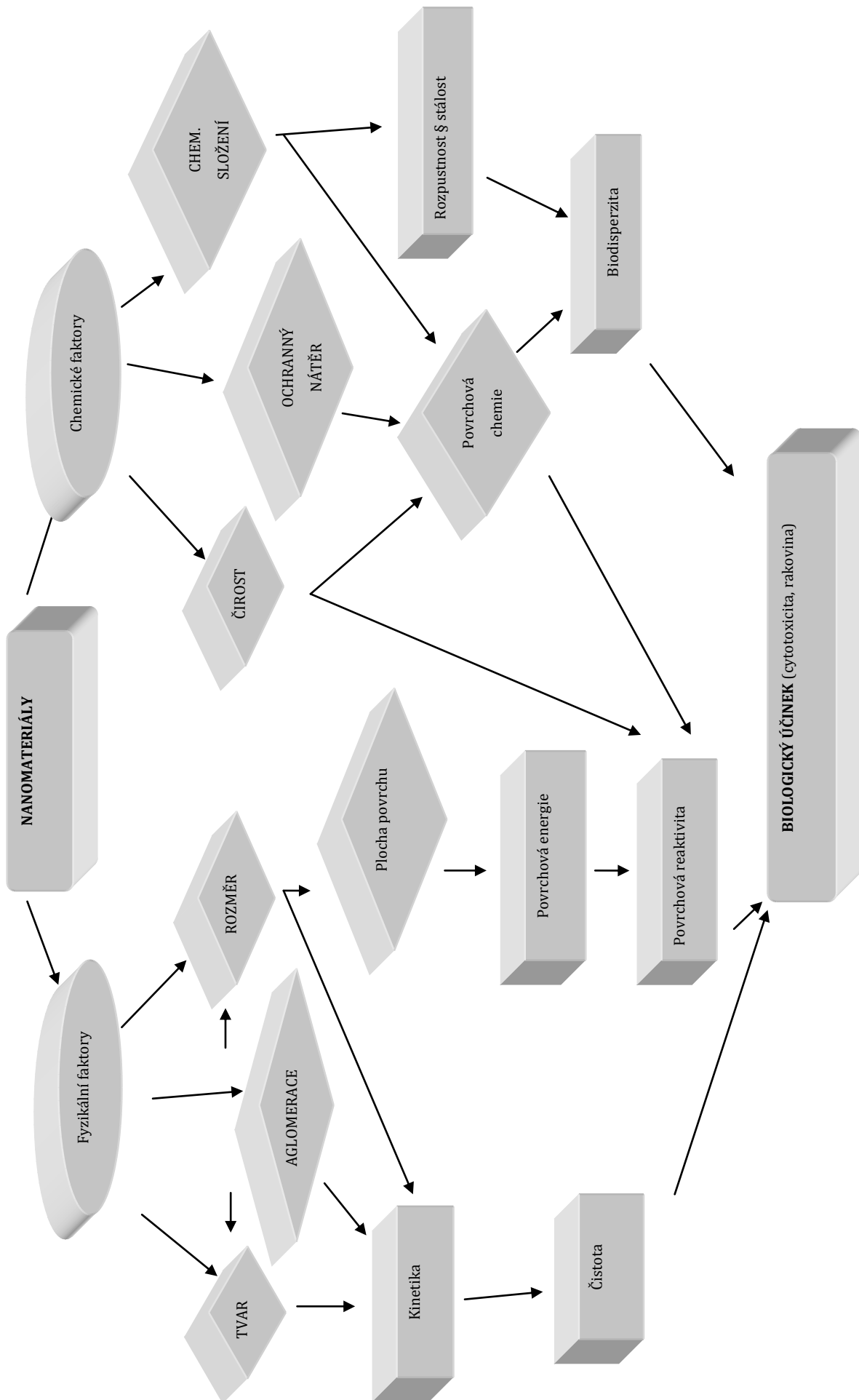
Dle nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) z 24. března 2009 se, pro účely hodnocení bezpečnosti kosmetických ingrediencí, „nanomateriálem“ rozumí nerozpustný nebo biopersistentní a záměrně vyrobený materiál o jednom nebo více rozměrech nebo s vnitřní strukturou v řádu od 1 do 100 nm. Na obr. 4 je uvedeno porovnání různých velikostí biologických materiálů dle Suha [19].



Obr. 4. Poměr velikosti materiálů

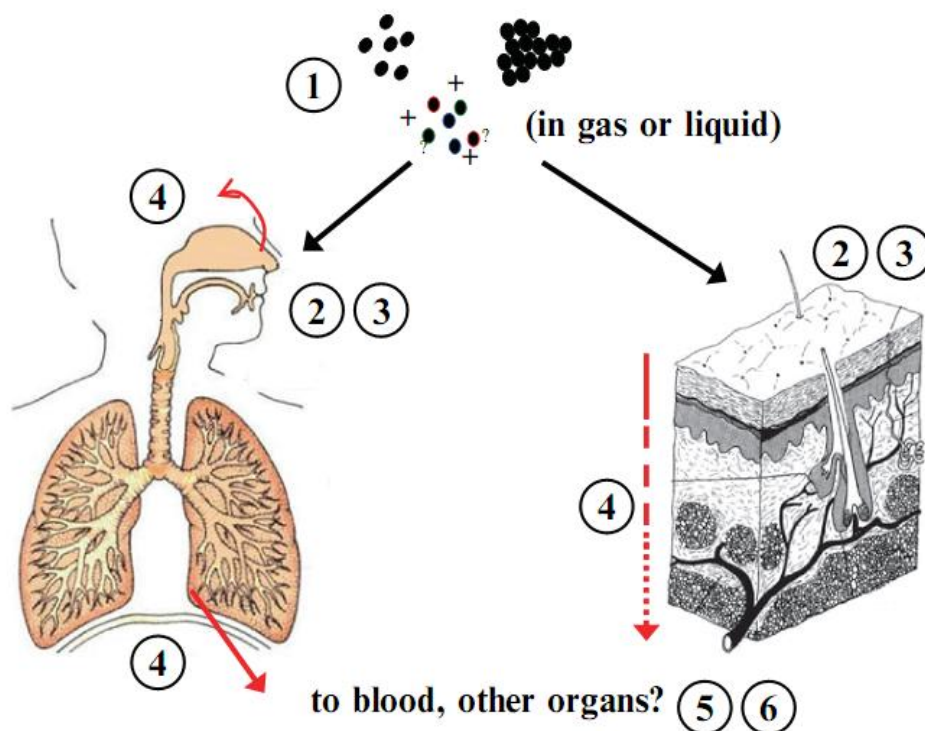
V současné době je posuzování nanomateriálu z hlediska možných rizik stále ve vývoji, nejsou totiž k dispozici dostatečné vědecké informace o této problematice. Pro charakterizaci možné toxicity je velmi důležité znát postup výroby nanomateriálu i s informacemi potřebnými pro hodnocení bezpečnosti. Jde o bezpečnostní listy, které musí být k dispozici u všech vyrobených nanomateriálů [20]. Nanomateriály mohou toxicky působit v různých částech těla, podle toho, kterými cestami se dostanou do organismu, tedy např. do plic nebo

kůže. Riziko představuje nejen množství nanomateriálu působící na organismus, ale i jeho fyzikálně - chemické vlastnosti, které ovlivňují jeho průnik do organismu [21,22]. Obr. 5 dle Lai a Sayre [23] znázorňuje fyzikálně chemické vlastnosti nanomateriálů, které by mohly mít vliv na poškození lidského zdraví.



Obr. 5. Fyzikálně- chemické vlastnosti nanomateriálů, které mohou změnit biologické účinky

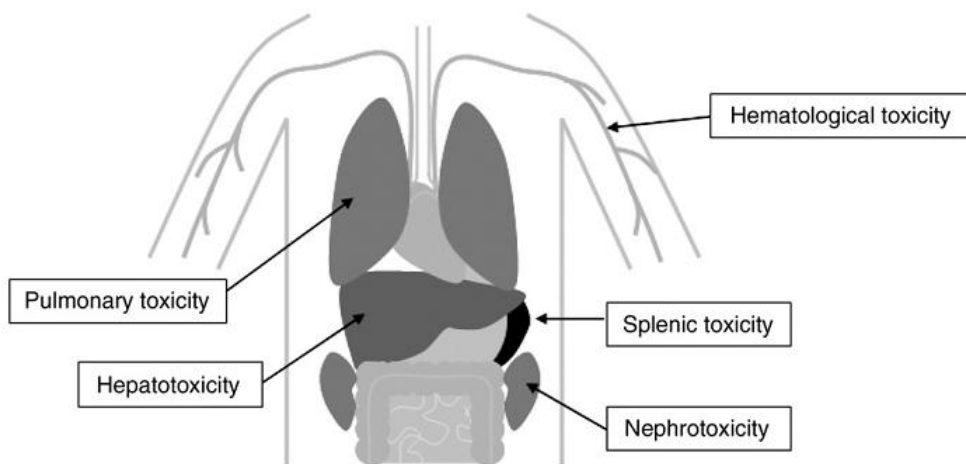
Obrannoschopnost organismu závisí na funkčnosti, případně nefunkčnosti, vstupní bariéry, ale také na schopnosti organismu odstranit z těla cizorodé materiály [21]. Lidé i mnohobuněčné organismy jsou vybaveni vyvinutými čistícími mechanismy, což není překvapivé, jelikož mnoho přírodních organismů má nano- rozměry, např. viry nebo toxický protein, který je obsažen v hadím jedu [24]. Zájem o nanomateriály je vyšší i kvůli nejasnostem, které se objevují při hodnocení rizik na lidské zdraví, viz obr. 6 dle Eldera a kol. [22].



Obr. 6. Klíčové problémy v hodnocení zdravotního rizika po průniku nanomateriálů do organismu. (1) Povaha nanomateriálu v bráně vstupu (velikost, náboj, aglomeráty). (2) Vliv fyzikálně-chemických vlastností na vstupu (3) proniknou nanomateriály kožní bariérou? (4) Mohou nanomateriály proniknout k ostatním orgánům, pronikající množství a jaké jsou cílové tkáně? (5) Může docházet díky nanomateriálům ke změnám v těle? (rozklad, vazba na protein/lipid). (6) Jsou ovlivněny i buňky?

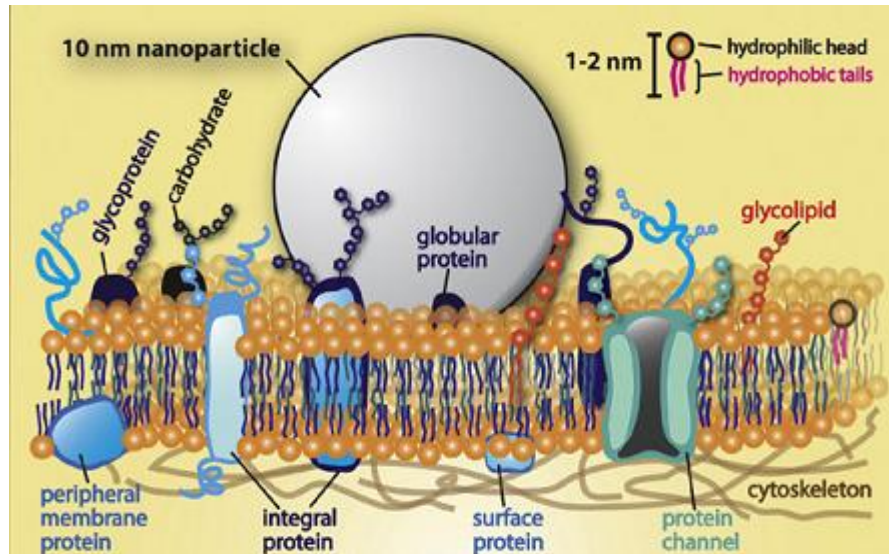
Z obr. 6 je patrné, že vstupní branou pro nanomateriály jsou ústa, kůže a dýchací ústrojí (rozebráno dále v kapitole). V případě jejich zdoání se mohou hromadit v různých orgánech a být potenciálními iniciátory nepříznivých účinků na dýchací cesty, kardiovaskulární systém, krev, gastrointestinální trakt (GIT), kůži, játra, slezinu, kosti a dokonce mozek, nervy i centrální nervový systém (CNS) [24,25]. Jelikož existují studie prokazující schop-

nost nanomateriálu projít přes různé membrány, musí být brána v úvahu jejich interakce s buňkami i tělními tekutinami, což může mít vliv na jejich distribuci v celém těle [25,26]. Díky malé velikosti nanomateriálů se totiž mohou dostat až k živým buňkám a pronikat přes oběhový systém k jednotlivým orgánům i k CNS. I když tento jev přemístění je pouze ojedinělý, musí být provedena analýza jejich potenciální toxicity [18,26] Na obr. 7 dle Ailona a kol. [27] jsou ukázány nejpravděpodobnější toxické účinky nanomateriálů na organismus.



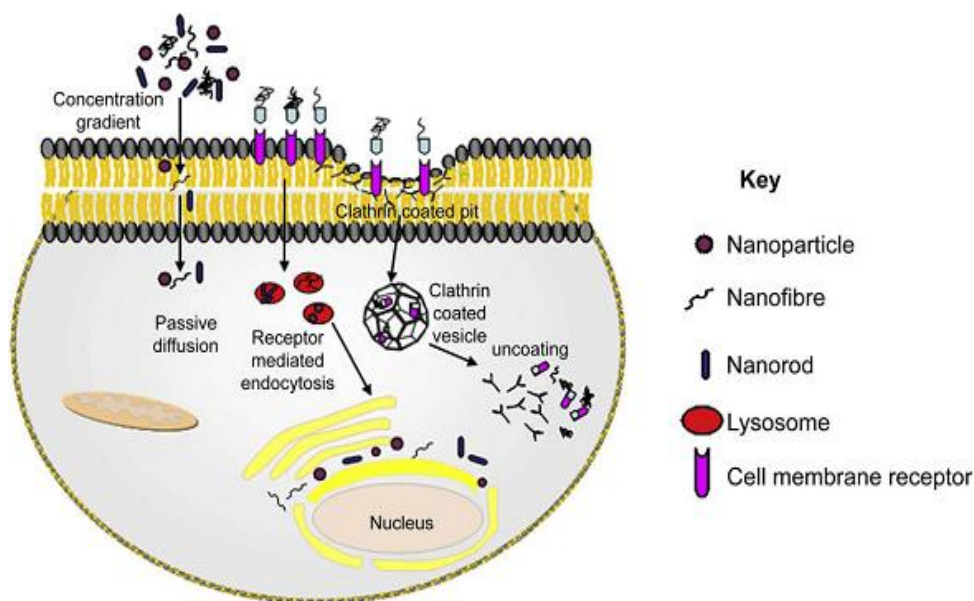
Obr. 7. Hlavní možnosti toxicity nanomateriálů in vivo

Klíčová vlastnost pro porozumění účinkům nanomateriálů u živých organismů je interakce jejich povrchu s buněčnými membránami, což ilustruje obr. 8 dle W. H. Suha a kol. [19].



Obr. 8. Začlenění různých proteinů s nanočásticí (10nm) do buněčné membrány

Jakmile nanomateriály vstoupí do organismu, mohou ovlivňovat činnost biologického systému. Za hlavní zdroj toxicity je považováno vzájemné ovlivňování nanomateriálů s mitochondriemi a buněčnými jádry [27]. Jejich specifické vlastnosti mohou také upravit buněčnou absorpci a tak i vazbu na protein [26]. Kromě toho mohou nanočástice omezit průchodnost buněčné membrány, což může zapříčinit smrt buňky. Nanomateriály mohou pronikat do buňky řadou mechanismů, viz obr. 9 dle Singha [28], který ukazuje pasivní prostup, následně mohou přímo nebo nepřímo ovlivňovat DNA.



Obr. 9. Schematická ilustrace možného pasivního prostupu nanomateriálu do buňky

V závislosti na velikosti mohou pronikat i do buněčného jádra jadernou membránou transportem přes póry. Nanomateriál může být inkorporován do jádra náhodně při dělení buněk, v době, kdy je jaderná membrána rozpuštěna. Pokud byly lokalizovány nanomateriály uvnitř jádra, pak případné přímé interakce mezi nimi a molekulou DNA či proteiny, které s DNA souvisí, mohou vést až k fyzickému zničení genetického materiálu [28]. Gieser [29] ve svém testu skutečně zjistil vstup TiO_2 až do jádra. V případě nepřímého ovlivnění DNA při prostupu nanomateriálu do buňky, dochází k interakci pouze s proteiny, které se podílí na buněčném dělení. Mohou tak navodit buněčné odezvy, které postupně vyvolají poškození genetického materiálu, jako např. odlišné signalizace či oxidaci, která je doprovázena vznikem reaktivních kyslíkatých produktů (ROS) [28], kterými se budu zabývat v souvislosti s fotoreaktivitou TiO_2 v kapitole 2.2.1. Oblast zásadního významu pro odhad zdravotního rizika je tedy genotoxicita (studium genetických změn způsobených hodnocenými látkami). Je zkoumán vliv nanomateriálu na DNA, který může mít dopad např. na neplodnost nebo vznik/rozvoj rakoviny. U řady vyrobených nanomateriálů byl prokázán genotoxický účinek, jako např. chromozomální štěpení, poškození DNA, oxidace DNA a změny v expresním genu. V tomto bodě jsou v literatuře nesrovnalosti a je těžké dojít k závěru, do jaké míry jsou výsledky genotoxických účinků ovlivněny fyzikálně-chemickými vlastnostmi nanomateriálů [28]. Testy toxicity nanomateriálů slouží k identi-

fikaci rizik. Většina studií je prováděno metodami in vitro (přímé aplikace na buňku, buněčné či tkáňové kultury) nebo in vivo, studii na zvířatech [30].

Z dostupných testů je patrné, že největší pozornost je soustředována na zdravotní rizika spojená s cestami inhalace. V menší míře pak na kožní penetraci nanomateriálů, z důvodu obsahu látek o rozměru nanometru v kosmetice (TiO_2 , ZnO) nebo i jiném spotřebním zboží, obsahujícím například stříbro. Toxikologické testy zaměřené na vstupní cestu nanomateriálů přes GIT, diskutovanou v následující kapitole nejsou při porovnání s předchozími případy tak četné [30].

2.1.1 Gastrointestinální trakt (GIT)

Do GIT se mohou nanomateriály dostat přímo z kontaminovaného jídla, vody nebo polykáním inhalovaných částic [21]. Kromě toho, může dojít k ručnímu přenosu nanomateriálů do úst [21]. Neexistuje mnoho testů zaměřených na tuto cestu vstupu, jelikož jsou potenciální rizika nanomateriálů spojována zejména s inhalací [31]. Dle Sterna [21] dochází k vstřebání nanočástic GIT pouze omezeně. Nicméně Wang [32] shledal, že pokud byl do GIT zdravých myší dodán nano i mikro - ZnO (5g/kg), byl v případě mikro - ZnO zaznamenán úhyn zvířat již po 2 týdnech. V případě nano - ZnO byly sledovány vážnější příznaky již od počátku testu. Podání ZnO mělo za následek zvracení, průjemy a již po prvním týdnu došlo k úhynu zvířat. Následně byly nalezeny patologické změny jater, ledvin a srdeční tkáně.

