

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Stanovení nelegálních látek v kosmetice pomocí moderních chromatografických metod

Vedoucí diplomové práce: Dr. Maria Albertovna Khalikova, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Aneta Novotná

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta

Katedra analytické chemie

Kandidát: Aneta Novotná

Školitel: Dr. Maria Albertovna Khalikova, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení nelegálních látek v kosmetice pomocí moderních chromatografických metod

Tato diplomová práce se zabývá vývojem ultra - rychlé kapalinové chromatografické metody, která bude separovat konzervační látky používané v kosmetice (parabeny). Vývoj metody zahrnuje výběr optimální stacionární fáze a mobilní fáze. V další fázi výběr vhodné teploty, gradientu, a rychlosti průtoku. Před aplikací reálných vzorků kosmetiky, bylo nutné provést validaci, která ukázala, že metoda je dostatečně přesná, opakovatelná a vhodná pro toto stanovení.

Vývoj metody probíhal na přístroji UltiMate™ 3000 HPLC and UHPLC Systém, bylo posuzováno 9 stacionárních fází od 4 výrobců (Fortis, Ascentis, Kinetex, Onyx). Nejvhodnější stacionární fázi, která separovala všech 9 látek, se stala Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm. Vzhledem k rozpustnosti a vlastnostem parabenů se zkoušely dvě mobilní fáze a jedna jejich kombinace (ACN, MEOH). Mobilní fáze s obsahem acetonitrilu lépe separovala testované parabeny, doba separace byla také kratší. Teplota byla zvolena 40 °C, rychlost průtoku mobilní fáze 2 ml/min a gradient mobilní fáze od 40 % - 70 % organické složky během 3 minut.

Klíčová slova: ultra-rychlá kapalinová chromatografie, separace, konzervační látka, parabeny

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Aneta Novotná

Supervisor: Dr. Maria Albertovna Khalikova, Ph.D.

Consultant: doc. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

Title of Graduation Thesis: Determination of illegal substances in cosmetics using modern chromatographic methods

This diploma thesis deals with the development of ultra - fast liquid chromatographic method, which will best detect the preservatives used in cosmetics (parabens). The development of the method involves the selection of the best stationary phase and the mobile phase.

In the next phase, selecting the appropriate temperature, gradient, flow rate, and before applying real cosmetic samples, validation was required to show that the method is sufficiently accurate and repeatable for this research.

This development of the method was performed on the UltiMate™ 3000 HPLC and UHPLC System, 9 stationary phases from 4 manufacturers (Fortis, Ascentis, Kinetex, Onyx), properties and contents were evaluated. The most suitable stationary phase that separated all 9 substances was Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 µm 150 x 4.6 mm. Due to the solubility and properties of the parabens, two mobile phases and one combination thereof (ACN, MEOH) were tested. The acetonitrile-containing mobile phase better separated the tested parabens, the separation time was also shorter. The temperature was selected at 40 °C, a mobile phase flow rate of 2 ml / min and a gradient of the mobile phase from 40 % to 70 % of the organic component within 3 minute.

Keywords: ultra-fast liquid chromatography, separation, preservative, parabens

Poděkování

Touto cestou bych velice ráda poděkovala své vedoucí práce Dr. Marii Albertovně Khalikové, Ph.D. za odborné vedení při vypracovávání praktické části, sdělení důležitých informací, trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Daliborovi Šatinskému, Ph.D. za cenné rady při psaní diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovaný. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové 3. 9. 2017

.....

Podpis studentky

Obsah

1	Seznam použitých zkratek	1
2	Úvod.....	2
3	Cíl a zadání diplomové práce.....	3
4	Teoretická část	4
4.1	Chromatografie	4
4.1.1	Historie chromatografie	4
4.1.2	Dělení chromatografie	5
4.1.3	Postupný vývoj HPLC	6
4.2	Parabeny	10
4.2.1	Základní charakteristika konzervačních látek.....	10
4.2.2	Parabeny a jejich fyzikálně- chemické vlastnosti	11
4.2.3	Problematika v kosmetice	16
4.2.4	Metody stanovení parabel	17
5	Experimentální část.....	19
5.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	19
5.2	Standardy.....	19
5.3	Chemikálie	19
5.4	Testované kolony	19
5.5	Testované kosmetické přípravky.....	20
5.6	Příprava mobilních fází	20
5.7	Příprava pracovních roztoků	20
5.7.1	Příprava roztoků standardů	20
5.7.2	Příprava roztoků pro validaci selektivity metody	21
5.7.3	Příprava roztoků pro validaci linearitu	21
5.7.4	Příprava roztoků pro validaci opakovatelnosti	21
5.7.5	Příprava roztoků pro validaci přesnosti a správnosti	21

5.7.6	Příprava extraktů z reálných vzorků	21
5.8	Provedení analýzy	22
6	Výsledky a diskuze	23
6.1	Vývoj metody UHPLC	23
6.1.1	Výběr stacionární fáze	24
6.1.2	Výběr mobilní fáze	27
6.1.3	Vliv teploty	29
6.1.4	Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze	33
6.1.5	Vliv gradientu	35
6.1.6	Optimální podmínky	37
6.2	Validace	38
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému	38
6.2.2	Test specificity	39
6.2.3	Linearita metody	40
6.2.4	Opakovatelnost nástřiku	41
6.2.5	Přesnost a správnost metody	42
6.3	Aplikace UHPLC metody na reálné vzorky	43
7	Závěr	48
8	Seznam obrázků	49
9	Seznam tabulek	51
10	Použitá literatura	52
11	Příloha	56

1 Seznam použitých zkratek

AC	Affinity chromatography (Afinitní chromatografie)
ACN	Acetonitril
BP	Butylparaben
BeP	Benzylparaben
CC	Column chromatography (Kolonová chromatografie)
EP	Ethylparaben
F.D.A.	Food and drug administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FeP	Fenylparaben
GC	Gas chromatography (Plynová chromatografie)
GPC	Gel Permeation chromatography (Gelová chromatografie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
IBP	Isobutyloaraben
IEC	Ion Exchange chromatography (Iontově výměnná chromatografie)
IPP	Isopropylparaben
LC	Liquid chromatography (Kapalinová chromatografie)
LLC	Liquid-Liquid chromatography (Rozdělovací chromatografie)
LSC	Liquid-Solid chromatography (Adsorpční chromatografie)
MeOH	Methanol
MP	Methylparaben
N-PP	N - pentylparaben
PC	Paper chromatography (Papírová chromatografie)
PP	Propylparaben
UHPLC	Ultra High Performance Liquid chromatography (Ultraúčinná kapalinová chromatografie)
TLC	Thin Layer chromatography (Tenkovrstvá chromatografie)

2 Úvod

Parabeny jsou v dnešní době velice probíraným tématem, stále zní otázka, zda mají kosmetické přípravky obsahovat tyto konzervační látky či nikoliv. Kosmetický průmysl se již začal zabývat výrobou „paraben-free“ produktů, které zaručují nulový obsah těchto látek a produktů, které garantují minimální množství těchto látek.