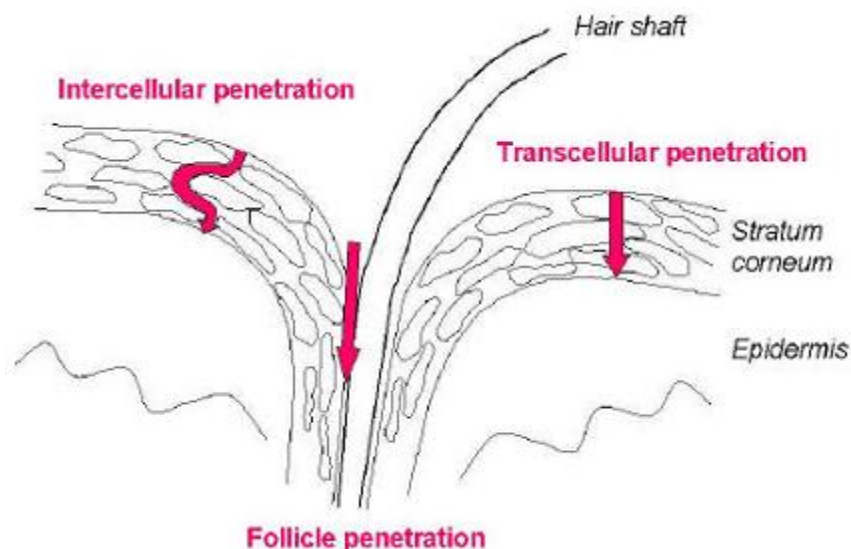
2.1.2 Inhalace

Inhalace je vstupní cesta nanomateriálů, která je z hlediska lidského zdraví velmi riziková, a proto je jí věnována velká pozornost [33]. Nanočástice, které mohou negativně ovlivňovat zdraví, se nacházejí např. v cigaretovém kouři, atmosférických imisích a vznikají také při spalování různých materiálů. Díky jejich malé velikosti mohou cestovat vzduchem na dlouhé vzdálenosti [24]. Malá velikost nanomateriálů také představuje zásadní význam při rozptýlení a distribuci do všech částí dýchacího ústrojí. Míru ohrožení lidského zdraví ovlivňují i ostatní fyzikálně - chemické vlastnosti [26]. Inhalovaný nanomateriál může způsobovat rozvoj různých nemocí dýchacích cest, včetně astmatu. Mohou zvyšovat i riziko infarktu a rakoviny. Jsou schopny se hromadit v organismu a usazovat se např. v alveolární

oblasti plic. Kromě toho mohou z plic přecházet do krve, kde mohou podporovat vznik trombózy nebo destabilizovat krevní destičky [26].

2.1.3 Kůže

GIT a dýchací soustava jsou považovány za více zranitelné a snáze zdolatelné cesty vstupu pro nanomateriály ve srovnání s kůží, která je v případě neporušenosti rohové vrstvy velmi účinnou bariérou [34]. Pasivní doprava nanomateriálů zdravou kůží je považována za vysoce nepravděpodobnou, díky matici korneocytů, lipidové dvouvrstvě i díky fyziologickému prostředí pod rohovou vrstvou, které obsahuje mnoho proteinů. Pro iontové sloučeniny nebo látky nerozpustné ve vodě je velmi složité projít přes tuto bariéru [35,36]. Matrice korneocytů (neboli souboru zrohovatělých buněk na povrchu pokožky) podporuje mechanickou stabilitu a neporušenost rohové vrstvy, a tím přispívá k dobré funkci kožní bariéry. Co se týče lipidové dvouvrstvy, ta je rozhodující v transepidermálním rozptylu molekul [37,38]. V případě poškození kůže je přirozená bariéra porušena a pravděpodobnost vstupu nanomateriálů se podstatně zvyšuje. Záleží také na mechanické deformaci vrstvy korneocytů, což vede k lehčímu překonání vrstvy a prostoupení nox zevního prostředí až do dermis. I samotné uspořádání kůže do kožních reliéfů usnadňuje průchod látek přes kůži. Teoreticky by mohly nanomateriály projít mezi korneocyty lokalizovanými v rohové vrstvě [39] nebo přes kožní adnexa (vlasové folikuly, mazové a potní žlázy). Způsoby cesty penetrace lze rozdělit do tří skupin – intercelulární, folikulární a transcelulární. Všechny tyto způsoby jsou uvedeny na obr. 10, který byl přebrán od Borma [40].



Obr. 10. Možné cesty penetrace kůží

Další část diplomové práce je konkrétně zaměřena na problematiku nanočástic TiO_2 a ZnO obsažených v prostředcích na slunění a jejich potenciálních zdravotních rizik, které souvisejí s jejich možnou penetrací kůží.

2.2 Nanočástice v prostředcích na slunění

Nanočástice v kosmetických prostředcích se liší od nanočástic používaných v dalších průmyslových oborech. Jejich odlišnost je dána např. molekulovou strukturou, metodou výroby. Při výrobě kosmetických prostředků jsou používány tzv. nanoemulze, jejichž součástí jsou nanopigmenty oxidu titaničitého, případně zinečnatého [41]. Malá velikost částic poskytuje finálnímu výrobku transparentnost i větší efektivnost při odrazu/rozptylu UV záření než je tomu v případě ingrediencí s většími částicemi. Struktura a reologické vlastnosti finálního výrobku jsou přesto dotvářeny až během jeho výroby [42,43]. Hojně jsou také využívány uměle vyrobené částice o velikosti nanometrů. Jedná se o liposomy, které umožňují zabudování nestálých aktivních ingrediencí např. vitamínů do své molekuly, a jejich uvolnění při kontaktu s kůží v době aplikace [41].

Kvůli diskuzím, které se objevují v souvislosti s použitím nanočástic v prostředcích na slunění byly shromážděny informace o penetraci TiO_2 a ZnO kůží [43]. V řadě laboratorních testů byla použita pro tyto účely neporušená lidská, vepřová nebo myší kůže [44,45]. Zvýšená pozornost je nanočásticím také věnována z důvodu potenciálního rizika cytotoxicity ve srovnání s jejich většími protějšky, u kterých toto nebezpečí prokázáno nebylo [46].

Nohynek [42] na základě výsledků svých studií tvrdí, že nerozpustné nanočástice nejsou schopny pronikat lidskou kůží. Pomocí in vivo a in vitro studií navíc potvrdil, že TiO_2 a ZnO nejsou toxické. Následným in vivo vyšetřením ovšem prokázal absorpci TiO_2 do kůže. Penetrované množství způsobilo oxidativní poškození kožních buněk a dokonce bylo přítomností TiO_2 vyvoláno genotoxické poškození těchto buněk. Nohynek tyto výsledky přisoudil sekundární fagocytóze buněk při nadměrné koncentraci nanočástic [42]. Gamer [47] ve své práci podal důkaz, že použití aglomerátů TiO_2 o velikosti menší než 160 nm a ZnO o velikosti cca. 80 nm použitých v prostředcích na slunění nepředstavují zdravotní riziko, jelikož jsou částice zachyceny v rohové vrstvě prasečí kůže a dál nepronikají. Existují i studie, které potvrzují přítomnost nanočástic ve vlasovém folikulu a kožních vráskách několik milimetrů hluboko [43,44]. Meidan [48] metodou in vivo na kůži hlodavce provedl

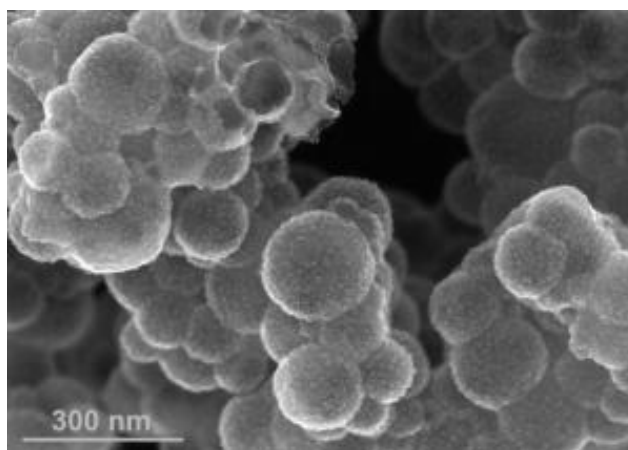
studii, kterou byla prokázána penetrace nanočástic s průměrem mezi 7 – 20 nm do vlasového folikulu. Při mírném zahřátí kůže však byl uvolněn kožní maz z mazových žláz, kterým byl zaplněn vlasový folikul. Tímto mechanismem tak bylo dosaženo blokace prostupu nanočástic hlouběji do organismu. Lekki [49] provedl test penetrace TiO_2 na lidské i prasečí kůži, ve kterém byly nanočástice identifikovány pouze v prohloubenině vlasového folikulu, přičemž bylo konstatováno, že se sem nanočástice mohly dostat spíše mechanickým vpravením, než prostupem. Toto tvrzení podporuje fakt, že přítomnost nanočástic nebyla pozorována v mazových žlázách ani v dermis. Penetraci a následné hromadění ve folikulu TiO_2 a ZnO zjistil také Lademann [50]. Nicméně je k dispozici i Raymanova [51] studie, která prokázala průnik nanočástic nedotčenou prasečí kůží 24 hodin po aplikaci. Překvapivě byla zjištěna penetrace částic různých velikostí, tvarů i těch, které byly ošetřeny tzv. „povrchovým nátěrem“. Z dostupných zdrojů je zřejmé, že kožní penetrace nanočástic je sporná a na tuto problematiku neexistuje dosud ucelený názor pro nedostatek srovnatelných údajů.

2.2.1 Oxid titaničitý

Toxikologické účinky v případě aplikace nano - TiO_2 na kůži při použití prostředků na slunění jsou stále velkou neznámou. Nezodpovězené otázky zůstávají, i když oxid titaničitý patří mezi nanočástice s největším množstvím dostupné literatury pro hodnocení zdravotních účinků včetně epidemiologických studií akutní, subakutní i chronické toxicity [18]. Z tohoto důvodu Kiss [52] provedl stanovení penetrace TiO_2 lidskou kůží a navíc zhodnotil účinky nanomateriálů na četných kožních buňkách metodou in vitro. Zjistil, že TiO_2 nepronikne nedotčenou a neporušenou epidermální bariérou. Pokud je ale TiO_2 vpraven přímo do buněčné kultury, dochází k ovlivňování buněčné funkce, životaschopnosti, množení a diferenciaci buňky. I Shulz [53] ve své studii tvrdí, že mikronizovaný TiO_2 je zachycen v rohové vrstvě a nemůže penetrovat až k dermis. Dále byl proveden test na cytotoxicitu a genotoxicitu v kultivovaných lymfoblastoidních lidských buňkách, který podal důkaz, že TiO_2 je schopen navodit významnou cytotoxicitu v závislosti na aplikované dávce a době působení [54].

Kromě penetrace byly některé studie zaměřeny na fotokatalitický účinek TiO_2 . Řadou testů byl také prokázán [55,56]. Sayes [57] a Warheit [58] provedli studie na fotoreaktivitu TiO_2 s kožními fibroblasty, lidskými plicními epitelovými buňkami i s krysami. Prokázali, že fotoreaktivní TiO_2 zvýší cytotoxický účinek v případě použití větší koncentrace než 100

mg/ml TiO_2 ve vzorku. Navíc bylo zjištěno, že tato koncentrace je dostatečně vysoká na to, aby způsobila ohrožení lidského zdraví. Fotoreaktivitu TiO_2 ve své práci vysvětluje Brayner [59] tím, že tento UV filtr dokáže absorbovat až 70% UV záření, následkem čehož ve vodném prostředí dochází ke vzniku volných reaktivních kyslíkatých produktů (ROS-reactive oxygen species). Jde o velmi reaktivní molekuly, jako např. singletový kyslík, peroxidové anionty, volné hydroxylové radikály [60,61,62], které mohou porušit homeostázu vnitřního prostředí buněk, což působí nepříznivě na buněčné proteiny, DNA i lipidy [28]. Působením ROS dochází k oxidaci těchto látek, změnám buněčné funkce a dokonce jejich smrti v důsledku ztráty regulačního cyklu [55]. Je dokonce znám i molekulový mechanismus pro patogenezi různého neurogenetického onemocnění (Alzheimerova či Parkinsonova choroba) [24]. Hlavním cílem pro ROS, jejichž vznik je podpořen přítomností nanomateriálů v organismu, jsou však játra a slezina. Mohou ale nepříznivě ovlivňovat i ledviny a plíce, ke kterým si mohou najít cestu krevním řečištěm. Vysoká pravděpodobnost ohrožení je také u mitochondrií. Jedná se totiž o aktivní orgány, ve kterých může působením ROS docházet ke změnám a tím k poruchám důležitých funkcí. Informace týkající se fotokatalitického účinku TiO_2 je možno nalézt i v další literatuře [63]. Na obr. 11 je zobrazen TiO_2 v elektronovém mikroskopu.



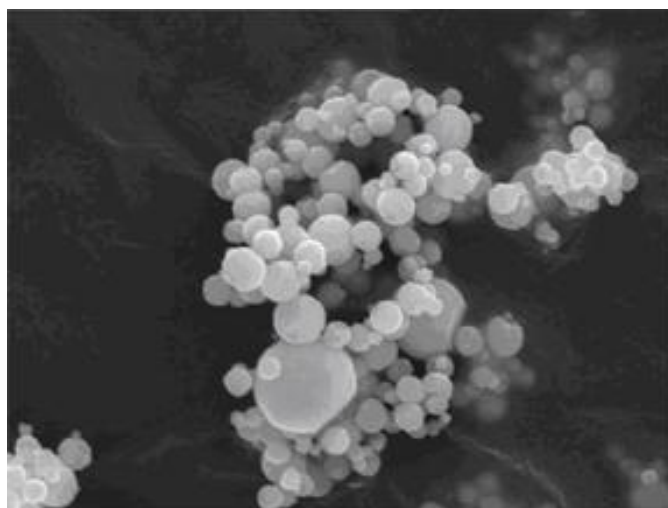
Obr. 11. TiO_2 pod elektronovým mikroskopem

2.2.2 Oxid zinečnatý

Oxid zinečnatý má všeobecně nízkou toxicitu, ať se do organismu dostane jakoukoli cestou. Publikované studie signalizují, že ZnO v prostředcích na slunění nepůsobí na kůži nepříznivě. Nicméně mnoho těchto studií nemělo dle SCCNFP úplné fyzikálně-chemické podklady (SCCNFP/0649/03). Dle tohoto stanoviska SCCNFP [64] je nutné doplnit před-

ložené informace o údaje o kožní penetraci a systémovou expozici. Na základě požadavku doplnění dokumentace z roku 2003, vydal SCCP [65] v roce 2009 stanovisko, ve kterém je konstatováno, že použití ZnO o velikosti částic nad 100 nm je bezpečné. Kompletní informace o toxikologickém profilu zinku jsou také dostupné na stránkách ATSDR (Agency for toxic substance & Disease registry - Agentura pro toxické látky a registr nálezů) 2005 [66].

Existuje studie hodnotící genotoxicitu nanočástic ZnO, např. Sharma [67] poukázal na snížení životaschopnosti i funkce lidské epidermální buňky během expozice ZnO. Během testu došlo také k poruše DNA kožních buněk již po 3 hodinách expozice v případě nejvyšší použité koncentrace ZnO a navození oxidace buněk spotřebováním glutathianu, katalázy a peroxid dismutázy. Cross [45] při zkoušce kožní penetrace zjistil, že kůži po 24 hodinové expozici nepronikne více jak 0,03% ZnO. Obr. 12 znázorňuje ZnO v rozměru nanometrů.



Obr. 12. ZnO v rozměru nanometrů

2.3 Odhad rizika nanomateriálů

Ačkoli jsou nanotechnologie dostatečně vyvinuté a umožňují vědcům připravit a použít nanomateriály v různých typech výrobků, nejsou zatím dostatečně zodpovězeny základní otázky, o jejich negativním dopadu na lidské zdraví a životní prostředí [68]. Vývoj nových nanočástic dosahuje daleko vyššího tempa, než je hodnocení jejich bezpečnosti [22]. Je samozřejmé, že zavádění nových materiálů se neobejde bez stanovení jejich toxikologických vlastností. Tento úkol však není tak jednoduchý, jak by se mohlo zdát. Ve skutečnosti existují důkazy o faktorech, které ovlivňují penetraci nanočástic kůží a jejich distribuci

k dalším tkáním. Dostupné údaje však s sebou nesou spíše větší nejistotu než jistotu [68]. Otázka penetrace nanočástic kůží je kontroverzní a publikované výsledky nejsou mezi sebou v souladu. Dostupné studie se rozcházejí a nedovolují žádné konkrétní závěry [18,20]. Dosavadní testy toxicity byly provedeny u zdravé kůže za laboratorních podmínek, během kterých docházelo k úpravám hydratace kůže, teploty, krevního zásobení či opálení [69]. Jelikož jsou aktuální testy zabývající se penetrací nanočástic kůží omezeny, je potřeba se do budoucna zaměřit na kompletní charakterizaci nanomateriálů, analytickou metodu potřebnou k identifikaci nanočástic s možností získat věrohodné výsledky z analýz dermis, epidermis i vlasového folikulu a zohlednit stav kůže (neporušenost, ohyb, oslabenost) před a po testování [30,70]. V případě narušené nebo oslabené kůže po opálení kůže, s výskytem akné, ekzematické kůže s porušenou rohovou vrstvou, se zvyšuje riziko prostupu nanočástic až k živým buňkám. Dermis má bohatou zásobu krve a makrofágů, lymfatických cév, dendritických buněk a nervových zakončení. Z tohoto důvodu by penetrace rohovou vrstvou až do dermis mohla vést k prostupu nanočástic k dalším orgánům těla přes krevní nebo lymfatický systém, a mohlo by docházet k dosud nevyjasněným nežádoucím účinkům. S ohledem na tyto skutečnosti byl požádán Vědecký výbor pro kontrolu spotřebního zboží SCCP, aby řešil hodnocení bezpečnosti nanomateriálů v kosmetických prostředcích SCCP/1147/07 [20,42]. Dle tohoto stanoviska lze použít pouze validované in vitro a in vivo metody. V současné době zatím nejsou žádné metody ověřené pro nanomateriály. Stávající metody nejsou ideální a navíc je vhodné pro posouzení rizik používat více technik pro pozdější možnost srovnání [18].

3 METODY STANOVENÍ

Použitím nanočástic v prostředcích na slunění vznikla obava z potenciálního rizika na lidské zdraví, v důsledku pravděpodobnějšího prostupu nanomateriálů kůží. Z tohoto důvodu je pro odhad rizika zcela zásadní stanovení dermální absorpce tohoto typu kosmetických přísad. V této kapitole se budu věnovat hodnocení penetrace UV filtrů za použití metody *in vitro* a jejich následnou chemickou analýzou. Konkrétně byla práce zaměřena na penetraci oxidu zinečnatého, kterému v odborných publikacích nebyla věnována taková pozornost jako oxidu titaničitému. Oxid zinečnatý totiž dosud není, i přes jeho prokazatelné ochranné účinky proti UV záření, zařazen mezi povolené UV filtry.

3.1 Stanovení dermální absorpce kosmetických přísad metodou *in vitro*

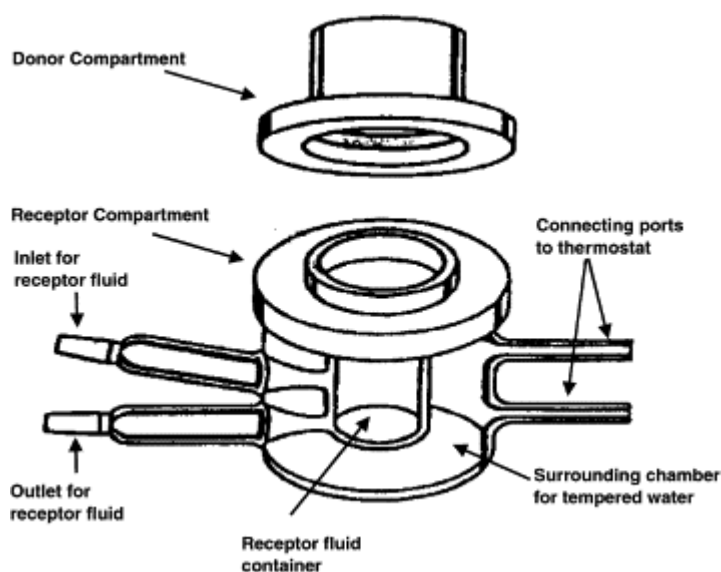
Vědecký výbor pro kosmetiku a nepotravinové výrobky (SCCNFP) již v roce 1999 přijal základní kritéria pro *in vitro* hodnocení perkutánní absorpce kosmetických přísad [71]. Zavedení těchto kritérií mělo rozšířit toxikologické informace o kosmetických ingrediencích, které jsou uvedeny v přílohách 3 - 7 Směrnice pro kosmetiku 76/768/EHS. Zmíněné stanovisko také poskytuje obecné zásady a praktické body metodiky [15]. V souvislosti s touto problematikou vydala Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD - Organization for economic cooperation development) návody a postupy pro usnadnění výběru *in vitro* metod v případě specifických požadavků a zajištění spolehlivosti získaných výsledků. Jedná se o návod OECD 428 na kožní absorpci: *in vitro* metoda. Kromě této metody je možné dermální absorpci stanovit také metodou *in vivo* podle návodu OECD 427. V roce 2006 byla provedena revize a Výborem pro kontrolu spotřebního zboží (SCCP) bylo vydáno upravené stanovisko SCCP/0970/06 [15]. V souladu se všemi právními předpisy Evropská unie vydala nařízení Komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví metody zkoušení dle nařízení 1907/2006 Evropského parlamentu a Rady o registraci, hodnocení a omezení chemických látek (REACH) [72].

Dermální absorpce metodou *in vitro* je prováděna dle SCCP/0970/06 na vhodných standardizovaných kožních substrátech. Zdůvodnění použití izolovaných kožních preparátů je založeno na skutečnosti, že epidermis, a to zejména rohová vrstva, tvoří bariéru pokožky proti pronikání a distribuci cizorodých látek v těle. WHO doporučuje jako zlatý standard lidskou pokožku [15,73]. Lidská kůže, je samozřejmě nejvhodnější, ale není snadno do-

stupná. K jejímu odběru dochází během chirurgických zákroků, pouze se souhlasem dárce. Je využívána kůže z oblasti zad, břicha, hrudníku nebo boků. Nejlepší alternativou je použití kůže prasečí, jelikož má z hlediska propustnosti vlastnosti shodné s kůží lidskou. Kůže je odebírána z oblasti zad, cca 10 cm od páteře na každé straně. Kožní lidské preparáty mají tloušťku 500-1000 μm , prasečí pak jen 200-500 μm . V případě použití kůží jiných zvířat, je potřeba brát v úvahu jejich odlišnosti od kůže lidské. Například kůže z krys je 1 – 10 krát propustnější, což může výsledky analýzy zkreslovat. Kůže morčat nebo králíků nemají dostatečně vyvinutou funkci kožní bariéry ve srovnání s lidskou kůží, a proto nejsou pro tuto metodu nejvhodnější. Pro stanovení jsou nejvýhodnější kůže čerstvé, ale mohou se používat i kůže zmrazené. V tomto případě je nezbytné mít na paměti, že zmrazené kožní substráty mohou postrádat enzymatický systém pro biotransformaci zkoušené látky a nemusí poskytovat přesný obraz o vzniku metabolitů a jejich absorpci kůží [15,73].

3.1.1 Princip metody

Stanovení dermální absorpce probíhá za použití difúzních komůrek, které jsou vyrobeny z inertního materiálu, nejčastěji skla nebo teflonu. Existují dva typy těchto komůrek, od kterých se odvíjí celá řada modifikací. Prvním typem je statická, tzv. Franzova komůrka, druhý typ komůrky zajišťuje průtokový způsob analýzy. Pro účely dermální absorpce provedené v rámci této práce je využívána Franzova komůrka, která je rozdělena na dvě části: horní (donorovou) a dolní (akceptorovou) část [14,73], viz obr. 13, dle Gamera [47].



Obr. 13. Franzova komůrka

Spodní část komůrky je naplněna recepční tekutinou cca. 30 minut před začátkem experimentu. Tato tekutina nesmí poškozovat kůži, omezovat penetraci zkoumané látky a navíc musí odpovídat jejímu charakteru (lipofilní/hydrofilní). Dále musí být zajištěno fyziologické pH recepční tekutiny a testovaná látka musí být v této tekutině stabilní po celou dobu experimentu i následné analýzy. Mezi horní (donorovou) a dolní (receptorovou) část této komůrky je vložena kůže pokožkou směrem nahoru. Na ni je pak rovnoměrně nanášeno předem známé množství zkoumané látky [15,73]. Dávky testované látky se obvykle pohybují mezi 2-5 mg / cm² pro pevné a polotekuté látky a 10 ml / cm² pro kapaliny. Vzhledem k tomu, že rychlost a rozsah absorpce je závislý na teplotě, je nutno během testu udržovat na povrchu kůže teplotu 32 ± 1 ° C, což je zajištěno zapojením jednotlivých komůrek hadičkami k vodní lázni s pumpou. Délka testu pro UV filtry trvá 24 hodin [14,15]. V případě lidské kůže, je doporučováno, aby v jednom experimentu bylo použito min. 6 kůží nejméně od 3 různých dárců [94]. Po skončení testu se aplikovaná látka může nacházet ve všech frakcích kůže i v recepční tekutině, i když do tekutiny by se nemělo dostat více jak 10 % zkoumané látky.

Pro provedení testu je zcela zásadní integrita kůže, proto je potřeba ji ještě před začátkem testu změřit např. měřením absorpce markeru (molekula vody, kofein, sacharosa) nebo pomocí fyzikálních metod, jako je transdermální ztráta vody (TEWL) nebo transkutánní elektrický odpor (TER). Výsledek experimentu je také ovlivněn charakterem zkoumané látky, a proto je velmi důležité brát v úvahu její fyzikálně – chemické vlastnosti (např. molekulová hmotnost, stabilita, rozpustnost, čistota i dělicí koeficient Log P_{ow}) [14,15].

Distribuce zkoušené látky do jednotlivých vrstev kůže je stanovována pomocí rozdělení kůže na tzv. stripy, kdy jsou jednotlivé vrstvy odstraňovány z rohové vrstvy pomocí lepicí pásky. Po tomto kroku následuje oddělení epidermis od dermis (např. teplem). Chemické analýzy jsou podrobeny všechny části kůže, tedy zbytek látky na povrchu kůže, rohová vrstva epidermis rozdělená na jednotlivé stripy, zbylá epidermis, dermis i recepční tekutina. Analytická metoda je volena dle povahy vzorku. K hodnocení je používáno instrumentálních metod jako např. HPLC, GC nebo AAS [15,73].

Návratnost celkového množství látky by se měla pohybovat v rozmezí 100 ± 10 % [72]. Získané výsledky jsou vyjadřovány v µg částic /cm² kožního povrchu. Množství látky stanovené v recepční tekutině je považováno za množství biologicky dostupné organismu. Množství nalezené v epidermis (bez rohové vrstvy) a dermis je pokládáno za absorbované

a řadí se k množství získané v recepční tekutině. Množství látky stanovené v rohové vrstvě není bráno za dermálně vstřebané a neočekává se, že by mohlo přispět k celkové systémové dávce [15].

3.2 Metody stanovení zinku

Ačkoli v současné době převládá v analytické chemii použití moderních metod, klasické metody stanovení se v určitých případech, pokud vyhovuje jejich omezená citlivost (cca 0,1 mg/l, tj. nejmenší stanovitelné množství), stále používají vzhledem k jejich malé náročnosti na laboratorní vybavení.

Jednou z metod vhodných k průkazu zinku je využití gravimetrického stanovení. Zinečnaté ionty se srážejí z neutrálních roztoků ve formě bílé krystalické sraženiny fosforečnanu zinečnato-amonného, ze které lze přímo po vysušení stanovit množství zinku. Navíc je možno komplex fosforečnanu zinečnato-amonného žiháním snadno převést na difosforečnan zinečnatý, který je pro analýzu také využitelný [74].

Rychlejší stanovení je pomocí odměrné analýzy. Pro stanovení zinku jsou vhodné komplexometrické titrace, kde je jako odměrný roztok využíván Chelaton 3 (EDTA- etylendi-amintetraoctová kyselina). Ve slabě kyselém prostředí, při $\text{pH} > 4$ je zinek možné určit přímo. V amoniakálním prostředí se vytěsňuje nadbytkem vápenatých iontů a stanovuje se např. jako ZnS. Během titrace je možné uplatnit celou řadu indikátorů v závislosti na pH prostředí. Pro amoniakální prostředí je k dispozici indikátor ErioT (pH10), který během titrace přechází z vínově červené do modré. Jeho nevýhodou je, že v přítomnosti stopového množství Cu a Al dochází ke ztrátě účinnosti. Pro slabě alkalické a mírně kyselé prostředí je využívána methylmolová modř [75]. Ve slabě kyselém prostředí (pH 5 – 5,5) v roztocích urotropinu se nejčastěji uplatňuje xylenolová oranž, kdy během titrace dochází ke změně barvy z červenofialové až do citronově žluté. Tato poslední varianta se využívá např. při stanovení zinku v zinkové masti [76]. V tomto případě je oxid zinečnatý převeden do roztoku pomocí 6 M HCl za varu a stanoven přímou titrací odměrným roztokem pomocí chelatonu 3. Další možností je stanovení zinku titrací hexakvanoželezitanem draselným (ferrokyanidu). Při titraci vzniká sůl hexakvanoželeznatan zinečnato-draselný. Vznikající komplex je nejdříve vylučován ve formě gelu, později vypadává ve formě sraženiny. Tento vznikající komplex je možné stanovit i nepřímou titrací při použití nadbytku odměrného roztoku hexakvanoželeznatanu draselného v roztoku a retitrací odměrným roztokem zinku.

V tomto případě se jako indikátor používá většinou difenylamin, který vykazuje modré zbarvení [76].

Mezi instrumentální metody, které jsou vhodné pro stanovení zinku, se řadí atomová absorpční spektrometrie (AAS) nebo atomová emisní spektrometrie (AES). Obě tyto metody patří do optických instrumentálních metod, jejichž princip je popsán např. Opekarem [77] nebo Komínkovou a kolektivem [78]. Gamer [47] ve své studii při stanovení oxidu zinečnatého i oxidu titaničitého v testu dermální absorpce metodou in vitro využil analýzu jak AAS, tak i ICP - AES (atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem). Další studie [79] se zabývala možnostmi stanovení oxidů kovů v opalovacích prostředcích, kde je navržena metodika zakládající se na mineralizaci opalovacího prostředku v uzavřeném teflonovém reaktoru v přítomnosti kyseliny dusičné a chlorovodíkové. Po tomto kroku byly jednotlivé vzorky podrobeny analýze ICP - AES, během které bylo zjišťováno množství TiO_2 . V případě stanovení ZnO byly vzorky emulgovány ve vodě s neionogenním tenzidem a isobutyl-methyl ketonem (IBMK). Po úpravě byly vzorky analyzovány plamenovou atomovou absorpční spektrometrií (FAAS). I v publikaci [80] se využívá ICP - AES jako metoda, která je schopna zjistit větší množství prvků jako Ti, Zn nebo toxických prvků jako např. Al, Mn, Cu, Pb, i B v prostředcích na slunění. Ve studii byly sledovány dva alternativní způsoby úpravy vzorku: celková hydrolyza v uzavřených tlakových nádobách a emulgace vzorku. Později byl druhý způsob úpravy pro emulzní výrobky typů krémů hodnocen jako neúčinný díky vysoké viskozitě a nerozpustnosti. Pro hydrolyzu krémů s komplikovaným mastným základem byly použity různé druhy kyselin (HNO_3 , HCl, H_2SO_4 a HF). Nakonec byla tato metoda úspěšně aplikována v případě několika komerčních výrobků. Lavilla [81] pro podporu emulgace vzorků kosmetických prostředků využil ve své studii ultrazvukovou lázeň. Jeho snahou byla jednoduchá a rychlá příprava vzorků, které by bylo možné ihned analyzovat atomovou spektrometrií. Pro stanovení stopových prvků, a to např. Cr, Cu, Mg, Ni, Sr, a Zn v kosmetických prostředcích použil elektrotermickou atomovou absorpční spektrometrií (EAAS) a atomovou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP - AES). Vzorky byly upraveny přidávkem tenzidu laurylsulfátu sodného (SDS), kyseliny dusičné nebo HCl, a protřepány v ultrazvukové lázni po dobu 1 minuty. Na základě výsledků bylo konstatováno, že tento postup dovoluje získat stabilní emulze. Pro srovnání množství stopových prvků zjištěných v kosmetických prostředcích metodami EAAS a ICP - AES byla provedena mineralizace

vzorku. Takto upravené vzorky byly analyzovány hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP - MS). Odchytky výsledků získaných jednotlivými metodami byly menší než 9% ve všech případech.

Vondruška [82] se při stanovení toxických kovů v kosmetických olejích snažil obejít zdlouhavou cestu mineralizace vzorku. Příprava vzorků byla provedena pomocí komerčně dostupného tenzidu (TritinX - 100, chemická specifikace je uvedena v poznámce pod čarou), čímž byla získána vodná emulze. Tento způsob úpravy vzorků se ukázal být jednoduchý a bez komplikací. I když je stabilita takto připravených emulzí krátkodobá, pro analýzu metodou AAS tato nevýhoda není na závadu, jelikož do analyzátoru je vpravována vždy čerstvě připravená emulze. Protože se většinou jedná o stanovení stopového množství prvků, je velmi důležitá citlivost metody. Touto problematikou se zabýval Yurchenko [83], kdy cílem jeho práce bylo zvýšit citlivost a selektivitu AAS metody. Snažil se toho dosáhnout chemickou modifikací Zn, kdy byly pro tyto účely vybrány různé typy tenzidů (Tween 20, Tween-80, TritonX - 100, SDS), jejichž chemické názvy jsou uvedeny v poznámce pod čarou. Bylo prokázáno, že se citlivost a selektivita metody nejvíce zvyšuje při použití laurylsulfátu sodného (SDS). Detekční limit tohoto stanovení je při koncentraci min 0,003 $\mu\text{g Zn / ml}$, což odpovídá 0,003 mg Zn / l .

I když je stanovení Zn metodou atomové absorpční analýzy jednoduché a rychlé, je zde problém vysoké pořizovací ceny přístroje i potřeba proškoleného personálu. Z tohoto důvodu se velmi často uplatňuje metoda spektrofotometrie za použití jednoduchých spektrofotometrů. Principem metody je schopnost různě zbarvených vzorků pohltit (absorbovat) část světla procházejícího měřeným roztokem. Výsledek je vyjadřován jako absorbance, která udává, kolik záření bylo měřeným vzorkem pohlceno [84].

Tween 20 – polyoxyethylenu (20) sorbitan monolaurát

Tween 80 – oxyethylenu (20) sorbitan monooleát

TritonX -100 – polyetylenu izooktyl fenyl ether

SDS – laurylsulfát sodný

Korn a kolektiv [85] pro stanovení zinku zavedli nové činidlo určené pro spektrofotometrické stanovení tak, aby byla metoda selektivní, dostatečně citlivá a rychlá. Toto nové činidlo, 7 - (4 - nitrofenylazo) - 8 - hydroxychinolin - 5 - sulfonová kyselina, vytváří se zinečnatými ionty v zásaditém prostředí (pH 9,2) stabilní komplex, který vydrží až 24 hodin. Tato metoda byla úspěšně použita pro stanovení zinku v několika farmaceutických prostředcích a byla dosažena vyšší citlivost i selektivita při stanovení. Uvedená metoda dle autorů dovoluje stanovit 15 ng/ ml, tedy 15 $\mu\text{g/l}$.

Benamor a kolektiv [86] popsali metodu založenou na barevné reakci mezi Zn^{2+} s xylenolovou oranží v prostředí mezi pH 5 - 6. K docílení tohoto rozmezí je přidáván acetátový pufr a pro zajištění stability vznikajícího komplexu kationaktivní tenzid. Touto metodou je možné stanovit, dle autorů 1 - 20 $\mu\text{g Zn}^{2+}$ ve 25 ml, tedy 40 - 800 $\mu\text{g/l}$.

4 CÍL PRÁCE

Z důvodu potenciálního rizika na lidské zdraví, které představuje aplikace opalovacích prostředků s obsahem nanočástic (TiO_2 a ZnO) i velkého zájmu o tuto problematiku ze strany Evropského parlamentu a Evropské komise, jsem se zaměřila na stanovení zinku v různých typech zinkových bělob, kde je zinek rozptýlen ve formě nanočástic. Přesto, že ZnO není povolen používat v receptuře jako UV filtr, je znám jako ochranný faktor před škodlivými účinky UV záření a dokonce společně s TiO_2 patří mezi nejúčinnější. V současné době se hovoří o jeho schválení, a jelikož tomuto případnému UV filtru není věnována v odborných publikacích taková pozornost jako TiO_2 je tato práce určena právě ZnO .

Z literární rešerše dále vyplynulo, že nejvhodnější metody stanovení zinku v kosmetických prostředcích jsou AAS a spektrofotometrie. Klasické metody nejsou dostatečně citlivé a pro tento účel nejsou vhodné.

Cílem experimentální části této diplomové práce je:

- Stanovení dermální absorpce emulzních zinkových bělob různých typů metodou in vitro.
- Chemické stanovení zinku metodou AAS a ověření možnosti aplikace spektrofotometrického stanovení popsaného Benamorem a kol [86].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 DERMÁLNÍ ABSORPCE METODOU IN VITRO

Zkouška byla provedena v souladu s nařízením Komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolení a omezování chemických látek a dle metodiky OECD 428 (2004) Kožní absorpce: metoda in vitro.

5.1 Použité materiály a chemikálie

Terčíky prasečí kůže o průměru 5cm byly získány ze samice, stáří 100 – 150 dní, bez spaření. Z hřbetní části byly odděleny 2 pásy kůže o velikosti 20 x 70 cm cca 10 cm nalevo i napravo od páteře. Kůže byla zbavena podkožního tuku, štětín a byly z ní vyseknuty terčíky požadované velikosti. Dále byla použita recepční tekutina (vodný roztok 0,9% NaCl - Merck, 1% bovinní albumin – Sigma, 0,05% gentamycinu - Fluka), izopropylalkohol pro UV detekci (Lachema, Brno) a lepicí páska šířky 2,5 cm (Tesa)

K rozboru byly použity běžně komerčně dostupné nanoemulze. Jedná se o zinkové běloby s označením SOLAVEIL CZ-100 (emulze o/v, CAS nebyl nalezen) a SPECTRAVEIL FIN (emulze v/o, CAS 274900-47-9). V obou případech je v emulzi kromě ZnO (55% hm.) obsažen C₁₂-C₁₅ alkyl benzoát, polyhydroxystearová kyselina a v případě SOLAVEIL CZ-100 navíc kyselina isostearová (UNIQEMA, CZ).

5.2 Použité přístroje a zařízení

Franzova difúzní komůrka (Glasblaserai Brunswieg), termostatová lázeň se silikonovými hadičkami (Julabo MB, Labortechnik GmbH, Německo), magnetická míchačka (Variomag Poly, Labortechnik AG, Německo), elektrická plotýnka (ETA 2107).