Existuje mnoho studií, které poukazují na škodlivost parabenů na lidský organismus, díky mediím byl velice probírán vliv těchto látek na zvýšenou estrogenní aktivitu a tím zvyšující se riziko nádorového bujení. Dále byl diskutován vliv antiperspirantů při aplikaci do podpažní jamky, kam ústí lymfatický systém člověka a právě při zkoumání karcinomů, byly nalezeny stopy parabenů, který tyto antiperspiranty obsahují. Na druhou stranu další studie dokazují, že při vstřebávání touto cestou, jsou rychle degradovány podkožními buňkami i enzymy.

Bez konzervačních látek dochází u přípravků k rychlejší kontaminaci bakteriemi a plísněmi, proto mají tyto látky svou opodstatněnou roli ve složení produktu.

Koncentrace parabenů v kosmetických přípravcích je regulována nařízením Komise (EU). Množství konzervačních látek můžeme sledovat na obalu přípravku.

Tyto látky se dají stanovovat ultra-rychlou kapalinovou chromatografií (UHPLC), což je moderní metoda, která vychází z kapalinové chromatografie. UHPLC metoda se odlišuje od kapalinové chromatografie velikostí částic chromatografického sorbentu které jsou většinou menší než 2 μm .

3 Cíl a zadání diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu pro UHPLC separaci parabenů, která bude vhodná pro aplikaci na reálný vzorek, požadavky na ní byly kladeny hlavně v rychlosti separace.

Na počátku analýzy byly popsány chromatografické metody, na jakých principech fungují, zejména se jednalo o ultra-rychlou kapalinovou chromatografii (UHPLC), která byla zadána jako separační metoda pro toto téma, byl popsán její vývoj a přednosti. Dále byly definovány základní vlastnosti parabenů, které by mohly ovlivnit přípravu standardů a i jejich další separaci v UHPLC systému.

Při vývoji metody se v první řadě musely nalézt vhodné podmínky, na základě kterých můžou být identifikovány tyto konzervační látky v reálných produktech. Tyto podmínky byly nalezeny pomocí zkoušení různých stacionárních a mobilních fází, změn gradientové eluce, teplot a rychlosti průtoku mobilní fáze.

Po stanovení optimálních podmínek byla tato metoda validována pro ověření správnosti, přesnosti, linearitu a opakovatelnosti výsledků.

V poslední části diplomové práce byla metoda aplikována na reálný vzorek, kde bylo vybráno šest přípravků různých značek a v nich určen výskyt legálních a nelegálních konzervačních látek.

4 Teoretická část

4.1 Chromatografie

Chromatografie je soubor separačních metod, při kterých se oddělují, neboli separují složky obsažené ve vzorku. Především se jedná o metody kvalitativní a kvantitativní vzorkové analýzy. Základem chromatografie je, že se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je vždy nepohyblivá na rozdíl od mobilní fáze, která je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek této stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zachycovány, a proto se při pohybu mohou zdržovat. Vzorky, které jsou kolonou poutány silněji, jsou separovány později než složky méně zadržované [1] [7] .

4.1.1 Historie chromatografie

Základ všem chromatografickým metodám položil na počátku dvacátého století M. S. Cvet (1872-1919), jedná se o ruského botanika, fyziologa a biochemika, který poprvé rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva (odtud také pochází název chromatografie, řecky chroma- barva, grafein- psát) [2] .

Po tomto pokusu tato metoda upadla v zapomnění a až téměř po třiceti letech byla znovu objevena a od té doby jsme svědky velkého rozmachu analýz. V roce 1941 se Martinovi a Syngeovi podařilo rozdělit směs acetylových aminokyselin pomocí kapalinové chromatografie v systému tvořeném organickou mobilní fází a stacionární vodnou fází zakotvenou na inertním nosiči. Tak vznikla chromatografie rozdělovací, za kterou tito autoři obdrželi Nobelovu cenu. Použití inertního nosiče celulósy vedlo k objevu chromatografie papírové, která se pro svou jednoduchost velice rychle rozšířila. Martin spolu s Jamesem provedli v roce 1952 též separaci látek v plynné fázi a položili tak základ plynové chromatografii. Po roce 1960 se rozvíjeli další chromatografické metody - tenkovrstvá, gelová a v poslední době afinitní (nazývaná též jako biospecifická). Velké rozšíření kapalinové chromatografie bylo, zejména v lékařství a biologii, přispělo tak k využití měničů iontů k separaci aminokyselin publikované poté v roce 1948 Moorem a Steinem [3] .

4.1.2 Dělení chromatografie

Chromatografie se dělí podle několika hledisek. Například podle skupenství mobilní fáze můžeme definovat kapalinovou a plynovou chromatografii, dle uspořádání stacionární fáze na kolonovou, papírovou a tenkovrstvou chromatografii, dle povahy děje, který převládá při separaci na rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnnou, gelovou a afinitní chromatografii [1] [20] .

Dělení dle skupenství mobilní fáze:

- Plynová chromatografie (GC) - pohyblivou mobilní fází tvoří plyn, proto je nazýván plynem nosným, aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn, pro nutnost přeměny analytů v plyn můžeme separovat jen takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, musí být tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000 g/mol [1] [6].
- Kapalinová chromatografie (LC) - zde je mobilní fází kapalina a položila základ pro vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (High Performance Liquid Chromatography- HPLC).

Dělení dle uspořádání stacionární fáze:

- Kolonová chromatografie (CC) - stacionární fáze je umístěna v trubici neboli koloně [1].
- Papírová chromatografie (PC) - starší typ, postupně nahrazován tenkovrstvou chromatografií, stacionární fáze je součástí chromatografického papíru [1].
- Tenkovrstvá chromatografie (TLC) - stacionární fáze je umístěna v ploše a nanesená v tenké vrstvě na vhodné desce, mobilní fáze se většinou skládají ze směsí rozpouštědel a někdy i s přísadami kyselin, zásad nebo tlumivých roztoků[4].

Dělení dle povahy děje:

- Rozdělovací chromatografie (LLC) - o separaci složek rozhoduje jejich odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fází i mobilní fází.
- Adsorpční chromatografie (LSC) - separaci poskytuje různá schopnost složek poutat se na povrch stacionární fáze.

- Iontově-výměnná chromatografie (IEC) - o separaci se starají různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku.
- Gelová chromatografie (GPC) - složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu), menší molekuly ve vzorku se v pórech gelu zdržují déle.
- Afinitní chromatografie (AC) - stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) [1] [7] .