5.3 Metodika

Na magnetické míchačce nastavené na 310 ot/min byla sestavena aparatura z Franzových difúzních komůrek (obr. 14), které byly vzájemně propojeny silikonovými hadičkami a celý systém byl napojen na vodní lázeň s termostatem a pumpou, která udržovala teplotu na 34 °C. Do spodních částí komůrek byla vložena míchadla, a poté byly naplněny recepční tekutinou. Na povrch spodní části byl vložen terčík prasečí kůže (obr. 15) rohovou vrstvou směrem vzhůru. Na střed kůže byly aplikovány testované vzorky, které byly poté překryty

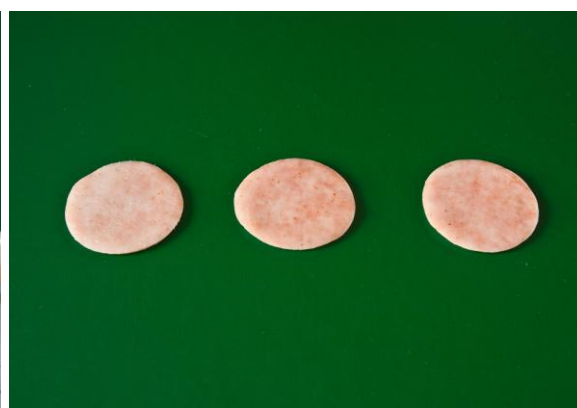
horní části difúzní komůrky. Test byl proveden ve dvou nezávislých pokusech. Testované vzorky byly v jednom testu aplikovány na 4 – 2 paralelní terčíky kůže, každý vzorek byl tedy zkoušen na 4 kůžích. Celkem bylo použito 10 kůží, z čehož 2 sloužily jako kontrola bez aplikace vzorků. Aplikovaná dávka vzorku byla 20 μl , což v případě SOLAVEILU CZ-100 odpovídalo průměrně 34,4 mg, resp. 35,2 mg ve druhém testu a pro SPEKTRAVEIL FIN 27,6 mg, resp. 30,9 mg. Další informace viz příloha P1. Doba expozice zinkové běloby na kůži byla 24 hodin. Po ukončení expozice následovalo rozdělení kůže na 13 frakcí (tab. 1), které byly podrobeny chemické analýze. První frakce (tzv. cap) byla získána oplachem horní části difúzní komůrky extrakčním činidlem – izopropylalkoholem. Tato horní část komůrky byla po 24 hodin dále ponechána v 5 ml tohoto extrakčního roztoku. Další frakci představuje zbytek běloby na kůži po expozici, který byl do izopropylalkoholu přenesen stěrem pomocí tzv. kopýtka. Stejně jako první frakce byl po 24 hodin ponechán ve 4 ml tohoto extrakčního činidla. Frakce 3 - 10 byly získány tzv. stripováním rohové vrstvy za použití lepicí pásky (obr. 16). Stripování bylo prováděno přiložením lepicí pásky na kůži a pomocí nůžek bylo docíleno ulpění složek z rohové vrstvy na pásce, která byla z kůže následně odtržena. Při každém stripu byla kůže vždy pootočena. Bylo provedeno celkem 16 stripů, tzn., že každá frakce představuje vždy 2 stripy (obr. 17). Dále proběhlo oddělení epidermis od dermis přiložením a přitlačením kůže na horkou plotnu (cca. 80°C) na 15 - 20 sekund. Epidermis byla poté odstraněna kulatou špachtlí (obr. 18). Zbylá dermis byla nůžkami rozstříhána (obr. 19). Poslední frakce pro analýzu představuje recepční tekutina, která byla odsána přímo ze spodní části Franzovy difúzní komůrky.

Tab. 1. Frakce získané při dermální absorpci metodou *in vitro*

Č. frakce	Popis	Č. frakce	Popis
1	oplach horní části difúzní komůrky	8	strip 11-12
2	látka setřená z povrchu kůže	9	strip 13-14
3	strip 1-2	10	strip 15-16
4	strip 3-4	11	epidermis
5	strip 5-6	12	dermis
6	strip 7-8	13	recepční tekutina
7	strip 9-10		



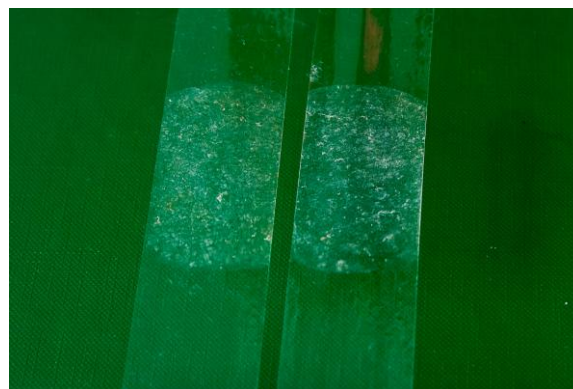
Obr. 14. Franzovy komůrky



Obr. 15. Terčičky prasečí kůže



Obr. 16. Stripování kůže



Obr. 17. Stripy kůže na lepicí pásce



Obr. 18. Oddělení epidermis od dermis



Obr. 19. Rozstříhaná dermis

Následující kapitola je zaměřena na stanovení obsahu zinku v jednotlivých frakcích (tab. 1), s čímž souvisí i jejich úprava před vlastní analýzou.

6 CHEMICKÉ STANOVENÍ ZINKU

6.1 Použité materiály a chemikálie

Kyselina chlorovodíková p.a (Petr Lukeš, CZ), toluen p.a (Petr Lukeš, CZ), oxid zinečnatý 99,5 % (Lachema, Brno), kyselina dusičná 65%, isopropylalkohol pro UV detekci (Lachema, Brno), peroxid vodíku 31% farmaceutický (Chemické závody Sokolov), xylenolová oranž (Lachema, Brno), hexadecylpyridinium chlorid monohydrát (Sigma, Německo), kyselina octová (Lachema, Brno), octan sodný (Lachema, Brno), indikátorové papírky (Lachema, Brno), lepicí izolepa šířky 2,5cm (Tesa), zinkové běloby SOLAVEIL CZ-100 (CAS nebyl nalezen) a SPEKTRAVEIL FIN (CAS 274900-47-9) (Uniqema, CZ)

6.2 Použité přístroje a zařízení

Spektrofotometr (DR/2000 firmy HACH LANGE, Polsko), analytické váhy (BA 110S, Sartorius), ultrazvuková lázeň (Powersonic PSO4000A), odstředivka (EBA20, Hettich), elektrická plotýnka (ETA 2107), mikrovlnný mineralizátor (Milestone, mls 1200), mineralizační teflonové patrony, AAS (GBC 933 AA, Austrálie).

6.3 Spektrofotometrické stanovení zinku

Jak bylo řečeno již v kapitole 3.2, pro spektrofotometrické stanovení zinku byl vybrán postup dle Beramora [86] a kolektivu. Toto rozhodnutí bylo ovlivněno faktem, že autoři v metodice uvádí citlivost stanovení v intervalu od 1- 20 $\mu\text{g Zn}^{2+}$ ve 25 ml vzorku tj. 40 – 800 $\mu\text{g/l}$. Principem metody je barevná reakce Zn^{2+} s xylenolovou oranží (XO). Vytvořený barevný komplex je stabilizován kationaktivním tenzidem cetylpyridinium chloridem (CPCl) a pro zajištění pH prostředí v rozmezí 5 – 6, důležitého pro správnou tvorbu barevného komplexu je přidáván acetátový pufr. Tento barevný komplex vzniká při pokojové teplotě ihned. Měření však byla provedena po 30 minutách od přidání všech činidel. Tento čas je potřebný pro ustálení barevného komplexu. Metodika dále uvádí použití všech činidel tvořící komplex tedy $\text{Zn}^{2+} : \text{XO} : \text{CPCl}$ v poměru 1 : 2 : 4. Množství použitého acetátového pufru neovlivňuje měřenou absorbanci a jeho optimální přídavek byl stanoven na 1 - 3 ml v případě použití 25 ml odměrných baněk.

6.3.1 Příprava reagensí

K zajištění barevné reakce bylo potřeba připravit indikátor xylenolovou oranž o koncentraci 10^{-3} mol/l, a to rozpuštěním 0,1900 g ve 250 ml destilované vody. Optimální koncentraci pro vznik stabilního komplexu pak autoři metodiky určili na koncentraci 10^{-4} mol/l, a proto byl zásobní roztok 10krát zředěn.

Jako další byl připraven tenzid cetylpiridinium chlorid (CPCI) o koncentraci 10^{-2} mol/l rozpuštěním 0,8950 g ve 250 ml destilované vody. Maximální tvorba komplexu byla dosažena při koncentraci 10^{-3} mol/l tohoto tenzidu. Stejně jako indikátor byl tedy pro vlastní stanovení 10krát ředěn.

Pro přípravu acetátového pufru byla smíchána kyselina octová a octan sodný a to následovně: do 200 ml odměrné baňky bylo přidáno 24 ml 0,2M kyseliny octové a doplněno octanem sodným (6,805 g CH_3COONa rozpuštěno ve 250 ml destilované vody). Tento poměr byl zjištěn podle chemických laboratorních tabulek a odpovídá pH 5,5. Pro stanovení zinku v této práci byl zvolen přídavek acetátového pufru ve středu uváděného rozmezí (viz výše), tedy na 2 ml.

6.3.2 Příprava modelových vzorků

Z dostupných zdrojů (viz kapitola 3.2), které popisují možnost přesného stanovení množství zinku v kosmetických a farmaceutických prostředcích bez úpravy vzorků mineralizací, byla pro úpravu vzorků jako jednoduché a rychlé alternativy vybrána hydrolyza pomocí 6M HCl [97]. Vzorky zinkové běloby byly navažovány na analytických vahách cca 0,0200 g. Stanovení probíhalo pouze s naváženou bělobou nebo byla navážka běloby nanesena na lepicí pásku. Dále vše probíhalo stejným způsobem. Ke vzorku bylo přidáno 5 ml izopropylalkoholu nebo toluenu (vysvětleno níže) a pro zajištění dokonalého protřepání byla použita ultrazvuková lázeň po dobu 10 minut. Následoval přídavek 5 ml 6M HCl (50 ml 36% HCl byla doplněna do 100 ml odměrné baňky destilovanou vodou). Připravená směs byla opět třepána v ultrazvukové lázni (10 minut) a poté vařena po dobu cca 5 minut. Po hydrolyze byla směs převedena do zásobního roztoku o objemu 100 ml. Takto připravený roztok byl pro stanovení ještě 10krát zředěn, aby bylo dosaženo požadovaných hodnot cca 10 μg Zn /ml. Odebrané množství vzorku, tj. 1 ml z tohoto zásobního roztoku bylo vždy ve 25 ml odměrné baňce doplněno činidly, potřebnými k vytvoření barevného komplexu a poté byl

obsah doplněn destilovanou vodou. Slepé pokusy byly připravovány stejným způsobem, bez přídavku vzorku.

6.3.3 Příprava vzorků získaných dermální absorpcí

Příprava vzorku získaného po dermální absorpci byla závislá na charakteru získané frakce. První frakce (capy) byly připraveny tak, že horní části difúzních komůrek byly opláchnuty a ponořeny do 5 ml izopropylalkoholu kde byly ponechány 24 hodin. K těmto roztokům pak byl přidán 1 ml HCl. Systém byl třepán v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut, a poté uveden do varu po dobu cca 5 minut, až do vypaření izopropylalkoholu. Vzniklý čirý hydrolyzát byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrných baněk, jelikož se nepředpokládalo vysoké množství zinku ve vzorku. Z tohoto roztoku bylo odebíráno po 1 ml do 25 ml odměrných baněk, do nichž bylo přidáváno potřebné činidlo pro vznik komplexu. Po 30 minutách, kdy bylo dosaženo optimálního zabarvení roztoků, byly vzorky proměřeny na spektrofotometru. Z každého vzorku byly připraveny vždy 4 paralelní zkušební roztoky z důvodu minimalizace chyby během měření. Druhé frakce (stěry z povrchu kůže) byly k měření připraveny stejným způsobem, s tím rozdílem, že po 24 hodin byl vzorek extrahován pouze ve 4 ml izopropylalkoholu.

Frakce č. 3-10, tedy stripy, byly v Erlenmayerových baňkách smíchány s toluenem, díky kterému byly z povrchu lepicí pásy odstraněny veškeré složky včetně lepidla. Pro zlepšení výtěžnosti byly stripy s toluenem třepány po 10 minut v ultrazvukové lázni a teprve poté byl ke každému vzorku přidán 1 ml 6M HCl a vzorky byly znovu v ultrazvukové lázni třepány po dobu 10 minut. Před vařením směsi byly izolepy pomocí pinzety odstraněny a dokonale omyty malým množstvím toluenu. Teprve poté byla směs vařena, opět cca 5 minut. Po hydrolyze pak byly vzorky kvantitativně převedeny do 10 ml odměrných baněk, doplněny destilovanou vodou a stanoveny jako u předchozích frakcí.

Frakce, představující oddělenou epidermis byly namočeny po 24 hodin do 4 ml izopropylalkoholu. Vyluhování zinku bylo podpořeno třepáním v ultrazvukové lázni (10 minut), poté byl přidán ke každému vzorku 1 ml 6M HCl s 10 minutovým třepáním na ultrazvukové lázni. Směs společně s kůží byla opět vařena cca 5 minut a poté, z důvodu zakalení byl roztok odstředěn 6000 ot/min po dobu 10 minut. Po odstředění byl čirý podíl převeden do 10 ml odměrných baněk a bylo provedeno spektrofotometrické stanovení obsahu zinku.

Frakce, ve kterých bylo stanovováno množství zinku z nastříhané dermis, byla zalita 5 ml izopropylalkoholu a extrahována 24 hodin. Následně byl izopropylalkohol přelit do Erlenmayerových baněk a k dermis bylo opět přidáno 5 ml izopropylalkoholu. Pro snadnější vyluhování byla směs podrobena 10 minutovému třepání v lázni. Následoval přídavek 1 ml 6M HCl a opět 10 minut ultrazvuku. Směs byla vařena bez dermis, která byla pečlivě promyta podílem izopropylalkoholu a po hydrolýze byly roztoky z důvodu zakalení odstředěny a dle potřeby přefiltrovány. Takto upravený roztok byl převeden do 10 ml odměrných baněk a podroben spektrofotometrickému stanovení, stejným způsobem jako v předchozích případech.

Frakce, získaná z recepční tekutiny, byla přímo smíchána s 1 ml 6M HCl, podrobena 10 minutovému třepání v ultrazvukové lázni, následně vařena a odstředěna, za účelem odstranění sraženiny bílkovin. Čirý roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou. Pro spektrofotometrické stanovení byl roztok připraven stejným způsobem jako v předchozích případech.

Slepé pokusy pro jednotlivé frakce byly připravovány stejným způsobem jako v případě vzorků. Měření absorbance bylo provedeno na spektrofotometru HACH DR/2000 (viz obr. 20).



Obr. 20. Spektrofotometr HACH DR/2000

6.3.4 Kalibrační křivka

Pro sestavení kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok zinku o koncentraci 10^{-3} mol/l. Toho bylo dosaženo navážením 0,8133 g ZnO, což odpovídá 0,6533 g zinku. Tato

navážka byla rozpuštěna v 500 ml destilované vodě. K roztoku bylo přidáno cca 4 – 5 kapek 0,001M HCl, pro snadnější a úplné rozpuštění ZnO. Naředěním bylo docíleno zásobního roztoku s 6,53 $\mu\text{g Zn/ ml}$. Z tohoto zásobního roztoku byla vytvořena kalibrační řada pracovních roztoků ve 25 ml odměrných baňkách o koncentracích od 1 – 13 $\mu\text{g Zn/ 25 ml}$ (40 – 520 $\mu\text{g Zn/ l}$). Pro zjištění správnosti a přesnosti sestavené kalibrační křivky byl připraven zkušební roztok o koncentraci 4 $\mu\text{g Zn/ ml}$ (0,498 g ZnO ~ 0,400 g Zn^{2+} bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody, tento roztok byl dále ředěn). Z tohoto zásobního roztoku byla připravena řada roztoků o známé koncentraci zinku, která byla určena pro spektrofotometrické stanovení.

6.4 Stanovení zinku metodou AAS

6.4.1 Mineralizace zinkových bělob

K mineralizaci bylo naváženo 0,0500 g zinkové běloby do teflonových mineralizačních patron. K navážce vzorku byly přidány 3 ml 65 % kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Takto nachystané vzorky byly podrobeny mineralizaci v mikrovlnném mineralizátoru na ÚIOŽP. Po tomto kroku byly vzorky kvantitativně převedeny do 25ml odměrných baněk, doplněny destilovanou vodou a podrobeny AAS analýze na pracovišti ÚIOŽP.

Mineralizací byla zjištěna nehomogenita vzorku, což se projevilo i na výsledcích stanovení.

6.4.2 Stanovení modelových vzorků

K tomuto účelu byly použity vzorky upravené pro spektrofotometrické stanovení. Pro analýzu byly odebírány vzorky přímo ze zásobních roztoků.

6.4.3 Stanovení vzorků získaných dermální absorpcí

Pro vlastní měření byly použity vzorky upravené stejným způsobem jako v případě spektrofotometrického stanovení s tím rozdílem, že po provedení hydrolýzy byla směs převedena do zásobního roztoku, který byl po naředění podroben AAS analýze na pracovišti ÚIOŽP. Slepý pokus pro stanovení byl prováděn stejným způsobem, s tím rozdílem, že nebyl použit zkoumaný vzorek.

7 STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC OXIDU ZINEČNATÉHO A JEJICH DISTRIBUCE

V Centru polymerních materiálů FT byla změřena velikost částic ZnO u jednotlivých emulzních zinkových bělob. Jednalo se o vzorky SOLAVEIL CZ – 100 (emulze o/v) a SPEKTRAVEIL FIN (emulze v/o). Měření bylo provedeno na přístroji ZETA NANO ZS (Malvern Instruments, Velká Británie), který je uveden na obrázku 21.



Obr. 21. ZETA NANO ZS (Malvern Instruments)

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Kalibrace

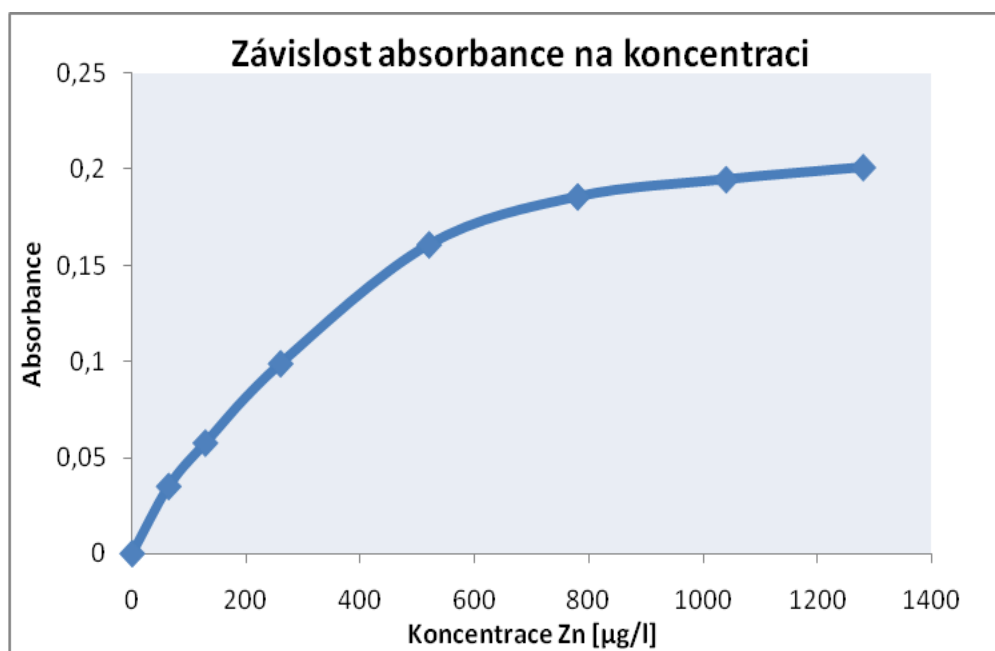
Příprava zásobního roztoku byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.2. Jelikož při přípravě nedocházelo ke správnému zabarvení pracovních roztoků po doplnění jednotlivých činidel zajišťující barevnou reakci a stabilitu komplexu v poměru uváděném v kapitole 4.3 (přídavek 2 ml XO a 1 ml CPCl), muselo být použité množství jednotlivých činidel upraveno. Po této úpravě již nebyl zachován poměr uvedený v metodice. Nedostatečné zbarvení roztoků bylo pravděpodobně způsobeno malým množstvím indikátoru. Do 25 ml odměrné baňky bylo tedy nově k analyzovanému roztoku přidáváno vždy 2,5 ml XO a 1,2 ml CPCl (vysvětleno výše). Bylo tedy navýšeno množství indikátoru a v závislosti na tom i tenzidu. Množství acetátového pufru zůstalo nezměněno, činilo 2 ml.

Pro sestavení kalibrační křivky bylo nutné stanovit vhodnou vlnovou délku proměřením absorbance všech připravených vzorků. K určení této vlnové délky byl vybrán pracovní roztok ze středu kalibrační řady. Vlnová délka, při které byla naměřena nejvyšší absorbance, byla brána za pracovní délku a použita pro další měření. Rovněž byla stanovena maximální absorbance slepého pokusu při vlnové délce 450 nm. Tato hodnota je dostatečně vzdálená od maximální vlnové délky vzorků, a proto nemůže dojít k interferenci. V metodice byla uváděna jako nejvhodnější vlnová délka 580 nm, při které byla naměřena nejvyšší absorbance vzniklého barevného komplexu. Proměřením připravených roztoků však bylo dosaženo nejvyšší absorbance při vlnové délce 570 nm, a proto tato hodnota byla využita pro další stanovení. Po zjištění pracovní vlnové délky byly při této hodnotě proměřeny všechny roztoky kalibrační řady a byla sestavena kalibrační křivka (viz tab. 2 a obr. 22).

Tab. 2. Naměřené hodnoty absorpance při 570 nm

Vzorek * [10 ⁻³ l]	Koncentrace zinku v roztoku [μg/l]	Průměrná absorpance
0,25	64	0,035
0,5	128	0,0576
1,0	260	0,099
2,0	520	0,161
3,0	780	0,186
4,0	1040	0,195
5,0	1280	0,2013

*Vzorek (napipetované množství roztoku zinku, použité pro stanovení)



Obr. 22. Graf závislosti naměřené absorpance na koncentraci

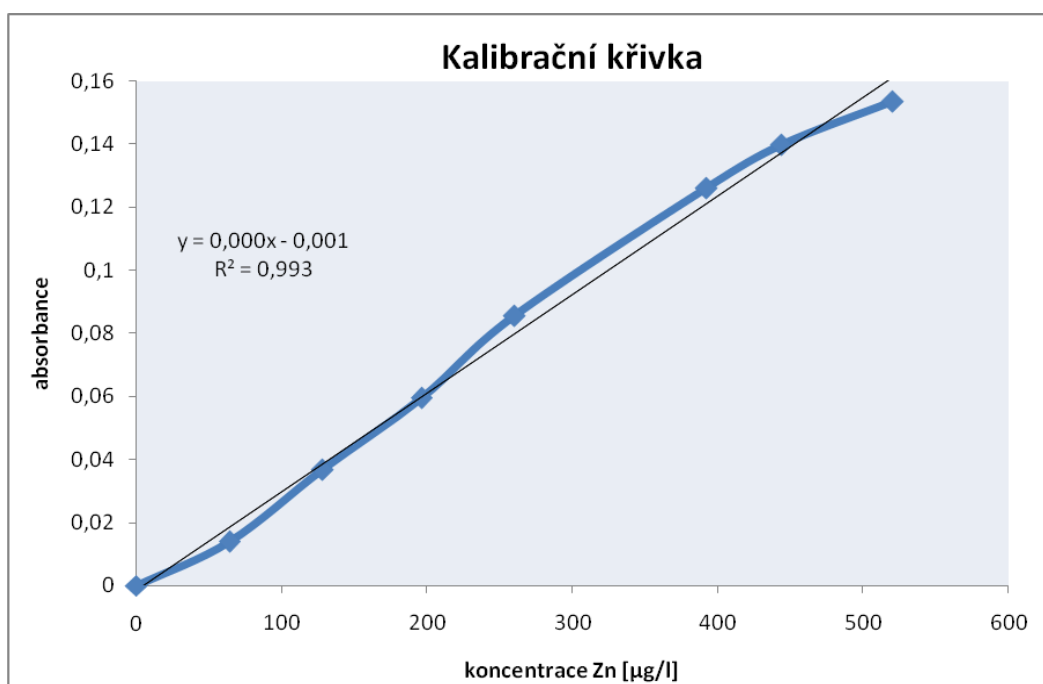
Je patrné, že došlo k zakřivení kalibrační křivky při koncentracích nad 600 μg/l, tedy cca 15 μg/ ve 25 ml, což koresponduje se zjištěním Benamora [107]. To znamená, že při vyšších koncentracích již neplatí Lambert – Beerův zákon. Stanovení kalibrační křivky bylo tedy provedeno znovu, a to pouze do koncentrace 13 μg Zn /ml (520 μg Zn /l). Výsledek je

znázorněn v tab. 3 a obr 22. Z grafu je zřejmé, že experimentální data lze proložit přímkou závislosti. Pomocí programu Excel byla vypočtena regresní rovnice $y = 0,012x - 0,001$ a také korelační faktor $R^2 = 0,993$. Jeho hodnota blíží se 1 dokumentuje dobrou shodu naměřených hodnot a matematického modelu.

Tab. 3. Výsledky měření kalibrační křivky

Vzorek * $[10^{-3} \text{ l}]$ l	Koncentrace zinku v roztoku $[\mu\text{g/l}]$	Průměrná absorbance
0,25	64	0,0138
0,5	128	0,0367
0,75	196	0,0594
1,0	260	0,0855
1,5	392	0,1261
1,7	444	0,1398
2,0	520	0,1535

*Vzorek (napipetované množství roztoku zinku, použité pro stanovení)



Obr. 23. Graf kalibrační křivky (Závislost absorbance na koncentraci)

8.1.1 Stanovení koncentrace modelových vzorků

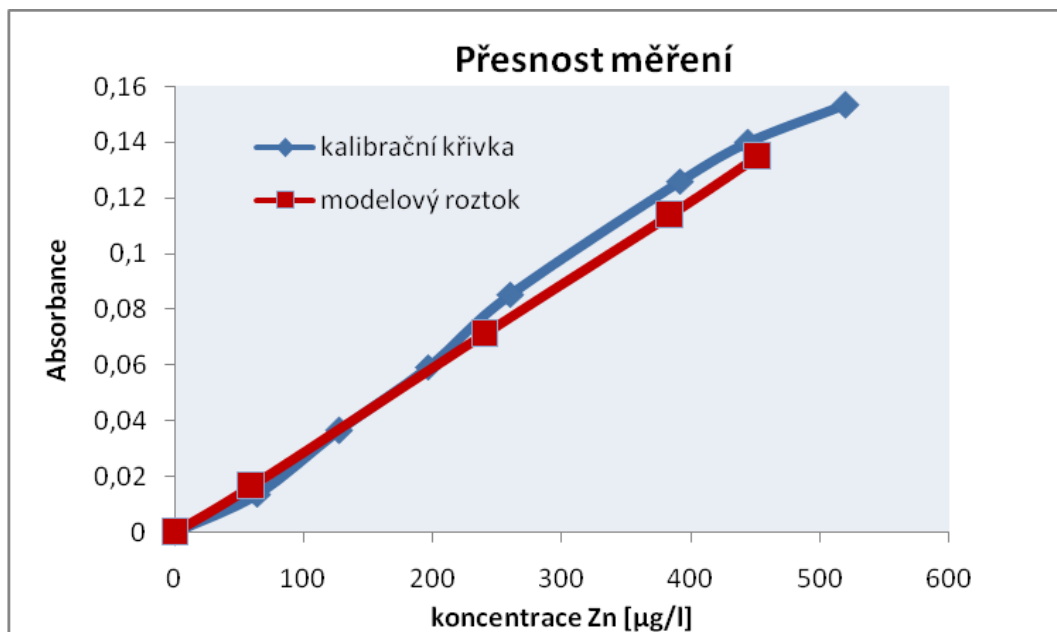
Pro kontrolu správnosti a přesnosti měření byl připraven modelový roztok $4\mu\text{g Zn} / 1\text{ ml}$, dle kapitoly 6.3.4. Byla vytvořena řada roztoků o známé koncentraci, viz tab. 4 a následně byly změřeny jejich absorbance. Z regresní rovnice byla poté vypočtena příslušná koncentrace roztoků.

Tab. 4. Výsledky měření přesnosti kalibrační křivky

Vzorek * [10^{-3} l]	Průměrná absorbance	Předpokládané množství zinku [$\mu\text{g/l}$]	Stanovené množství zinku [$\mu\text{g/l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
0,5	0,0164	80	60	25
1,5	0,071	240	240	0
2,5	0,1138	400	384	4
3	0,1348	480	452	6

*Vzorek (napipetované množství roztoku zinku, použité pro stanovení)

Rozdíl mezi vypočtenou a naměřenou hodnotou je uveden rovněž v tabulce č. 4. Je zřejmé, že u nízké koncentrace $80\mu\text{g/l}$ byla naměřena koncentrace $60\mu\text{g/l}$, což odpovídá odchylce 25%. U koncentrace $240\mu\text{g/l}$ je chyba stanovení nulová a u koncentrace 400 a $480\mu\text{g/l}$ je pak rozdíl mezi teoretickou a naměřenou hodnotou 4 resp. 6 %. Na základě tohoto zjištění byly reálné vzorky ředěním upraveny na koncentraci pohybující se mezi hodnotami 240 – $400\mu\text{g/l}$, což odpovídá středu kalibrační závislosti. Grafickým vyjádřením odchylky měření modelového roztoku zinku od kalibrační křivky vyjadřuje obr. 24.



Obr. 24. Graf přesnosti měření (Závislost absorbance na koncentraci)

Po sestavení kalibrační závislosti a ověření přesnosti měření bylo přistoupeno ke stanovení obsahu zinku v zinkové bělobě.

8.2 Metodika hydrolýzy zinkových bělob

Dle metodiky stanovení zinku v zinkové masti [97] bylo k hydrolýze zinkové běloby použito 6 M HCl. Naváženo bylo 0,0200 g zinkové běloby, ke které bylo přidáno 5 ml izopropylalkoholu, v případě aplikace vzorku na lepicí pásku toluenu a 5 ml 6M HCl. Směs byla protřepána 10 minut v ultrazvukové lázni a vařena na vařiči cca 5 minut, do doby než byl odpařen vrchní podíl směsi, který odpovídal izopropylalkoholu nebo toluenu. Během hydrolýzy došlo k vyčeření roztoku, po které byl převeden do 100 ml odměrné baňky a 10krát zředěn, aby bylo dosaženo koncentrace ve středu kalibrační křivky, kde je měření nejpresnější, jak bylo diskutováno výše.

Jelikož výrobci deklarují 55% ZnO v suspenzi, veškeré výsledky byly na tento obsah přepočítány. Stanovení bylo provedeno jak u samotné navážky zinkové běloby, tak byla tato navážka nanášena na lepicí pásku. Tento způsob analýzy simuloval vzorky získané dermální absorpcí. Nejdříve byl pro tento účel použit izopropylalkohol. V případě jakéhokoli přeložení během hydrolýzy a manipulace se vzorkem nebylo dosaženo odstranění veškerého naváženého množství zinkové běloby a proto bylo toto extrakční činidlo vyměněno za to-

luen, kterým bylo již vizuálně docíleno lepší extrakce běloby z pásky. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6, v případě izopropylalkoholu a tabulkách 7 a 8 pro toluen.

8.2.1 Stanovení zinkové běloby s izopropylalkoholem

Tab. 5. Zinková běloba s izopropylalkoholem jako extrakčním činidlem bez izolepy

Navážka vzorku zinkové běloby [$\mu\text{g}/10^3 \text{ l}$]	Průměrná absorbance	Předpokládaná hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Stanovená hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
204	0,0798	360,1	269,4	-25
216	0,0859	381,8	289,8	-24
191	0,0657	337,6	222,3	-34
221	0,08373	390,1	282,4	-28
224	0,0821	395,9	277,0	-30

Tab. 6. Zinková běloba nanesená na izolepu s extrakčním činidlem izopropylalkoholem

Navážka vzorku zinkové běloby [$\mu\text{g}/10^3 \text{ l}$]	Průměrná absorbance	Předpokládaná hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Stanovená hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
198	0,0790	369,1	266,7	-28
222	0,1101	392,4	370,5	-5,6
199	0,0688	351,7	232,6	-34
230	0,1067	406,5	359,1	-12
193	0,1035	341,1	348,3	-2

8.2.2 Stanovení zinkové běloby s toluenem

Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako v případě izopropylalkoholu. V případě vzorků, kde byla ke stanovení použita izolepa, byla před vařením vyjmuta a dokonale opláchnuta malým podílem toluenu.

Tab. 7. Zinková běloba s toluenem jako extrakčním činidlem bez izolepy

Navážka vzorku zinkové běloby [$\mu\text{g}/10^3 \text{ l}$]	Průměrná absorpance	Předpokládaná hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Stanovená hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
191	0,0907	337,6	305,7	- 9
241	0,1109	426,0	373,0	-12
204	0,1009	360,6	333,0	-6
206	0,0958	364,1	322,5	-11
258	0,1245	456,0	418,3	-8

Tab. 8. Zinková běloba nanesená na izolepu s extrakčním činidlem toluenem

Navážka vzorku zinkové běloby [$\mu\text{g}/10^3 \text{ l}$]	Průměrná absorpance	Předpokládaná hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Stanovená hmotnost zinku (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
201	0,0795	355,3	268,3	-24
205	0,0894	362,3	301,4	-17
238	0,0961	420,7	323,6	-23
237	0,1063	418,9	357,7	-15
211	0,0852	372,9	287,2	-23

Na základě srovnání výsledků uvedených v tabulce 5 a 7, lze tvrdit, že výsledky při použití v toluenu jako extrakčního činidla jsou podstatně lepší a rozdíl ve stanoveném množství dosahuje max. 12 %. V případě použití izopropylalkoholu jako extrakčního činidla se chyba pohybuje v rozsahu 25 – 35%. Pokud porovnáme výsledky v tabulce č. 6 a 8, tedy v případě, kdy byl vzorek nanesen na lepicí pásku a extrahován izopropylalkoholem (tab. 6) je zřejmé, že se chyba měření resp. rozdíl mezi vypočtenou a naměřenou hodnotou pohybuje v intervalu 2 – 34 %. Pokud byl jako extrakční činidlo použit toluen, pohybuje se chyba v intervalu 15 – 24 %, přičemž je zřejmé, že rozptyl mezi měřením není tak velký jako při použití izopropylalkoholu.

Co je pozoruhodné, ve všech případech měření byly získány menší hodnoty, než odpovídá vypočtené hodnotě, při předpokladu obsahu 55% ZnO v aplikované suspenzi. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k určení množství ZnO v emulzních zinkových bělobách SPECTRAVEIL FIN a SOLAVEIL CZ -100 pomocí AAS.

8.3 Stanovení zinku v zinkových bělobách

Způsob přípravy vzorku mineralizací HNO_3 a H_2O_2 je uveden v kapitole 6.4.1. Upravené vzorky byly podrobeny analýze AAS. Slepý pokus pro toto stanovení obsahoval všechny reagenty jako u mineralizovaných vzorků, které byly doplněny do objemu 25 ml destilovanou vodou. Byly stanovovány paralelně 3 vzorky od každé běloby (SPECTRAVEIL FIN a SOLAVEIL CZ-100). Výsledky AAS analýzy jsou shrnuty v tabulce 9.

Tab. 9. Výsledky mineralizace vzorku a stanovení metodou AAS

Navážka vzorku zinkové běloby [mg]	Předpokládaná hmotnost vzorku (100%) [mg/l]	Stanovená hmotnost vzorku AAS [mg/l]	Množství zinku [%]	Množství ZnO [%]
<i>SPECTRAVEIL FIN- vzorek 1</i>				
42,2	1688	699,0	41,4	51,5
57,0	2280	876,5	38,4	47,9
<i>SPECTRAVEIL FIN - vzorek 2</i>				
48,8	1952	589,0	30,2	37,6
<i>SOLAVEIL CZ 100 – vzorek 1</i>				
63,1	2524	1153,0	45,7	56,9
66,9	2676	1250,0	46,7	58,1
<i>SOLAVEIL CZ 100 – vzorek 2</i>				
50,3	2,012	0,7905	39,3	48,9

Je signifikantní, že v případě vzorku běloby SPECTRAVEIL FIN nebylo ani v jednom případě dosaženo výrobcem deklarovaného množství 55% ZnO a zjištěné hodnoty navíc kolísají v rozmezí cca 38 – 52% ZnO. Je jasné, že vzorek tedy nebyl homogenní. V případě vzorku běloby SOLAVEIL CZ – 100 bylo prokázáno ve dvou měřeních cca 56 a 58%, což odpovídá uváděnému množství. Jeden vzorek však vykazoval hodnotu pouhých cca 49 %, čili lze také konstatovat nehomogenitu vzorku v objemu. Na základě tohoto zjištění lze vysvětlit odchylky spektrofotometrického stanovení zinku v měřených preparátech, což bylo diskutováno v předešlé kapitole.

8.4 Rozdíl mezi stanovením zinku metodou AAS a spektrofotometrií

V další fázi bylo přistoupeno ke zjištění přesnosti měření stejných vzorků zinkových bělob metodou AAS a spektrofotometricky. V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky měření vzorků

bez aplikace na lepicí pásku a těch, které na lepicí pásku aplikovány byly. Hydrolyza vzorku varem proběhla buď bez lepicí pásky, nebo s ní. Dále jsou uvedeny výsledky stanovení samotné běloby. Z tabulky je zřejmé, že bylo docíleno dobré shody mezi hodnotami zjištěnými oběma metodami. Ještě větší shody bylo dosaženo v případě stanovení roztoku zinku, bez nutnosti mineralizace, viz tabulka 11. Lze tedy prohlásit, že použitá metodika spektrofotometrického stanovení zinku je aplikovatelná v kosmetických emulzích a je zároveň dostatečně citlivá a přesná.