4.1.3 Postupný vývoj HPLC

Kolonová chromatografie (LLC) je metoda již dlouho známá. V klasickém provedení (kolony délky 0,5 m, vnitřní průměr kolem 10 mm, průměr části stacionární fáze 0,05 až 1 mm) se používala tak do poloviny šedesátých let. Mobilní fáze se pohybovala gravitací, průtok činil řádově jednotky mililitrů za minutu. Separace byly málo účinné (desítky teoretických pater) a doba analýzy dlouhá (až několik hodin) [4] .

Pro separace komplikovaných směsí látek se vyvinula vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [4] . Vysoká účinnost se dosahuje použitím stacionárních fází, které jsou známy hlavně tím, že obsahují částice malé velikosti a pravidelného tvaru, které homogenně vyplňují kolonu. Účinnost této metody dosahuje řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony. Průtok mobilní fáze je poháněn vysokým tlakem, proto se někdy nazývá vysokotlaká kapalinová (High - Pressure Liquid Chromatography) [4] .

Cílem moderních trendů v kapalinové chromatografii bylo získání co nejrychlejší chromatografické separace při zachování nebo zlepšení její kvality z hlediska jak účinnosti, rozlišení, tak i citlivosti daného měření. Důvodem tohoto zrychlení bylo zmenšování částic chromatografického sorbentu až na velikost menší než 2 μm , s čím přichází i zvýšení zpětného tlaku systému, i značné instrumentální limitace. Současně však docházelo k rozvoji technologií, které dosahují rychlejší chromatografické separace jiným způsobem, například zvýšením teploty, nebo pomocí aplikace vysokých průtoků mobilní fáze na porézní nečasticové stacionární fázi, anebo s využitím částic povrchově porézních [5] .

4.1.3.1 Princip separace látek v kapalinové chromatografii

HPLC, jak už bylo zmíněno, se vyznačuje mnoha svými kladnými stránkami vzhledem k rychlosti svých analýz, reprodukovatelnosti výsledků i vysokou citlivostí. Tato metoda se stala ideální pro analyzování směsí s minimální přípravou daného vzorku, některé vzorky můžeme stanovovat již pouze po filtraci [18] [19] .

Chromatografické metody mají shodné principy, dochází k rovnováze složek ve směsi mezi dvěma nemísitelnými fázemi (nepohyblivou - stacionární fází u HPLC se jedná o kalinu a pohyblivou - mobilní fází). Nepohyblivá fáze svými mechanismy a vlastnostmi zadržuje složky ze směsi a pohyblivá fáze tyto látky eluuje a dochází k separaci. Z těchto informací můžeme určit, že se složky s větší afinitou ke koloně budou vázat více, a bude časově delší jejich eluce mobilní fází [20] [21] .

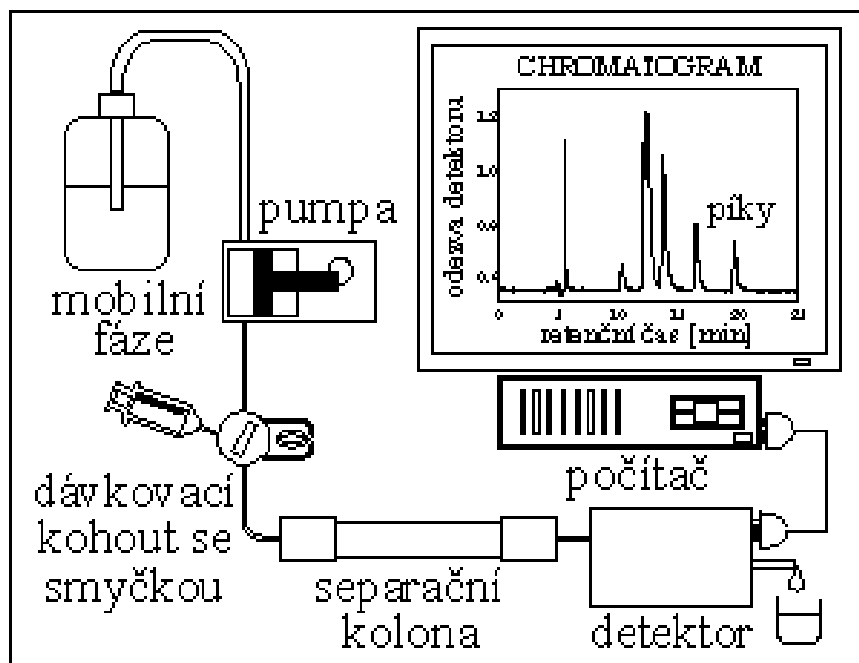
Jako sorbent kolony v dnešní době je nejobvyklejší organický hydrofobní sorbent a hydrofilní rozpouštědlo u fáze pohyblivé - mobilní. Vlastnosti těchto jsou hlavními ukazateli účinnosti, a proto je důležité dbát na kvalitu kolony, při použití stacionární fáze s menšími a stejnoměrnějšími částicemi, získáme účinnější separaci [18] [20] .

4.1.3.2 Instrumentace HPLC a odlišnosti UHPLC

Na obrázku č. 1 je uvedeno schéma kapalinového chromatografu:

- Čerpadlo - kapalina je do kolony čerpána pístovými nebo membránovými čerpadly, dobré čerpadlo může docílit průtoku až do desítek mikrometrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku 35MPa, materiál čerpadla nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky.
- Směšovací zařízení - složení mobilní fáze může zůstat stejné nebo může být měněno během separace (gradientová eluce).
- Dávkovací zařízení- dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska vnášení stop materiálu injekční stříkačky, v současné době jsou nahrazeny moderními autosamplery.
- Kolony - na trhu je dnes dostupné velké množství kolon různé délky, vnitřního průměru a různě chemicky modifikovaných stacionárních fází,

- Detektory - musí být selektivní pro analyty a málo citlivé pro mobilní fáze, nepoužívanější detektory jsou spektrofotometrický, fluorescenční a hmotnostní (MS) [4] [18].



Obrázek 1 - Schéma kapalinového chromatografu [18]

Specifikace instrumentace UHPLC:

- rychlé dávkování velmi malých objemů,
- robustní čerpadlo a dávkovací systém,
- nejmenší možné zpoždění gradientu,
- vysoká frekvence sběru dat (až 80Hz),
- minimální mimokolonové objemy (detekční cela je nízkoobjemová, kapiláry),
- vhodné stacionární fáze (při vysokých tlacích musí být mechanicky stabilní, částice menší než $2\mu\text{m}$) [5].