Tab. 10. Hodnocení výsledků odchylky stanovených u zinkových bělob

Navážka vzorku [$\mu\text{g}/10^{-3} \text{ l}$]	Předpokláda- ná hmotnost Zn (55%) [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Stanovená hmotnost Zn (55%) SFM [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]	Stanovená hmotnost Zn (55%) AAS [$\mu\text{g}/\text{l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
BĚLOBA BEZ IZOLEPY					
200	353,5	348,3	-1,5	306,0	-13
214	378,2	359,8	-4,9	363,1	-4,0
BĚLOBA + IZOLEPA (nevařená)					
225	394,1	322,4	-18	365,5	-7,3
235	415,4	394,1	-5	386,9	-6,8
BĚLOBA + IZOLEPA (povařená)					
202	357,0	321,9	-10	336,3	-5,8
182	321,7	271,4	-15	309,7	-3,72

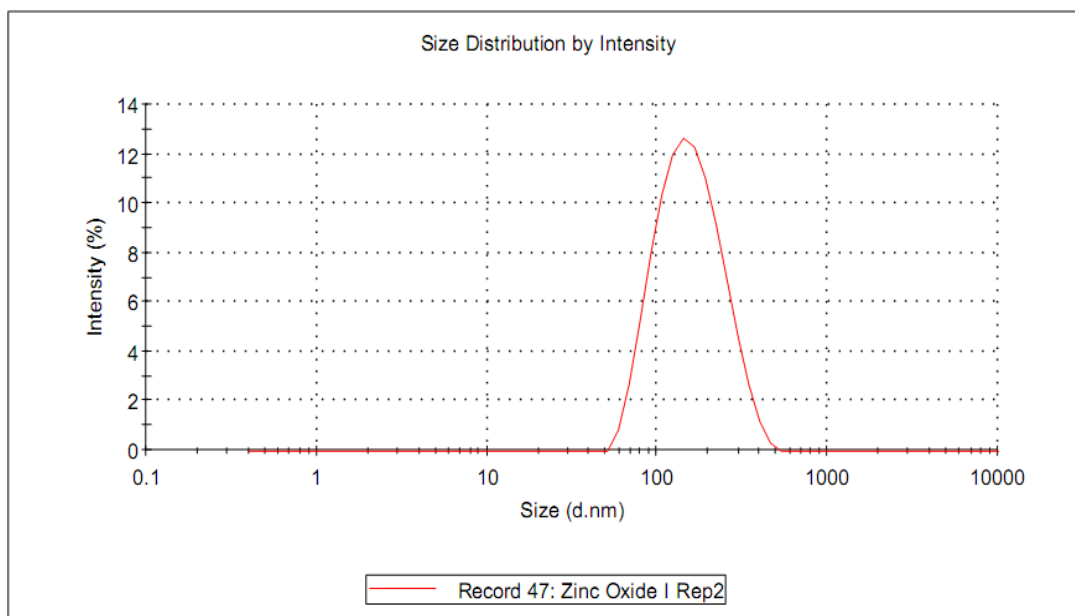
*SFM- spektrofotometrická metoda

Tab. 11. Hodnocení odchylky při použití roztoků zinku

Předpokládaná hmotnost Zn (55%) [$\mu\text{g/l}$]	Stanovená hmotnost Zn (55%) SFM [$\mu\text{g/l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]	Stanovená hmotnost Zn (55%) AAS [$\mu\text{g/l}$]	Rozdíl ve stanoveném množství [%]
174,2	171,7	-1,4	167,7	-3,7
261,3	262,1	+0,3	259,7	-0,6

8.5 Měření velikosti částic ZnO a jejich distribuce

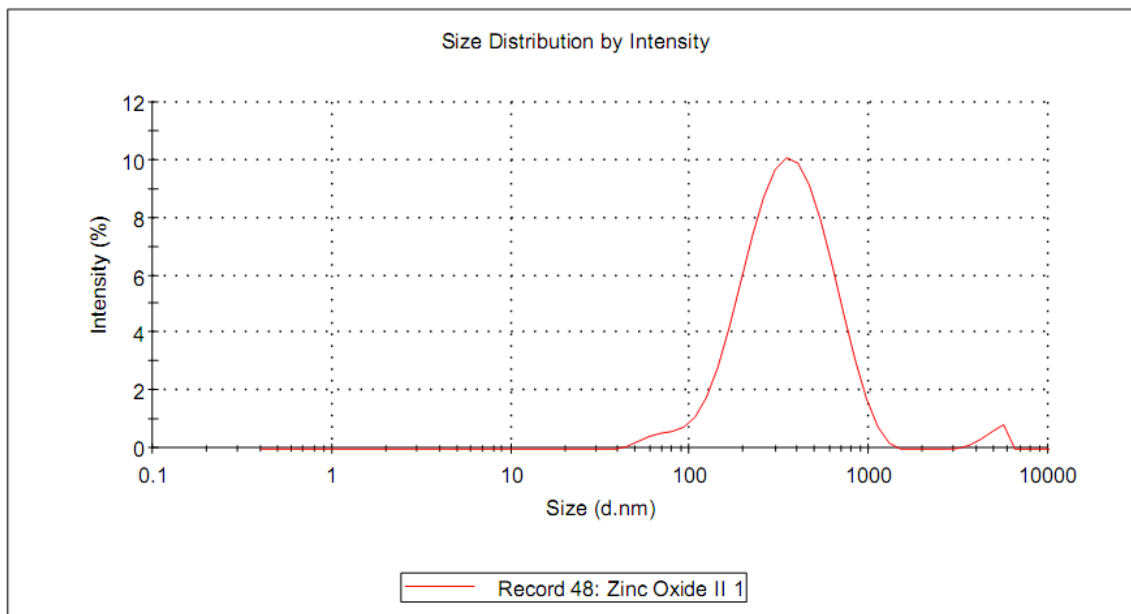
Pro lepší charakteristiku použitých vzorků zinkových bělob SOLAVEIL CZ - 100 a SPECTRAVEIL FIN byla změřena velikost ZnO a jejich distribuce přístrojem ZETA NANO ZS (Malvern Instruments). V případě vzorku SOLAVEIL CZ – 100 byla zjištěna průměrná velikost částic 139 nm a reálně nízká distribuční křivka v intervalu 50 – 140 nm, což uvádí záznam na obr. 25.



Obr. 25. Distribuční křivka zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN

V případě zinkové běloby s názvem SOLAVEIL CZ -100 je průměrná velikost částic ZnO 302 nm. Jejich polydisperzita je rovněž větší než u předchozího preparátu. Velikost částic

se pohybuje v rozmezí 30 až cca 1000 nm. Byla rovněž detekována další frakce o velikosti cca 6000 nm, viz obr. 26. Mohlo by se jednat o další frakci této velikosti nebo spíše, což je pravděpodobnější o aglomerát vytvořený sloučením menších částic.



Obr. 26. Distribuční křivka zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100

Na základě provedených měření lze konstatovat, že vzorky měly značnou tendenci aglomerovat. Z toho vyplývá naprostá nezbytnost před aplikací podobných emulzí podrobit je před každým stanovením dokonalé homogenizaci a popř. provést kontrolní měření.

8.6 Výsledky vzorků dermální absorpce

Na základě uspokojivých výsledků při stanovení zinku v zinkových bělobách SPECTRAVEIL FIN a SOLAVEIL CZ -100 jak pomocí spektrofotometrie, tak metody AAS, bylo přistoupeno k analýze vzorků získaných dermální absorpcí ve SZU v Praze.

V tabulce 12 jsou uvedeny výsledky stanovení penetrace zinku do jednotlivých vrstev kůže ze zkoumaného preparátu SOLAVEIL CZ – 100. Paralelně byly stanoveny i dva kontrolní vzorky jako slepé pokusy. Z tabulky vyplývá, že téměř ve všech případech bylo spektrofotometrickou metodou naměřeno vyšší množství zinku než metodou AAS. Tyto zjištěné množství jsou vyjádřeny jako výtěžnost v procentech, pro jednotlivé frakce. Rozdíly jsou zvláště výrazné, pokud se jedná o větší množství zinku, tj. v případě stěrů z povrchu kůže. Tato tendence je patrná ve všech dalších případech. Za věrohodnější samozřejmě nutno brát výsledky AAS, protože se zde nemohou uplatňovat interference způsobené přítomností

organických látek pocházejících z kůže. Z tabulky je rovněž patrné, že ZnO je prakticky zadržen rohovou vrstvou pokožky, jelikož v samotné epidermis byla naměřena nejvyšší výtěžnost pouhých 0,2 %, což je zanedbatelné množství, stejně jako v případě dermis a recepční tekutině. Minimální množství stanovené spektrofotometricky a metodou AAS jsou srovnatelné při porovnání s hodnotami zjištěnými u kontroly, které jsou pro přehlednost zprůměrovány. Pokud se podíváme na hodnoty návratnosti naměřeného množství (tab. 13) ve všech vrstvách k původně nanesenému množství zinku v zinkové bělobě, zjistíme, že v případě metody AAS kolísají ve větším rozmezí, a to cca mezi 43 – 91%. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny nehomogenitou aplikovaného vzorku, jak bylo diskutováno výše.

Tab. 12. Výsledky stanovení penetrace zinku do jednotlivých vrstev kůže z preparátu SOLAVEIL CZ – 100.

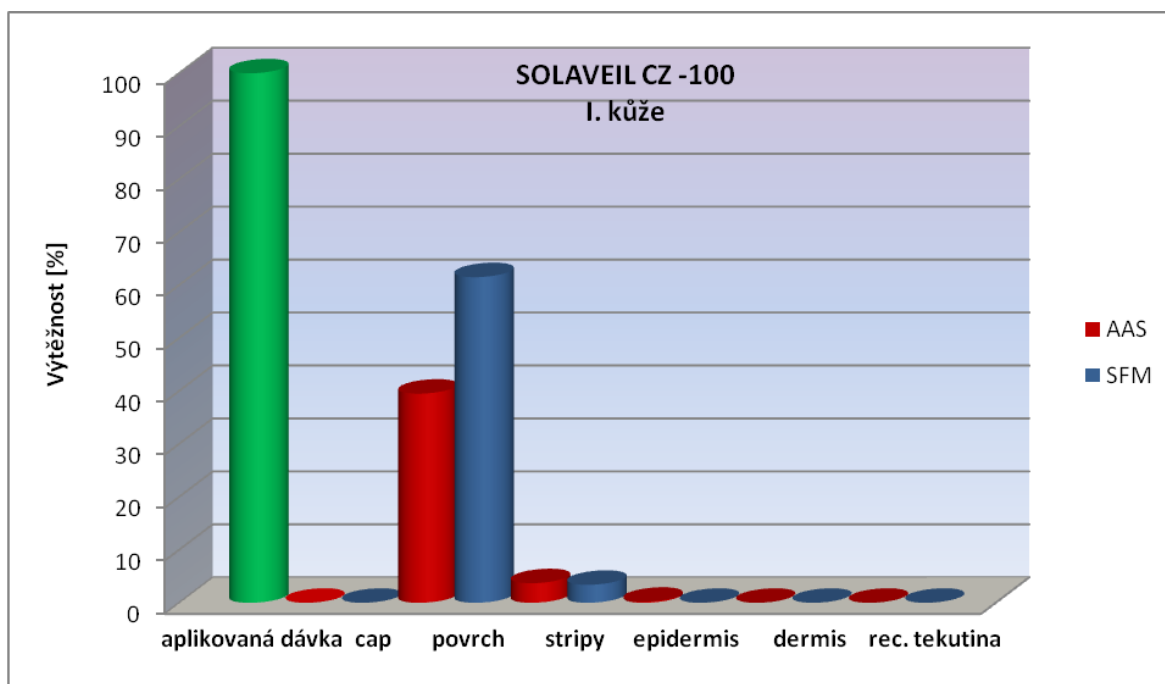
Množství zinku* [mg]			15,1855				15,5463			
	Průměrné hodnoty kontroly		I. kůže		II. kůže		III. kůže		IV. kůže	
Metoda	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM
Výtěžnost [%]										
Cap	0	0,1	0	0	0	0,6	0	0,3	0	0,3
Povrch (surface)	0	0,3	39,5	61,5	81,5	121,1	45,8	54,9	75,1	149,1
Stripy	0	0,1	3,7	3,4	9,7	28,7	4,7	0,9	7,0	15,9
Epidermis	0	0,1	0,2	0	0,1	0	-	-	0,1	0
Dermis	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,2	0	0
Rec.tekutin a	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0

*Množství zinku [mg] (Jedná se o navážku zinkové běloby, kde pro účely vyhodnocení je tato navážka přepočítána na obsah zinku)

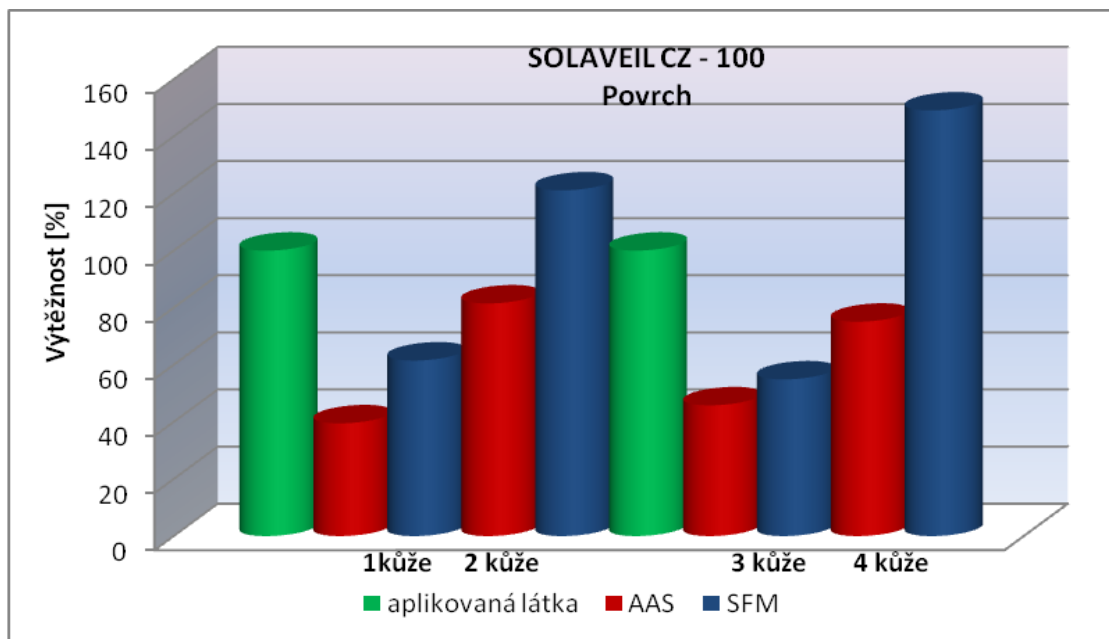
Tab. 13. Návratnost množství zinku z původně naneseného z preparátu SOLAVEIL CZ - 100

	Průměrné hodnoty kontroly		I. kůže		II. kůže		III. kůže		IV. kůže	
	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM
Návratnost [%]	-	-	43,4	64,9	91,4	150,6	50,5	56,3	82,2	165,3

Obsahy stanovených hodnot zinku v jednotlivých vrstvách kůže č. I. u zmiňované zinkové běloby SOLAVEIL CZ -100 dále uvádí obr. 27. Je z něj patrné, že ZnO penetruje pouze do vrchní vrstvy epidermis. Rozdíly mezi stanoveným množstvím zinku pro jednotlivé kůže u frakcí získaných stěrem preparátu SOLAVEIL CZ-100 představuje obr. 28. Vyplývá z něj, že hodnoty stanovené spektrofotometricky jsou ve všech případech vyšší a u kůží č. 2 a 4 dokonce převyšují nanesené množství. Důvodem, proč je tomu tak je námětem dalšího zkoumání.



Obr. 27. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č. I u zinkové běloby SOLAVEIL CZ - 100



Obr. 28. Výtěžnost zinku u frakcí získané stěry z povrchu jednotlivých kůží u zinkové běloby SOLAVEIL CZ - 100

V případě druhé zinkové běloby s názvem SPECTRAVEIL FIN je situace obdobná, výsledky měření jsou vyjádřeny v tabulce 14. Opět lze konstatovat rozdíly mezi hodnotami zjištěné spektrofotometrickým stanovením a metodou AAS, přičemž spektrofotometricky bylo AAS získáno několikanásobně vyšší množství zinku, což je nejmarkantnější v případě stripů. Vyšší hodnoty u spektrofotometrické metody mohou být způsobeny chybou měření malých koncentrací stanovované látky, což samozřejmě platí i pro předchozí měření penetrace zinku do jednotlivých vrstev z preparátu SOLAVEIL CZ – 100.

Z dosažených výsledků lze také tvrdit, že zinek nepenetruje hlouběji do dermis stejně jako v minulém případě, což je dobře patrné z obr. 29, které vyjadřuje stanovené množství zinku u kůže č.III. Srovnatelných výsledků s preparátem SOLAVEIL CZ – 100 bylo dosaženo také při porovnání návratnosti (viz tabulka 15), kdy v případě stanovení metodou AAS bylo dosaženo rozmezí cca 43 – 83%. Pokud porovnáme penetraci v závislosti na velikosti částic, která činí v případě SPECTRAVEIL FIN průměrně 139 nm, což je zhruba 3krát menší velikost částic než byla zjištěná u SOLAVEILU CZ - 100, lze se tedy přiklonit k tvrzení, že velikost částic nemá na penetraci zlatelný vliv.

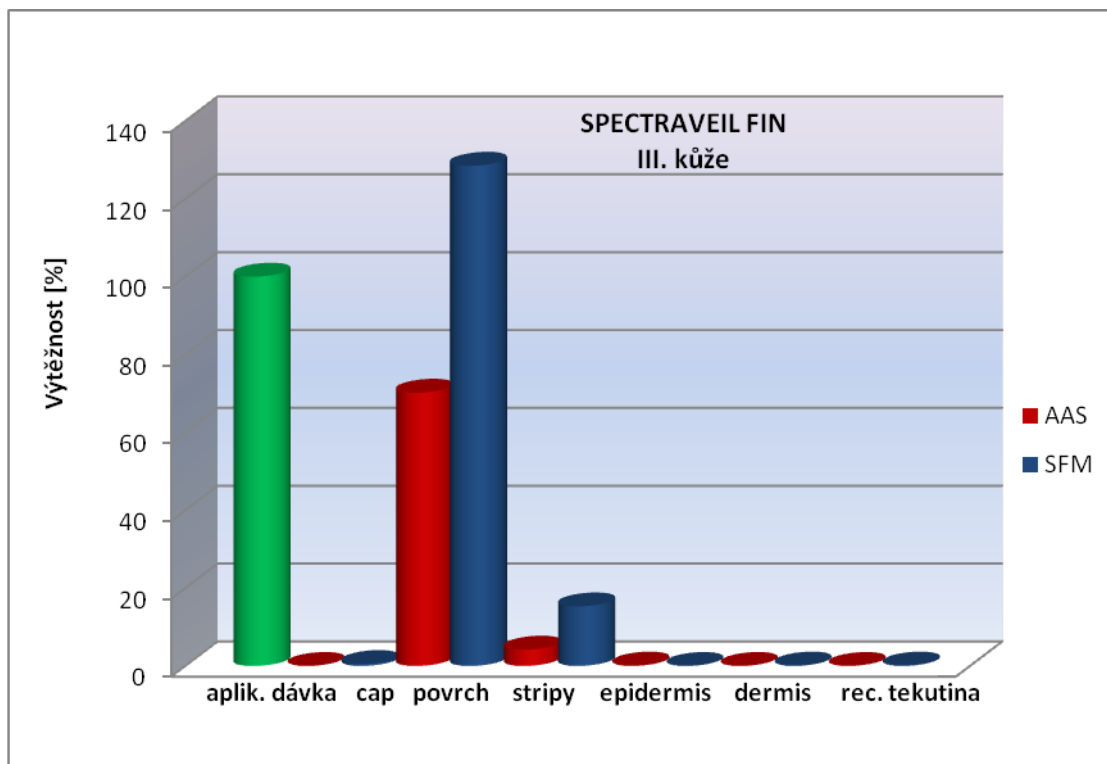
Tab. 14. Výsledky stanovení penetrace zinku do jednotlivých vrstev kůže z preparátu SPEKTRAVEIL FIN

Množství zinku * [mg]	12,1808						13,3536			
	Průměrné hodnoty kontroly		I. kůže		II. kůže		III. kůže		IV. kůže	
Metoda	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AA S	SFM
Výtěžnost [%]										
Cap	0	0,1	-	0,5	0	1,0	0	0,5	0	1,1
Povrch (surface)	0	0,3	35,6	59,7	67,0	82,4	70,2	128,5	81,0	113,7
Stripy	0	0,1	7,4	19,4	8,2	29,4	4,2	15,3	2,1	5,9
Epidermis	0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0	-	-
Dermis	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1
Rec.tekutina	0	0,1	0	0,1	-	-	0	0,1	0	0,1

*Množství zinku [mg] (Jedná se o navážku zinkové běloby, kde pro účely vyhodnocení je tato navážka přepočítána na obsah zinku)

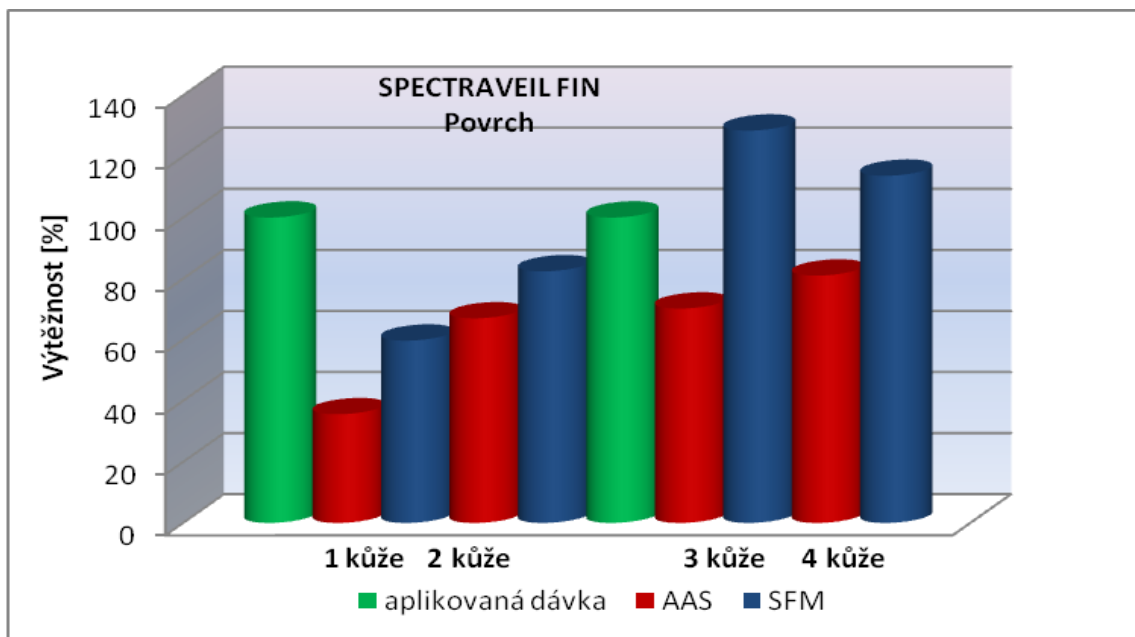
Tab. 15. Návratnost množství zinku z původně naneseného z preparátu SPECTRAVEIL FIN

	Průměrné hodnoty kontroly		I. kůže		II. kůže		III. kůže		IV. kůže	
	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM	AAS	SFM
Návratnost [%]	-	-	43,2	79,9	75,4	112,9	74,5	144,5	83,1	120,9



Obr. 29. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č.III u zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN

Přehledné výsledky z frakcí získaných aplikací zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN na povrch kůže jsou uvedeny v obr. 30. Závěry jsou obdobné jako v případě předchozího typu zinkové běloby. To znamená, že spektrofotometrickou metodou je stanoveno vždy vyšší množství zinku než při použití AAS. V některých případech rovněž došlo k určení množství zinku překračující původního nanesené množství.