4.1.3.3 Validace chromatografické metody

Validace je získávání důkazu, které zajišťují jistý stupeň jistoty, že určitý proces bude poskytovat produkt předem odpovídající specifikaci. Základním kritériem je získat

dostatek údajů, aby bylo možné posoudit, zda metoda či systém jsou vhodné pro zamýšlený účel [9]. Validace analytické metody pokrývá několik následujících parametrů. Součástí validace chromatografické metody je také tzv. test vhodnosti chromatografického systému, který pokrývá rozlišení analyzovaných látek, asymetrii píků a počet teoretický pater kolony pro zvolenou separaci.

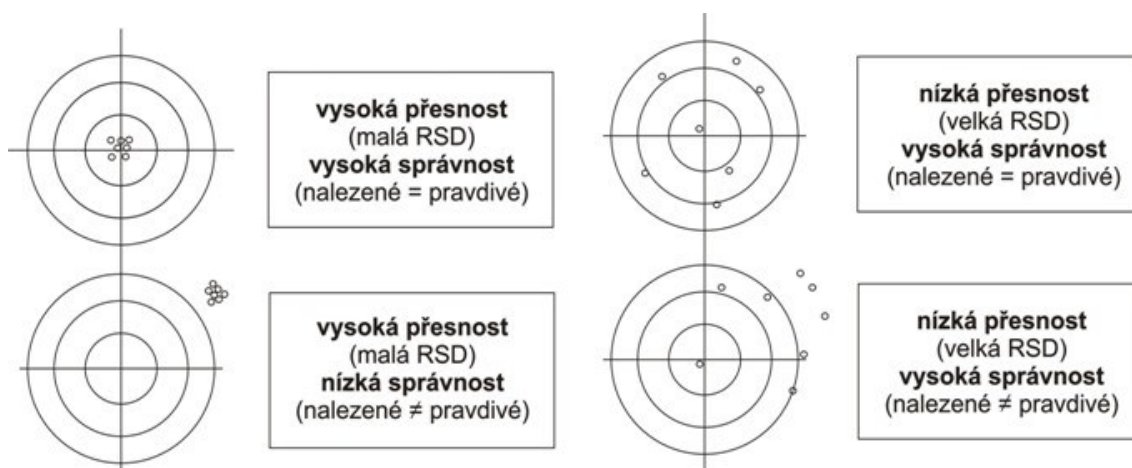
4.1.3.3.1 Správnost

Můžeme ji definovat jako těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou hodnotou referenční. Rozdíl mezi těmito hodnotami je nazýváme chybou. Pokud v průběhu řady zkoušek zůstává výsledek konstantní nebo se mění způsobem, který můžeme předvídat, jedná se o chybu systematickou. Naopak chyba, která se v průběhu zkoušek mění nepředvídatelným způsobem, je nazývána náhodnou chybou výsledku a nelze ji žádným způsobem odstranit. Rozdíl mezi průměrem hodnot výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou je nazýváno odchylkou

Správnost můžeme vyjádřit jako výtěžnost, což je poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě [5].

4.1.3.3.2 Přesnost

Přesnost je definována jako míra těsnosti vzájemně nezávislých výsledků zkoušek za předem specifikovaných podmínek. Přesnost závisí pouze na rozdělení chyb a nemá žádný vztah k pravé hodnotě. Míru přesnosti můžeme vyjádřit jako směrodatnou odchylku výsledků zkoušek [10].



Obrázek 2 - Vyjádření přesnosti a správnosti [22]

4.1.3.3.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody definujeme jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek, které jsou získávány za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek jsou získávány použitím stejné zkušební metody, identický materiál, shodná laboratoř, stejný pracovník za použití identických přístrojů a zařízení) [5] .

4.1.3.3.4 Linearita

Linearita je chápána jako schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací vzorkového analytu. V analytické chemii je linearita přímá závislost veličiny (signál) na druhé nezávisle proměnné (koncentrace), kdy hodnota první je pouze násobkem druhé hodnoty veličiny, k výsledku může být ještě přičtena konstanta. Lze říci, že se jedná o závislost přímkovou, ale v některých případech mohou být využívány i nelineární závislosti [5] .

4.2 Parabeny

4.2.1 Základní charakteristika konzervačních látek

Konzervační látky jsou součástí všech kosmetických přípravků, které mají základ vodu nebo vodu ve své zevní fázi (emulzní systémy typu olej/voda, které nazýváme nemastné krémy). Tyto konzervační látky brání degradaci kosmetických přípravků, kontaminaci mikroorganismy a dalším dějům, které by bez nich probíhaly. Mezi konzervační látky patří například estery kyseliny paraaminobenzoové (parabeny), konzervační látky odštěpující formaldehyd (Quaternium, bronopol, diazolidinylurea, imidazolidinylurea bronopol, DMDMhydantoin), Katon CG [11].

Parabeny se používají v kosmetice a potravinářském průmyslu přes 60 let, díky tomu že se jedná o konzervační látky s dobrým antimikrobiálním účinkem. Mezi nejběžněji používané patří methylparaben, butylparaben a propylparaben [12] [13] .

Konzervací kosmetiky zajistíme stabilitu a mikrobiologickou bezpečnost, konzervační látky slouží k snížení mikrobiálního růstu ve vodných soustavách a dále k redukci možnosti přežívání mikroorganismů v bezvodých přípravcích, které mohou být napadeny během používání. Při testování odhalíme typ a minimální potřebné (účinné) koncentrace látek ke konverzaci, které zajistí požadovanou ochranu přípravku [14] .

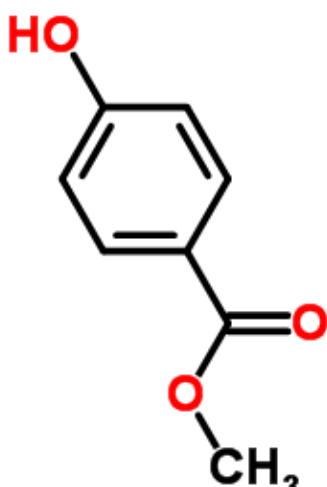
Téměř všechny přípravky kosmetické výroby by byly kontaminovány bez konzervace, výjimku tvoří pouze výrobky obsahující parafinické sloučeniny a výrobky s vyšším obsahem alkoholu.

Mikrobiologickou problematiku demonstrují tři hlavní problémy a to výskyt mikroorganismů *Pseudomonas aeruginosa*, výskyt některých kmenů koliformních mikroorganismů, výskyt některých plísní. Možnými zdroji mikrobiálního znečištění jsou suroviny, voda, výrobní zařízení a postupy, výrobní prostory a také lidská činnost [15].

4.2.2 Parabeny a jejich fyzikálně- chemické vlastnosti

Chemický název:

- methylparaben- methyl-4-hydroxybenzoát



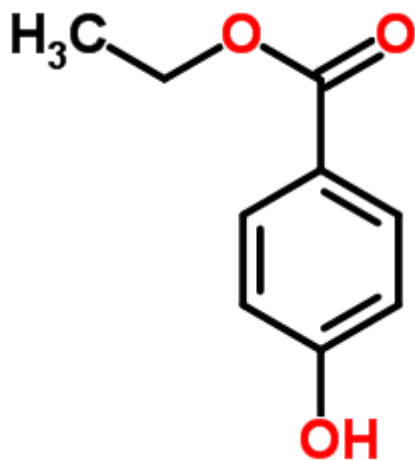
Molekulový vzorec - C₈H₈O₃

Log P - 1,87

Molární hmotnost - 152,15 g·mol⁻¹ [23]

Obrázek 3 - Chemická struktura methylparabenu [24]

- ethylparaben- ethyl-4-hydroxybenzoát



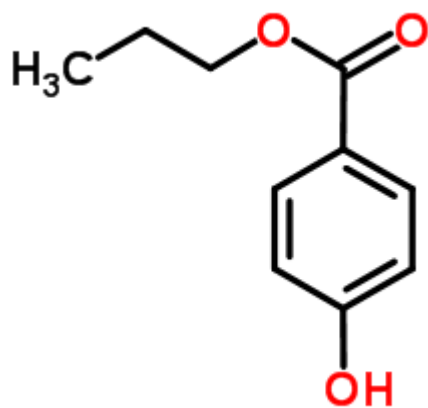
Molekulový vzorec - $C_9H_{10}O_3$

Log P - 2,40

Molární hmotnost - $166,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 4 - Chemická struktura ethylparabenu [24]

- propylparaben- propyl-4-hydroxybenzoát



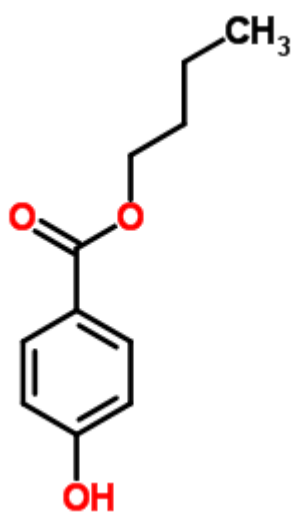
Molekulový vzorec - $C_{10}H_{12}O_3$

Log P - 3,04

Molární hmotnost - $180,203 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 5 - Chemická struktura propylparabenu [24]

- butylparaben- butyl-4-hydroxybenzoát



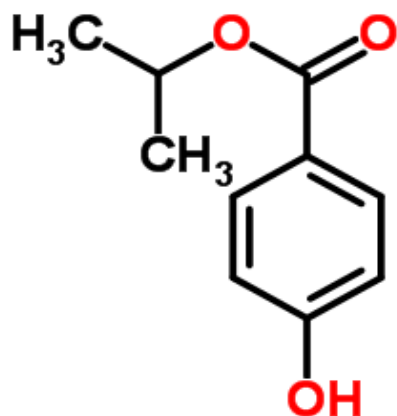
Molekulový vzorec - $C_{11}H_{14}O_3$

Log P - 3,57

Molární hmotnost - $194,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 6 - Chemická struktura butylparabenu [24]

- isopropylparaben- isopropyl-4-hydroxybenzoát



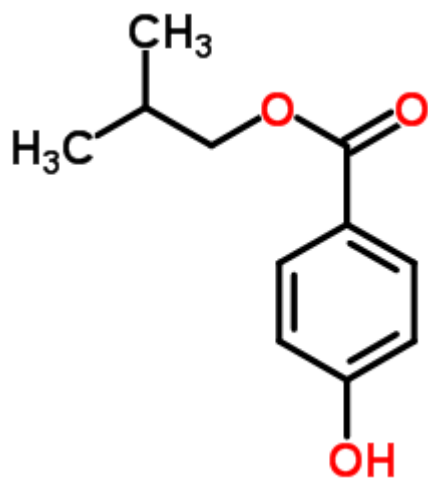
Molekulový vzorec - $C_{10}H_{12}O_3$

Log P - 2,74

Molární hmotnost - $180,203 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 7 - Chemická struktura isopropylparabenu [24]

- isobutylparaben- isobutyl-4-hydroxybenzoát



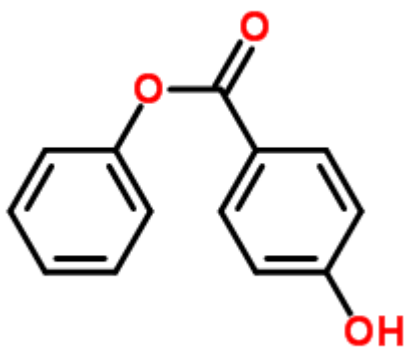
Molekulový vzorec - $C_{11}H_{14}O_3$

Log P - 3,28

Molární hmotnost - $194,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 8 - Chemická struktura isobutylparabenu [24]

- fenylparaben- fenyl-4-hydroxybenzoát

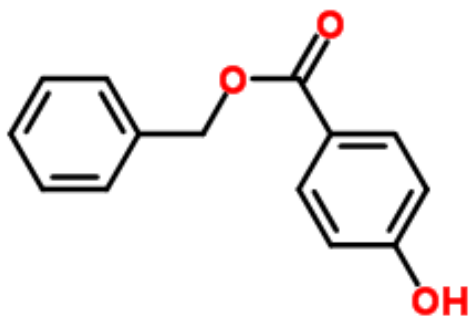


Molekulový vzorec - $C_{13}H_{10}O_3$

Molární hmotnost - $214,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 9 - Chemická struktura fenylparabenu [24]

- benzylparaben- benzyl-4-hydroxybenzoát

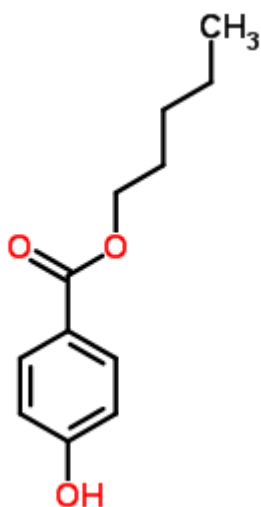


Molekulový vzorec - $C_{14}H_{12}O_3$

Molární hmotnost - $228,247\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 10 - Chemická struktura benzylparabenu [24]

- N-pentylparaben- pentyl-4-hydroxybenzoát



Molekulový vzorec – $C_{12}H_{16}O_3$

Molární hmotnost – $208.257\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [23]

Obrázek 11 - Chemická struktura pentylparabenu [24]

Parabeny jsou alkylestery kyseliny parahydroxybenzoové (4-hydroxybenzoové), látky efektivní v širokém rozmezí pH (nejvíce však při pH nad 7) a s rozsáhlým spektrem antibakteriální aktivity, která roste s délkou alkylového řetězce [16] .