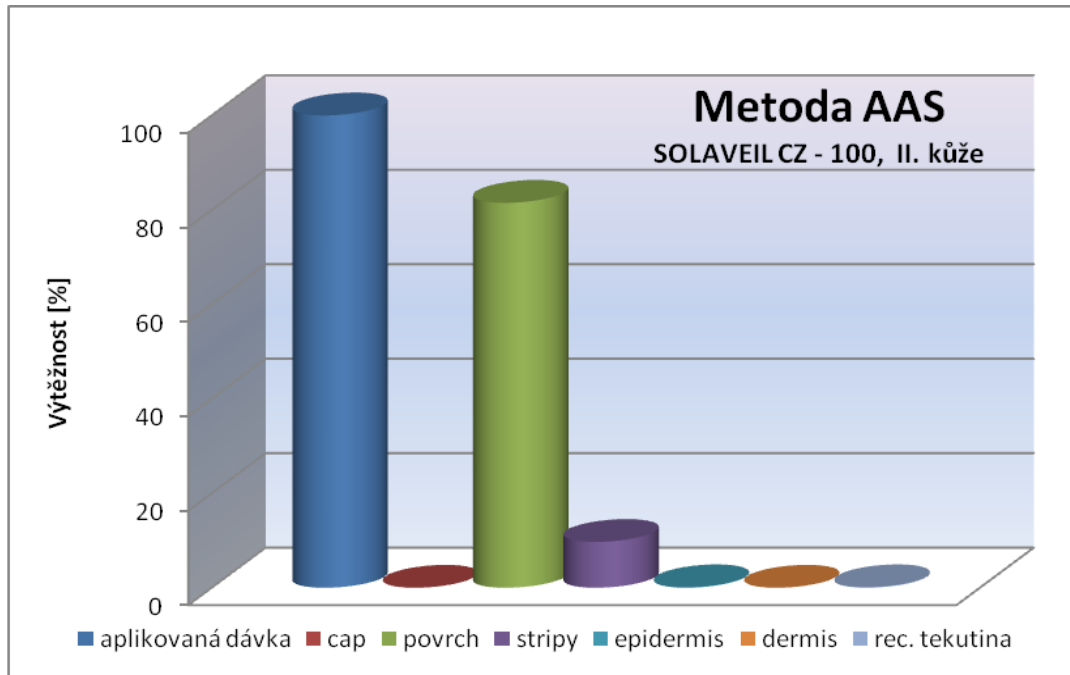


Obr. 30. Výtěžnost zinku u frakcí získané stěry z povrchu jednotlivých kůží u zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN

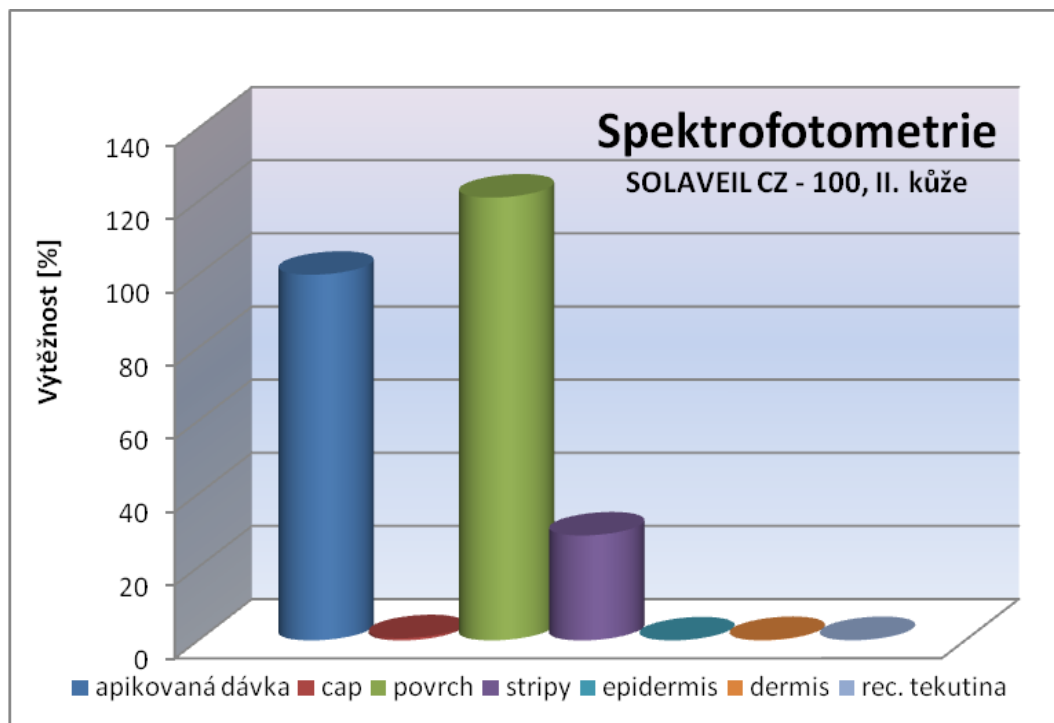
Opět nutno konstatovat, že spektrofotometrické stanovení je zatíženo systematickou chybou způsobenou přítomností kůže ve stanovovaném vzorku a jak bylo řečeno dříve, vyšší hodnoty u spektrofotometrické metody mohou být způsobeny chybou měření malých koncentrací stanovované látky. Řešením by mohla být totální mineralizace vzorků, která zaručí odstranění všech organických příměsí, což by mohlo být předmětem dalšího výzkumu.

8.6.1 Porovnání analýz

Pro ilustraci rozdílů při stanovení obsahu zinku metodami AAS (obr. 31) a spektrofotometricky (obr. 32) byl vybrán vzorek zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100.



Obr. 31. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č.II u zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100 zjištěný metodou AAS



Obr. 32. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č.II u zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100 zjištěný spektrofotometrickou metodou

Porovnáním jednotlivých grafů je patrné, že přestože se absolutní hodnoty stanovení zinku oběma metodami liší, nanočástice ZnO nepenetrují do nižších vrstev a rohová vrstva tedy plní svou bariérovou funkci.

ZÁVĚR

- Cílem diplomové práce bylo provedení dermální absorpce emulzních zinkových bělob (SOLAVEIL CZ -100 a SPECTRAVEIL FIN) metodou in vitro a stanovení penetrovaného množství zinku z těchto preparátů metodou AAS a ověření možnosti aplikace spektrofotometrického stanovení pro kosmetické prostředky.
- Pro spektrofotometrické stanovení zinku byla využita xylenolová oranž (XO), kationaktivní tenzid - cetylpyridinium chloridu (CPCl) a pro zajištění stálého prostředí při pH 5,5 acetátový pufr. Uvedená činidla byla použita v množství 2,5 ml XO o koncentraci 10^{-4} mol/l a 1,2 ml CPCl o koncentraci 10^{-3} mol/l, čímž byla modifikována původní metoda převzatá od Benamora [86] a kolektivu.
- Pro hydrolyzu vzorku obsahujících lipidické podíly byla ověřena a následně použita 6M HCl.
- Pro extrakci vzorků z lepicí pásky se ukázalo jako vhodnější použít toluen než izopropylalkohol. Zkrácení procesu a účinnosti extrakce bylo docíleno třepáním v ultrazvukové lázni.
- Při totální mineralizaci vzorků zinkových bělob SOLAVEIL CZ – 100 a SPECTRAVEIL FIN pomocí HNO_3 a H_2O_2 při mikrovlnném ohřevu a následným stanovením obsahu zinku metodou AAS byly zjištěny značné rozdíly od deklarovaného množství 55% hm. ZnO a tím byla prokázána nehomogenita vzorku.
- Srovnáním analýz modelových vzorků obsahujících zinek pomocí spektrofotometrie a AAS bylo dosaženo dobré shody. Stanovovány byly, jak vzorky u nichž byla použita navržena metodika včetně hydrolyzy simulující reálné vzorky, tak vzorky obsahující vodný roztok zinku.
- Lze konstatovat, že použitá spektrofotometrická metoda je vhodná pro stanovení kosmetických prostředků obsahujících tukovou složku.
- Pro lepší charakteristiku jednotlivých druhů zinkových bělob byla změřena velikost částic ZnO a jejich distribuce. V případě ingredience SOLAVEIL CZ – 100 byla zjištěna průměrná velikost částí 302 nm a u zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN se jednalo o velikost pohybující se průměrně 139 nm. Byla zjištěna tendence rychlé aglomerace částic.

- Při výrobě kosmetických prostředků obsahujících nanočástice ZnO je tedy nezbytné docílit jejich dokonalé homogenizace a zabezpečit jejich stabilitu.
- Vzorky získané dermální absorpcí představovaly celkem 13 frakcí, které se skládaly z oplachu horní části difúzní komůrky, stěrů zbytkového množství vzorku z povrchu kůže, jednotlivých stripů, epidermis, dermis a recepční tekutiny. Celkem bylo použito 10 kožních preparátů, z nich dva sloužily jako kontrola. Pro každý typ emulze pak sloužily paralelně 4 - 2 kůže, na které bylo nanášeno 20 μ l vzorku, což odpovídalo cca 30 mg. Stanovení bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech.
- Ze zjištěných výsledků je zřejmé, že spektrofotometrickou metodou bylo dosaženo hodnot, které byly ve většině případů vyšší než u AAS. Zatím nejsou známy důvody, které způsobují rozdíl u hodnot pořízených metodou AAS a spektrofotometrickým stanovením. Tato problematika bude předmětem dalšího zkoumání.
- Z analýz obsahu zinku v jednotlivých frakcích kůže lze tvrdit, že zinek, resp. ZnO nepenetruje hlouběji než do rohové vrstvy pokožky. Množství zinku zjištěné metodou AAS ve frakcích z epidermis a níže jsou zanedbatelné. Stejný závěr lze vyslovit i ze spektrofotometrického stanovení.
- Při provádění absorpce podobných prostředků obsahujících nanočástice je tedy nezbytné věnovat pozornost jejich homogenizaci a dispergaci nanočástic ve vzorku. Jinak nelze kalkulovat návratnost stanoveného množství vůči původně nanášenému.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Malina, Lubor.: *Fotodermatózy*. 1.vyd. Maxdorf. Praha. 1999. s. 16-25. ISBN: 0 - 8247-0292-1
- [2] KÜTTING, B., DREXLER, H.: *Evaluation of skin - protective means against acute and chronic effects of ultraviolet radiation from sunlight*. Skin protection: Practical Applications in the Occupational Setting. KARGEN. Switzerland. Vol. 34. 2007. s. 87 – 96. ISBN: 978-3-8055-8218-6
- [3] GONZALES, S., LORENTE, M. F., CALZADA, Y. G.: *The latest on skin photo-protection*. Clinics in Dermatology. Vol. 26. 2008. s. 614 – 626
- [4] WORD HEALTH ORGANIZATION.: INTERSUN. The global UV project. A guide and compendium. [online]. [cit. 2010-05 - 11]. Dostupný z WWW: www.who.int/uv/publications/en/Intersunguide.pdf
- [5] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.: *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humus. Solar and ultraviolet radiation*. [online]. Vol. 55. 1992. [cit. 2010-05 - 11]. Dostupný z WWW: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol55/mono55.pdf>
- [6] WORLD HEALTH ORGANIZATION.: *Health and environmental effects of ultraviolet radiation (WHO/EHG/95.15)*. [online]. [cit. 2010-05 - 11]. Dostupný z WWW: <https://www.who.int/uv/publications/UVeHeffects.pdf>
- [7] WOLF, P., YOUNG, A.: *Photoprotection*. Dermatological Phototheapy and photo-diagnostic methods. SPRINGER. Berlin. 2.vyd. 2008. s. 334 – 356. ISBN: 978-3-540-36692-8
- [8] NOHYNEK, G. J., SCHAEFERT, H.: *Benefit and risk of organic ultraviolet filters*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. Vol. 33. 2001. s. 285 – 296
- [9] CHAUDHURI, R. K., PFLUECKER, F., MUELLER, I. H.: *Organic sunscreens. The chemistry and manufacture of cosmetics Volume III. – Ingredients*. ALLURED. USA. 3.vyd. 2002. s. 627- 629. ISBN: 0-931710-77-4
- [10] LAUTENSCHLAGER, S., WULF, H. Ch., PITTELKOW, M.: *Photoprotection*. Lancet. Vol. 370. 2007. s. 528 – 537

- [11] ETTLER, Karel.: *Účinky UV záření na kůži a fotoprotekce*. Med. pro praxi. Vol. 6. 2007. s. 273 – 275
- [12] KULLAVANIJAYA, P., LIM, H. W.: *Photoprotection*. Dependent of dermatology. Vol. 52. 2005. s. 937 – 958
- [13] HEWITT, j. P.: *Inorganic sunscreens*. The chemistry and manufacture of cosmetics Volume III. – Ingredients. ALLURED. USA. 3.vyd. 2002. s. 627- 629. ISBN: 0-931710-77-4
- [14] ROGIERS, V., PAUWELS, M.: *Critical analysis of the safety assessment of cosmetic ingredient*. Safety assessment of cosmetics in Europe. KARGEN. Switzerland. Vol. 36. 2008. s. 72 – 88
- [15] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients*. 2006. Dostupný. [online]. [cit. 2009-11 - 03]. z WWW:
http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf
- [16] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *The SCCP'S notes of Guyance for the testing of cosmetics ingredients and their safety evaluation on 6TH revision*. 2006. [online]. [cit. 2009-11 - 06]. Dostupný z WWW:
http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/.../sccp_o_03j.pdf
- [17] USKOKOVIĆ, Vuk.: *Nanotechnologies: What we do not know*. Technology in Society. Vol. 29. 2007. s. 43-61
- [18] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *Preliminary opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products*. 2007. [online]. [cit. 2009 - 12 - 01]. Dostupný z WWW:
ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04.../sccp_o_099.pdf
- [19] SUH, W. H., SUSLICK, K. S., STUCKY G. D., SUH, Y. H.: *Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience. Progres in Neurobiology*. Vol. 87. 2009. s. 133 – 170
- [20] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *Safety of nanomaterials in cosmetic products*. 2007. [online]. [cit. 2009- 12 - 01]. Dostupný z WWW: ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/.../sccp_o_123.pdf

- [21] STERN, S. T., McNEIL, S. E.: *Nanotechnology safety concerns revisited*. Toxicological sciences. Vol. 101. 2007. s. 4 – 21
- [22] ELDER, A., LYNCH, I., GRIEGER, K., et al.: *Human health risk of engineered nanomaterials*. Nanomaterials: Risk and benefit. SPRINGER. Netherlands. 1.vyd. 2008. s. 3 -29. ISBN: 978-1-4020-9490-3
- [23] LAI, D. Y., SAYRE, P. G.: *Toxicity testing and evaluation of nanoparticles: challenges in risk assessment*. Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. s. 444. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [24] GORMLEY, A. J., GHANDEHARI, H.: *Evaluation of toxicity of nanostructures in biological systems*. Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. s. 115 - 161. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [25] SAYES, Ch. M., WARHEIT, D. B.: *Criteria and implementation of physical and chemical characteristics of nanomaterials for human health effects and ecological toxicity studies*. Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. s. 29 - 41. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [26] WANG, J., SUN, W., ALI, S. F.: *Nanoparticles: Is neurotoxicity a concern?* Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. s. 171 - 183. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [27] AILLON, K. L., XIE, Y., EL-GENDY, N., BERKLAND, C. J., FORREST, M. L.: *Effect of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity*. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 61. 2009. s. 457 – 466
- [28] SINGH, N., MAUSHIAN, B., JEUKINS, G. J. S., GRIFFITHS, S. M., WILLIAMS, P. M., et al.: *The DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials. Vol. 20. 2009. S. 3891 – 3914
- [29] GIESER, M., KAPP, R. R. B., SCHZURCH, N., KREYLING, S. W., SCHULZ, H., et al.: *Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanism in lung and cultures cells*. Environmental Health Perspectives. Vol. 113. 2005. s. 1555 – 1560
- [30] TSUJI, J. S., MOWAT, F. S., DONTU, S., REITMAN, M.: *Application of toxicology studies in assessing the health risk of nanomaterials in consumer*

- product*. Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. s. 530 - 542. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [31] MAYNARD, A. D.: *Nanotechnology: assessing the risks*. Nanotoday. Vol. 1. 2006. s. 22 – 23
- [32] WANG, B., FENG, W. Y., WANG, T. Ch., JIA, G., WANG, M., et al.: *Acute toxicity of nano- and micro scale zinc powder in healthy adult mice*. Toxicology Letters. Vol. 161. 2006. s. 115 - 123
- [33] BAILEY, M. R.: *The new ICRP model for the respiratory tract*. Radiat Prot Dosimetry. Vol. 53. 1994. s. 107 – 114
- [34] RUSHMER, R. F., BUETTNER, J. K., SHORT, J. M., ODLAND, G. F.: *The skin*. Science magazine. Vol. 154. 1966. s. 343 – 348
- [35] HOET, P. H. M., BRÜSHE- HOHEFELD, I., SALATA, V.: *Nanoparticles – known and unknown health risk*. Journal of Nanotechnology. Vol. 2. 2004. s. 1 – 12
- [36] ÖBERDORSTER, G., ÖBERDORSTER, E., ÖBERDORSTER, J.: *Nanotechnology: An emerging discipline evoking from studie of ultrafine particles*. Environmental health perspectives. Vol. 113. 2005. s. 823 – 839
- [37] WERTZ, P. W., BERGH, van den B.: *The physical and functional properties of lipid in the skin and other biological barriers*. Chem. Phys. Lipids. Vol. 91. 1998. s. 85 – 95
- [38] SCHÄTZLEIN, A., CEVC, G.: *Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles* British Journal of Dermatology. Vol. 138. 1998. s. 583 -592
- [39] CEVC, G., VIERL, U.: *Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal*. Journal of Controlled Release. Vol. 141. 2010. s. 277 - 299
- [40] BORM, P. J. A., ROBBINS, R., HAUBOLD, S., KUHNBUSCH, T., et al.: *The potential risk of nanomaterials: a review carried out ECETOC*. Particle and fibre Toxicology. Vol. 3. 2006. s. 1 – 35