Rozpustnost parabenů je v ethanolu, acetonitrilu, etheru, chloroformu a mírně nebo špatně rozpustné ve vodě [16] .

Vlastnosti: Jejich chování v daném prostředí je závislé na konkrétní látce, methylparaben reaguje rychle s hydroxylovými radikály v atmosféře, také podléhá fotolýze. Ve vodě nesedimentuje, ani není vázán na pevné částice. Člověk je vystaven parabenům hlavně kožním kontaktem, nebo například pozřením parabenů. Tělo je dobře přijímá, podléhájí rychlému metabolizování a následnému vyloučení. Mohou ale způsobovat kožní alergické reakce, a v organismu mají podobné účinky jako estrogeny. Bylo zjištěno, že určité množství parabenů je vstřebáno bez další metabolizace, proto bylo přijato nařízení, které stanovuje množství parabenů v kosmetických výrobcích [12] [13] .

4.2.3 Problematika v kosmetice

„Parabeny jako konzervační přísady jsou regulovány dle Nařízení Komise (EU) č. 1004/2014 ze dne 18. září 2014, kterým se mění příloha V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích pod názvem kyselina 4-hydroxybenzoová, její soli a estery s nejvyšší koncentrací 0,4 % pro jeden ester a 0,8 % pro směsi esterů.

Dle tohoto nařízení methylparaben a ethylparaben jsou při nejvyšších povolených koncentracích bezpečné. Isopropylparaben, isobutylparaben, fenylparaben, benzylparaben a pentylparaben byly zakázány nařízením Komise (EU) č. 358/2014, butylparaben a propylparaben jako konzervační přísady v konečných kosmetických přípravcích jsou pro spotřebitele bezpečné, nepřevyšuje-li souhrn jednotlivých koncentrací 0,19 % (jako estery).

U běžných kosmetických přípravků obsahujících butylparaben a propylparaben, kromě specifických přípravků k ošetření pokožky v oblasti pleny, neexistuje pro děti jakékoli věkové skupiny žádné bezpečnostní riziko, neboť bezpečnostní rozpětí vychází z velmi konzervativních předpokladů, jak pokud jde o toxicitu, tak o expozici. Dále je uvedeno, že v případě přítomnosti butylparabenu a propylparabenu v kosmetických přípravcích, které se neoplachují a jež jsou určeny k ošetření pokožky v oblasti pleny u dětí mladších šesti měsíců, nelze vyloučit riziko plynoucí z nedostatečně vyvinutého metabolismu těchto dětí a možného podráždění pokožky v uvedené oblasti. Za předpokladu nejhorší možné

expozice vůči těmto látkám by mohlo určité bezpečnostní riziko existovat. Pokud jde o kyselinu 4 - hydroxybenzoovou a její soli (calcium paraben, sodium paraben, potassium paraben), nebyly vyjádřeny žádné obavy ohledně jejich bezpečnosti. Komise se domnívá, že další používání butylparabenu a propylparabenu za současných podmínek by mohlo představovat potenciální riziko pro lidské zdraví.“ [26].

4.2.4 Metody stanovení parabel

V odborné literatuře je možné nalézt velkou škálu metod zabývajících se stanovením parabenů. Jedná se především o chromatografické metody. Z těchto metod bylo vybráno pouze několik příkladů se stručným popisem podmínek analýzy:

1) UHPLC - IC/ UV – VIS

Kolona: UltiMateUHPLC XB-C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 μm)

Mobilní fáze: methanol/voda (60 : 40, v/v)

Analyzovány tyto látky: methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben [27] .

2) UHPLC/ UV – VIS

Kolona: PerkinElmer Brownlee Analytical DB - C18 kolona (50 x 2.1 mm, 1.9 μm)

Mobilní fáze: acetonitril/methanol (70 : 30, v/v)

Analyzovány tyto látky: methylparaben, ethylparaben, isopropylparaben, n-propylparaben, isobutylparaben, n- butylparaben [28] .

3) HPLC/ UV - IR

Kolona: Beckman C₈ 5μm 250 x 4,6 mm

Mobilní fáze: acetonitril/voda (70:30) a methanol/voda (60:40)

Teplota: 45 °C

Rychlost průtoku: 1 ml/min

Analyzovány tyto látky: methylparaben, ethylparaben, propylparaben [29] .

4) HPLC/ UV – VIS

Kolona: Macherey-Negal Column C18 (250mmx4.6mm)

Mobilní fáze: acetonitril/voda (65:35)

Rychlost průtoku: 1,5 ml/ min

Analyzovány tyto látky: methylparaben, propylparaben [30] .

5) HPLC/ UV

Kolona: Inertsil/Wondasil-C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm)

Mobilní fáze: methanol/water (0.02 mol/L ammonium acetate) (70/30, v/v);
izokratická mobilní fáze

Rychlost průtoku: 1 ml/min

Teplota: 25 °C

Analyzovány tyto látky: methylparaben, ethylparaben, propylparaben,
butylparaben [31] .

5 Experimentální část

5.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- UltiMate™ 3000 HPLC and UHPLC Systém (Waltham, USA)
- Analytické váhy Sartorius Genius (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety Biohit 100 µl, 500 µl a 1000 µl
- Minitřepačka IKA MS3 Basic (IKA Works, USA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)

5.2 Standardy

- Methyl-4- hydroxybenzoát- (Fluka, Německo)
- Ethyl-4-hydroxybenzoát- (Fluka, Německo)
- Propyl-4-hydroxybenzoát- (Fluka, Německo)
- Butyl-4-hydroxybenzoát- (Fluka, Německo)
- Isopropyl-4-hydroxybenzoát- (Sigma – Aldrich, Německo)
- Isobutyl-4-hydroxybenzoát- (Sigma – Aldrich, Německo)
- Fenyl-4-hydroxybenzoát- (Sigma – Aldrich, Německo)
- Benzyl-4-hydroxybenzoát-(Sigma – Aldrich, Německo)
- Pentyl-4-hydroxybenzoát-(Sigma – Aldrich, Německo)

5.3 Chemikálie

- Methanol HPLC grade $\geq 99,9$ % (Sigma – Aldrich, Německo)
- Acetonitril, HPLC grade $\geq 99,9$ % (Sigma – Aldrich, Německo)
- Ultračistá voda

5.4 Testované kolony

- Fortis SpeedCore, 2.6 µm 100 x 3 mm
- Ascentis Express RP-Amide, 2.7 µm 100 x 4.6 mm

- Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 2.7 μm 100 x 3 mm
- Ascentis Express C18, 2.7 μm 100 x 2.1 mm
- Ascentis ES-Cyano, 3 μm 100 x 4.6 mm
- Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Kinetex Phenyl-Hexyl 100A, 2.6 μm 100 x 4.6 mm
- Kinetex C18 100A 2.6 μm 100 x 2.1 mm
- Onyx™ Monolithic C18, 100 x 4.6 mm

5.5 Testované kosmetické přípravky

- Emulze po opalování, sun spray
- Essential, hydratační krém na ruce
- Krém na ruce, olivový
- Peeling na pleť
- Sprej na tělo
- Šampón na vlasy

5.6 Příprava mobilních fází

Pro hledání nejvhodnější mobilní fáze byl používán methanol, acetonitril a směs acetonitrilu s methanolem namíchaný v poměru 2:1, oba organické modifikátory ve směsi s vodou.