- [41] IMBERT, D., WICKETT, R.: *Topical delivery with liposomes*. Toiletries magazine. Vol. 111. 1995. s. 32 - 45
- [42] NOHYNEK, G. J., DUFOUR, E. K., ROBERTS, M. S.: *Nanotechnology, cosmetics and the skin: Is there a health risk?* Skin Pharmacology and Physiology. Vol. 21. 2008. s. 136 - 149
- [43] NOHYNEK, G. J., LADEMANN, J., RIBAND, Ch., ROBERTS, M. S.: *Grey goo the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety*. Critical Reviews in Toxicology. Vol. 37. 2007. s. 1 - 27
- [44] BAROLI, B., ENNANS, M. G., LOFFREDO, F., et al.: *Penetration of metallic nanoparticles in human full thickness skin*. Journal of investigative Dermatology. Vol. 127. 2007. s. 1701 - 1712
- [45] CROSS, S. E., INNES, B., ROBERTS, M. S., et al.: *Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation*. Skin Pharmacology and Physiology. Vol. 20. 2007. s. 148 - 154
- [46] PETER, K., UNGER, R. E., KIRKPATRICK, C. J., GABBI, A. M., MONARI, E.: *Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. Vol. 15. 2004. s. 321 - 325
- [47] GAMER, A. O., LEIBOLD, E., RAVENZWAAY, van B.: *The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin*. Toxicol in Vitro. Vol. 20. 2006. s. 301 - 307
- [48] MEIDAN, V. M., BONNER, M. C., MICHNIAK, B. B.: *Transfollicular drug delivery – is it a reality?* International Journals of Pharmaceutics. Vol. 306. 2005. s. 1 – 14
- [49] LEKKI, J., STACHURA, Z., DABRÓS, W., et al.: *On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Vol. 260. 2007. s. 174 – 177

- [50] LADEMANN, J., RICHTER, H., TUCHMANN, A., et al.: *Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Vol. 66. 2007. s. 159 - 164
- [51] RYAMAN-RASMUSSEN, J. P., RIVIERE, J. E., MONTERIO – RIVIERE, N. A.: *Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties*. Toxicological Sciences. Vol. 91. 2006. s. 159 - 165
- [52] KISS, B., BÍRÓ, T., CZIFRA, G., TÓTH, B. I., KERTÉSZ, Z., SZIKSZAI, Z., KISS, A.Z., JUHÁSZ, I., ZOUBOULIS, CH.C., HUNYADI, J.: *Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells*. Experimental Dermatology. Vol. 7. 2007. s. 659 – 667
- [53] SCHULZ, J., HOHENBERG, H., PFLÜCKER, F., et al.: *Distribution of sunscreens on skin*. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 54. 2002. s. 57 - 163
- [54] WANG, J. J., SANDERSON, B.J.S., WANG, H.: *Cyto - and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells*. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Vol. 628. 2007. s. 99 – 106
- [55] WAMER, W. G., YIN J. J., WEI R. R.: *Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide*. Free Radical Biology & Medicine. Vol 23. 1997. s. 851 – 858
- [56] REEVES, J. F., DAVIES., S. J., DODD, N. J. F., JHA, A. N.: *Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle – induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fis cells*. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Vol. 640. 2008. s. 113 – 122
- [57] SAYES, C. M., KURIAN, W. R., LIU, Y. P., WEST, J. L., et al.: *Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells*. Toxicology Science. Vol. 92. 2006. s. 174 – 185
- [58] WARHEIT, D. B., WEBB, T. R., SAYERS, C. M., COLVIN, V. L., REED, K. L.: *Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats:*

- Toxicity is not dependent upon particle size and surface area.* Toxicology Science. Vol. 91. 2006. s. 227 - 236
- [59] BRAYNER, Robert.: *The toxicological impact of nanoparticles.* Nanotoday. Vol. 3. 2008. s. 48 – 55
- [60] HIRAKAWA, K., YOSHIDA, M. M., OIKAWA, M., et al.: *Photo – irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA Damage via generation of hydrogen peroxide.* Free Radic. Res. Vol. 38. 2004. s. 439 – 347
- [61] KONAKA, R., KASAHARA, E., DUNLOP, W. C., et al.: *Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion.* Free. Radic. Biol. Med. Vol. 27. 1999. s. 294 - 300
- [62] KONAKA, R., KASAHARA, E., DUNLOP, W. C., et al.: *Ultraviolet irradiation of titanium dioxide in aqueous dispersion generates singlet oxygen.* Redox. Rep. Vol. 6. 2001. s. 319 - 325
- [63] FUJISHIMA, A., RAO, T. N., TRYK, D. A.: *Titanium dioxide photocatalysis.* Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. Vol. 1. 2000. s. 1 – 21
- [64] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *Opinion zinc oxide.* [online]. [cit. 2010 - 01 - 20]. Dostupný z WWW: [c.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/.../out222_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/.../out222_en.pdf)
- [65] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *Clarification on opinion SCCNFP/0932/05 on zinc oxide.* [online]. [cit. 2010 - 01 - 20]. Dostupný z WWW: ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/...sccp/.../sccp_o_167.pdf
- [66] AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY.: *Toxicological profile for zinc.* [online]. [cit. 2010 - 02 - 14]. Dostupný z WWW: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60-c1.pdf
- [67] SHARMA, V., SHUKLA, R.K., SAXENA, N., PARMAR, D., DAS, M., DHAWAN, A.: *DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells.* Toxicology Letters. Vol. 185. 2009. s. 211 – 218

- [68] GONARTI, R., PAPIS, A., GIACCHINO DI M., et al.: *In vivo and in vitro models for nanotoxicology testing*. Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. S. 293 - 296. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [69] BAROLI, B.: *Nanoparticles and skin penetration. Are there any potential toxicological risk?* Journal of Consumer Protection and food Safety. Vol. 3. 2008. s. 330 - 331
- [70] FENG W., WANG, B., ZHAO, Y.: *Nanotoxicity of metal oxide nanoparticles in vivo*. Nanotoxicity from in vivo and in vitro models to health risks. WILEY. USA. 2009. s. 253 - 263. ISBN: 978-0-470-74137-5
- [71] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS.: *Basic criteria for the in vitro assessment of percutaneous absorption of cosmetic Ingredients*. [online]. [cit. 2009 - 10 - 12]. Dostupný z WWW: www.leffingwell.com/cosmetics/vol_3en.pdf
- [72] OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION.: *Concil regulation (EC) No. 440/2008. B. 45. Skin absorption: in vitro method*. [online]. [cit. 2010- 03 - 06]. Dostupný z WWW: eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142...en
- [73] KOTOGOVÁ, L., BORSKÁ, L., FIALA, Z.: *Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro*. Chem. Listy. Vol 103. 2009. s. 533 - 539
- [74] NESMĚRÁK, KAREL.: *Chemická analýza – méně běžné postupy*. [online]. [cit. 2009- 11 - 25]. Dostupný z WWW: archiv.otevrena-veda.cz/index/image/default/C1Kurzy/.../24nesmerak.pdf
- [75] PŘIBIL, RUDOLF.: *Moderní metody v chemické laboratoři. Komplexometrie*. 1. vyd. SNTL. Praha. 1977. s. 210 – 215. ISBN: 04 – 621 - 77
- [76] NESMĚRÁK, KAREL.: *Praktikum z klasických metod analýzy*. [online]. [cit. 2009 - 11 - 25]. Dostupný z WWW: www.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/0708_pka_scriptum_04.pdf
- [77] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z.: *Základní analytická chemie*. 1.vyd. KAROLINUM. Praha. 2002. s. 121 - 139

- [78] KOMÍNKOVA, J., MESTEK, O.: *Atomová absorpční spektrometrie*. [online]. [cit. 2010- 03 - 01]. Dostupný z WWW: vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf
- [79] SALVADOR, A., PASCUAL-MARTÍ, m. C., ADELL, J. R., REGUENI, A., MARCH, J. G.: *Analytical methodologies for atomic spectrometric determination of metallic oxides in UV sunscreen creams*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 22. 2000. s. 301 - 306
- [80] ZACHARIADIS, G. A., SCHANIDOU, E.: *Multi – element method for determination of trace elements in sunscreens by ICP – EAS*. Journal of of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 50. 2009. s. 342 - 348
- [81] LAVILLA, I., CABALERIO, N., COTANS, M., CALLE DE LA, I., BENDRICH, C.: *Ultrasound – assested emulsification of cosmetic samples prior to elemental analysis by different atomic spectrometric techniques*. Talanta. Vol. 80. 2009. s. 109 - 116
- [82] VONDRUŠKA, MILAN.: *AAS stanovení toxických prvků v kosmetických olejích cestou vodné emulze*. Chem. Listy. Vol. 89. 1995. s. 383 – 386
- [83] YURCHENKO, I. I., KHARENKO, I. P., Titova, N. P.: *Increasing the sensitivity a accuracy of zinc determination in atomic absorption spektrometry*. Journal of Applied Spectroscopy. Vol. 75. 2008. s. 283 - 287
- [84] SINICA, ALLA.: *Spektrometrie ve viditelné oblasti spektra*. [online]. [cit. 2010 - 03 - 14]. Dostupný na WWW: vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf
- [85] KORN, M. G. A., FERREIRA, A. C., TEIXERRA, L. S. G., COSTA, A. C. S.: *Spectrophotometric determination of zinc using 7- (4 - nitrophenyl azo) - 8 - hydroxyquinoline – 5 – sulfonic acid*. J.Braz. Chem. Coc. Vol. 10. 1999. s. 46 - 50
- [86] BENAMOR, M., BELHAMEL, K., DRAA, M. T.: *Use of xylenol orange and cetylpyridinium chloride in rapid spectrometric determination of zinc in pharmaceutical products*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 23. 2000. s. 1033 - 1038

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie.
AES	Atomová emisní spektrometrie.
BfR	Spolkový institut pro odhad rizika.
CNS	Centrální nervová soustava.
CPCI	Cetylpyridinium chlorid.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
EAAS	Elektrická atomová absorpční spektrometrie.
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FAAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie.
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léků.
GC	Plynová chromatografie.
GIT	Gastrointestinální trakt.
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny.
IBMK	Izobutyl-methyl keton.
ICP - AES	Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.
ICP - MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.
INCI	Mezinárodní názvosloví kosmetických přísad.
In vitro	Testy za laboratorních podmínek.
In vivo	Testy na živém organismu.
MoS	Hranice bezpečnosti.
NOAEL	Dávka testované látky, při které ještě nebyl pozorován toxický účinek.
OECD	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj.
o/v	Olej ve vodě

PABA	p- aminobenzoová kyselina.
REACH	Registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek.
RNA	Ribonukleová kyselina.
ROS	Reaktivní kyslíkaté produkty.
SCCP	Výbor pro kontrolu spotřebního zboží.
SCCNFP	Vědecký výbor pro kosmetiku a nepotravinové výrobky (do roku 2004).
SDS	Laurylsulfát sodný.
SPF	Sluneční ochranný faktor.
TGA	Státní ústav pro kontrolu léčiv.
TER	Transkutánní elektrický odpor.
TEWL	Transdermální ztráta vody.
TiO ₂	Oxid titaničitý.
ÚIOŽP	Ústav inženýrství a ochrany životního prostředí.
UV	Ultrafialové záření.
v/o	Voda v oleji.
WHO	Světová zdravotnická organizace.
XO	Xylenolová oranž.
ZnO	Oxid zinečnatý.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Mechanismus účinku TiO ₂	16
Obr. 2. Účinnost částic TiO ₂ při různých vlnových délkách.	17
Obr. 3. Účinnost pigmentu a jemných částic ZnO při různých vlnových délkách	17
Obr. 4. Poměr velikosti materiálů	18
Obr. 5. Fyzikálně – chemické vlastnosti nanomateriálů, které mohou změnit biologické účinky	22
Obr. 6. Klíčové problémy v hodnocení lidského zdravotního rizika po vystavení nanomateriálům	23
Obr. 7. Hlavní možnosti toxicity nanomateriálů in vivo	24
Obr. 8. Začlenění různých proteinů s nanočásticí (10 nm) do buněčné membrány	25
Obr. 9. Schematická ilustrace možného pasivního prostupu nanomateriálu do buňky	26
Obr. 10. Možné cesty penetrace kůže	29
Obr. 11. TiO ₂ pod elektronovým mikroskopem	32
Obr. 12. ZnO v rozměru nanometrů	33
Obr. 13. Franzova komůrka	36
Obr. 14. Franzovy komůrky	46
Obr. 15. Terčíky prasečí kůže	46
Obr. 16. Stripování kůže	46
Obr. 17. Stripy kůže na lepicí pásce	46
Obr. 18. Oddělení epidermis od dermis	47
Obr. 19. Rozstříhání dermis	47
Obr. 20. Spektrofotometr HACH DR/2000	51
Obr. 21. ZETA NANO ZS (Malvern Instruments)	53
Obr. 22. Graf závislosti naměřené absorpance na koncentraci.....	55

Obr. 23. Graf kalibrační křivky (Závislost absorpance na koncentraci).....	56
Obr. 24. Graf přesnosti měření (Závislost absorpance na koncentraci)	58
Obr. 25. Distribuční křivka zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN	64
Obr. 26. Distribuční křivka zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100	65
Obr. 27. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č. I. u zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100.....	67
Obr. 28. Výtěžnost zinku u frakcí získaných stěry z povrchu jednotlivých kůží u zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100.....	68
Obr. 29. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č. III. u zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN	70
Obr. 30. Výtěžnost zinku u frakcí získaných stěrem z povrchu jednotlivých kůží u zinkové běloby SPECTRAVEIL FIN	70
Obr. 31. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č. II. u zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100 zjištěný metodou AAS	72
Obr. 32. Výtěžnost zinku v jednotlivých vrstvách kůže č. II. u zinkové běloby SOLAVEIL CZ – 100 zjištěný spektrofotometrickou metodou.....	72

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Frakce získané při dermální absorpci metodou in vitro	45
Tab. 2. Naměřené hodnoty absorbance při 570 nm	55
Tab. 3. Výsledky měření kalibrační křivky	56
Tab. 4. Výsledky měření přesnosti kalibrační křivky	57
Tab. 5. Zinková běloba s izopropylalkoholem jako extrakčním činidlem bez izolepy	59
Tab. 6. Zinková běloba nanesená na izolepu s extrakčním činidlem izopropylalkoholu	59
Tab. 7. Zinková běloba s toluenem jako extrakčním činidlem bez izolepy.....	60
Tab. 8. Zinková běloba nanesená na izolepu s extrakčním činidlem toluenem	60
Tab. 9. Výsledky mineralizace vzorku a stanovení metodou AAS	62
Tab. 10. Hodnocení výsledků odchylky stanovených u zinkových bělob	63
Tab. 11. Hodnocení odchylky při použití roztoků zinku	64
Tab. 12. Stanovení penetrace zinku do jednotlivých vrstev kůže z preparátu SOLAVEIL CZ – 100.....	66
Tab. 13. návratnost množství zinku z původně naneseného z preparátu SOLAVEIL CZ – 100	66
Tab. 14. Stanovení penetrace zinku do jednotlivých vrstev kůže z preparátu SPECTRAVEIL FIN	68
Tab. 15. návratnost množství zinku z původně naneseného z preparátu SPECTRAVEIL FIN	68

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I. Rozpis vzorků

PŘÍLOHA P I: ROZPIS VZORKŮ

aplikovaná látka	Solaveil CZ-100	Spectraveil FIN
aplikace 20 ul	mg prům.	mg prům.
	34,5 34,36667	27,5 27,56667
	34,5	28,2
	34,1	27,0
Receptorová tekutina (vodný roztok 0.90 NaCl, 1% bovinní albumin, 0.05% gentamycin)		

1	1 cap	5 ml	1 kontrola bez aplikace
2	1 surface	4 ml	
3	1 strip1-2	4 ml	
4	1 s3-4	4 ml	
5	1 s5-6	4 ml	
6	1 s7-8	4 ml	
7	1 s9-10	4 ml	
8	1 s11-12	4 ml	
9	1 s13-14	4 ml	
10	1 s15-16	4 ml	
11	1 epiderm	4 ml	
12	1 dermis	10 ml	

13	1 rec.fluid	4 ml	
14	2 cap	5 ml	2 kontrola bez aplikace
15	2 surface	4 ml	
16	2 s1-2	4 ml	
17	2 s3-4	4 ml	
18	2 s5-6	4 ml	
19	2 s7-8	4 ml	
20	2 s9-10	4 ml	
21	2 s11-12	4 ml	
22	2 s13-14	4 ml	
23	2 s15-16	4 ml	
24	2 epiderm	4 ml	
25	2 dermis	10 ml	

26	2 rec.fluid	4 ml	
27	3 cap	5 ml	3 Solaveil
28	3 surface	4 ml	
29	3 s1-2	4 ml	
30	3 s3-4	4 ml	
31	3 s5-6	4 ml	
32	3 s7-8	4 ml	
33	3 s9-10	4 ml	
34	3 s11-12	4 ml	
35	3 s13-14	4 ml	
36	3 s15-16	4 ml	
37	3 epiderm	4 ml	
38	3 dermis	10 ml	
		4 ml	

39	3 rec.fluid		
40	4 cap	5 ml	4 Solaveil
41	4 surface	4 ml	
42	4 s1-2	4 ml	
43	4 s3-4	4 ml	
44	4 s5-6	4 ml	
45	4 s7-8	4 ml	
46	4 s9-10	4 ml	
47	4 s11-12	4 ml	
48	4 s13-14	4 ml	
49	4 s15-16	4 ml	
50	4 epiderm	4 ml	
51	4 dermis	10 ml	
52	4 rec.fluid	4 ml	
53	5 cap	5 ml	5 Spectraveil
54	5 surface	4 ml	
55	5 s1-2	4 ml	
56	5 s3-4	4 ml	
57	5 s5-6	4 ml	
58	5 s7-8	4 ml	
59	5 s9-10	4 ml	
60	5 s11-12	4 ml	
61	5 s13-14	4 ml	
62	5 s15-16	4 ml	
63	5 epiderm	4 ml	
64	5 dermis	10 ml	
65	5rec.Fluid	4 ml	
66	6 cap	5 ml	6 Spectraveil
67	6 surface	4 ml	
68	6 s1-2	4 ml	
69	6 s3-4	4 ml	
70	6 s5-6	4 ml	
71	6 s7-8	4 ml	
72	6 s9-10	4 ml	
73	6 s11-12	4 ml	
74	6 s13-14	4 ml	
75	6 s15-16	4 ml	
76	6 epiderm	4 ml	
77	6 dermis	10 ml	
78	6 rec.fluid	4 ml	

aplikovaná látka	Solaveil CZ-100		Spectraveil FIN	
aplikace 20 ul	mg	prům.	mg	prům.
	34,7	35,18333	30,6	30,9
	36,25		31,2	
	34,6		30,9	

Receptorová tekutina (vodný roztok 0.90 NaCl, 1% bovinní albumin, 0.05% gentamycin)

79	1 cap	5 ml	1 Solaveil
80	1 surface	4 ml	
81	1 strip1-2	4 ml	
82	1 s3-4	4 ml	
83	1 s5-6	4 ml	
84	1 s7-8	4 ml	
85	1 s9-10	4 ml	
86	1 s11-12	4 ml	
87	1 s13-14	4 ml	
88	1 s15-16	4 ml	
89	1 epider- mis	4 ml	
90	1 dermis	10 ml	
91	1 rec.fluid	4 ml	
<hr/>			
92	2 cap	5 ml	2 Solaveil
93	2 surface	4 ml	
94	2 s1-2	4 ml	
95	2 s3-4	4 ml	
96	2 s5-6	4 ml	
97	2 s7-8	4 ml	
98	2 s9-10	4 ml	
99	2 s11-12	4 ml	
100	2 s13-14	4 ml	
101	2 s15-16	4 ml	
102	2 epider- mis	4 ml	
103	2 dermis	10 ml	
104	2 rec.fluid	4 ml	
<hr/>			
105	3 cap	5 ml	3 Spectraveil
106	3 surface	4 ml	
107	3 s1-2	4 ml	
108	3 s3-4	4 ml	
109	3 s5-6	4 ml	
110	3 s7-8	4 ml	
111	3 s9-10	4 ml	
112	3 s11-12	4 ml	
113	3 s13-14	4 ml	
114	3 s15-16	4 ml	

115	3 epider-	4 ml	
116	3 dermis	10 ml	
117	3 rec.fluid	4 ml	
118	4 cap	5 ml	4 Spectraveil
119	4 surface	4 ml	
120	4 s1-2	4 ml	
121	4 s3-4	4 ml	
122	4 s5-6	4 ml	
123	4 s7-8	4 ml	
124	4 s9-10	4 ml	
125	4 s11-12	4 ml	
126	4 s13-14	4 ml	
127	4 s15-16	4 ml	
128	4 epider-	4 ml	
129	4 dermis	10 ml	
130	4 rec.fluid	4 ml	