5.7 Příprava pracovních roztoků

5.7.1 Příprava roztoků standardů

Všechny látky byly dostupné jako pevné substance a po zjištění teoretických informací o jejich rozpustnosti byl použit methanol jako rozpouštědlo. Nejprve byl vytvořen roztok o koncentraci 1000 ppm navážkou 1 mg látky na 1 ml rozpouštědla, poté z tohoto roztoku bylo odebráno do vialky 100 μl a naředěno 900 μl methanolu, po každé analýze se

musely vialky opatřit novým víčkem a uchovávat v lednici. Před novým měřením se opět muselo zkontrolovat, jestli nevznikla v roztoku sraženina, a pokaždé protřepat na minitřepačce. V případě že další analýza probíhala po delší době například 14 dnů, se ve vialkách ukázal zákal či sraženina, musela se provést nová příprava roztoků stejným způsobem,

5.7.2 Příprava roztoků pro validaci selektivity metody

Pro tuto validaci bylo nutné připravit roztok každého standardu zvlášť o koncentraci 10 µg/ml a poté připravit stejně koncentrovaný roztok směsi všech látek.

5.7.3 Příprava roztoků pro validaci linearity

Při přípravě roztoků pro kalibrační křivku bylo vybráno šest koncentrací, v rozmezí 5, 10, 12,5, 25, 50 a 100 µg/ml. První byl připraven roztok s parabenem o koncentraci 100 µg/ml a po té docházelo k ředění. Všechny tyto koncentrace musely být změřeny třikrát.

5.7.4 Příprava roztoků pro validaci opakovatelnosti

Příprava tří koncentrací roztoků 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, každý tento vzorek o dané koncentraci byl sedmkrát změřen.

5.7.5 Příprava roztoků pro validaci přesnosti a správnosti

Pro stanovení přesnosti a správnosti byly připraveny vzorky o koncentraci 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, tyto vzorky jednotlivých koncentrací byly změřeny šestkrát pro přesnost a třikrát pro správnost.

5.7.6 Příprava extraktů z reálných vzorků

U přípravy extraktů z reálných vzorků se postupovalo u všech přípravků shodně, bylo naváženo přibližně 0,1 g přípravku na analytických vahách, přesněji u přípravku emulze po opalování 0,10390 g, hydratační krém na ruce 0,10115 g, olivový krém na ruce

0,10258 g, peeling na pleť 0,10070 g, sprej na tělo 0,10139 g a šampón na vlasy 0,10373 g. Do kádinky byl dále přidán methanol v množství 100 ml a poté byly kádinky vloženy do ultrazvukové lázně na 15 minut. Tyto roztoky byly přefiltrovány přes 0,45 PTFE filtr a následně odebrány do vialky.

5.8 Provedení analýzy

Před použitím chromatografické kolony byla kolona promyta acetonitrilem a poté testovanou mobilní fází, pokaždé cca 10 minut. Ustanovení rovnováhy na koloně bylo zjištěno pomocí nástřiku čistého methanolu a kontrolou nulové linie detektoru. Důležitým parametrem připravenosti systému byly stále stejné tlaky při stejných podmínkách. Promývání kolony bylo provedeno na konci každého dne čistým acetonitrilem.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Vývoj metody UHPLC

Pro optimalizaci a vývoj metody UHPLC, při které budeme schopni separovat estery kyseliny p-hydroxybenzoové (parabeny) a dále je identifikovat v reálných vzorcích je důležitý výběr stacionární fáze (kolony), výběr mobilní fáze, posouzení vlivu teploty, gradientu a zpětného tlaku.

Nejprve musela být dávkována na kolonu každá látka samostatně, aby byly na chromatogramu identifikovány jednotlivé látky a zaznamenáno jejich eluční pořadí:

1 - methylparaben (MP), 2 - ethylparaben (EP), 3 - isopropylparaben (IPP), 4 - propylparaben (PP), 5 - isobutylparaben (IBP), 6 - butylparaben (BP), 7 - fenylparaben (FeP), 8 - benzylparaben (BeP), 9 - N-pentylparaben (N-PP).

V následující tabulce č. 1 není u fenylparabenu uveden retenční čas, protože byl do směsi parabenů přidán až po vymezení optimální stacionární fáze. Tato látka byla v době začátku analýzy nedostupná.

Podmínky při hledání retenčních časů standardů:

- Kinetex Phenyl-Hexyl 100 A, 2.6. μm 100 x 4,6 mm.
- Gradientová eluce – Acetonitril/voda – 50 % - 90 %.
- Teplota – 30 °C.

Standard	Retenční čas (v min)
Methylparaben	0,631
Ethylparaben	0,755
Isopropylparaben	0,495
Propylparaben	0,982
Isobutylparaben	1,335
Butylparaben	1,377
Fenylparaben	-
Benzylparaben	1,343
N-pentylparaben	2,082

Tabulka 1 - Retenční časy jednotlivých látek, připravovaných jako samostatné vzorky k určení jejich identifikace

6.1.1 Výběr stacionární fáze

Stacionární fáze musí splňovat dané parametry: být chemicky a tepelně stabilní, nereagovat s mobilní fází a nebo se v ní rozpouštět [5]. Vhodnost výběru stacionární fáze je posuzována zejména dle separace látek a času analýzy. Celkem bylo testováno devět kolon:

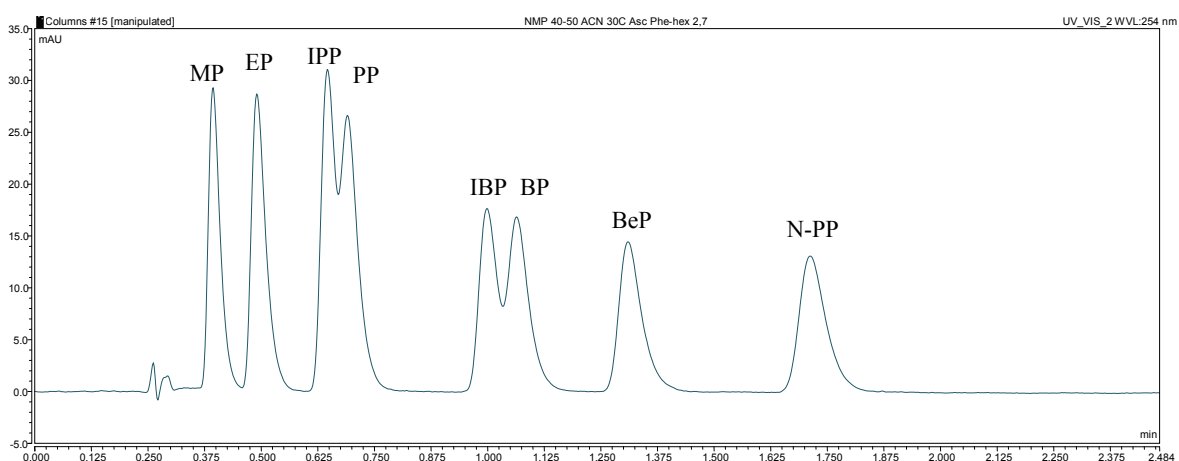
- Fortis SpeedCore C18, 2.6 μ m 100 x 3 mm - u této kolony nedošlo k separaci všech 8 látek, ale dá se říci, že čas analýzy byl uspokojivý.
- Ascentis Express RP-Amide, 2.7 μ m 100 x 4.6 mm - stacionární fáze vhodná pro polární sloučeniny a nebo směsi různé polarit. U této fáze došlo k lepšímu oddělování látek než u fáze předchozí, ale čas byl prodloužen na 18 minut.
- Express Phenyl-Hexyl, 2.7 μ m 100 x 3 mm - kolona vhodná pro aromatické látky a heterocyklické sloučeniny, s touto kolonou je komplementární kolona Ascentis Express C18, 2.7 μ m 100 x 2.1 mm, díky vhodnosti pro stejné látky. Obě tyto nepohyblivé fáze neseperoaly všech 8 látek.
- Ascentis ES-Cyano, 3 μ m 100 x 4.6 mm – špatná separace.
- Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm - u této stacionární fáze bylo zřejmé, že se jedná o optimální stacionární fázi, jako u jediné došlo k rozdělení všech látek za 6 minut.
- Kinetex Phenyl-Hexyl 100A, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm – byla by druhou volbou s časem separace okolo 6 min.
- Kinetex C18 100A, 2.6 μ m 100 x 2.1 mm - nevhodná kolona vzhledem ke špatné separaci.
- Onyx™ Monolithic C18, LC Column 100 x 4.6 mm – tato kolona je tvořena a vyplněna jednou částí porovitého materiálu. Na obrázku č. 17 je ukázána naprostá nevhodnost kolony

Podmínky při hledání optimální stacionární fáze:

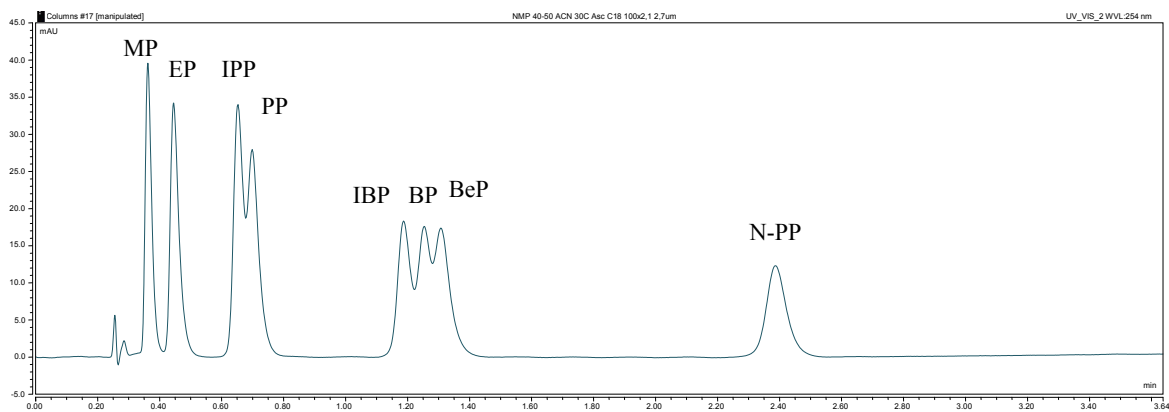
- Testované kolony
- Gradientová eluce – acetonitril/voda – 40 % - 50 %.
- Teplota – 30 °C.
- Rychlost průtoku - 1 ml/min.

Stacionární fáze	Čas analýzy (v min)
Fortis SpeedCore	1,4
Ascentis Express RP- Amide	7,8
Ascentis Express Phenyl-Hexyl	1,8
Ascentis Express C18	2,5
Ascentis ES- Cyano	1,7
Kinetex Biphenyl 100A	6,0
Kinetex Phenyl- Hexyl 100A	5,2
Kinetex C18	2,5
Onyx™ Monolithic C18	8,0

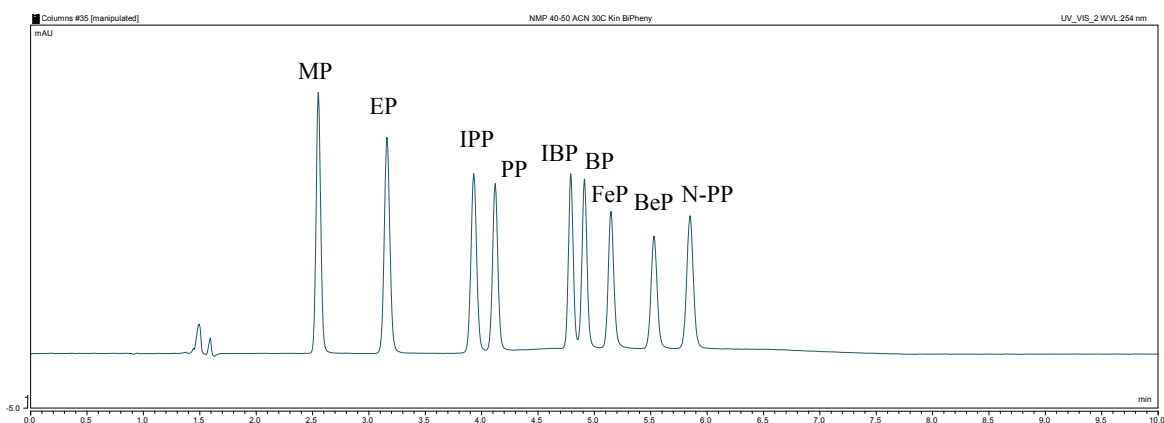
Tabulka 2 - Vyjádření časů analýz při použití jednotlivých stacionárních fází



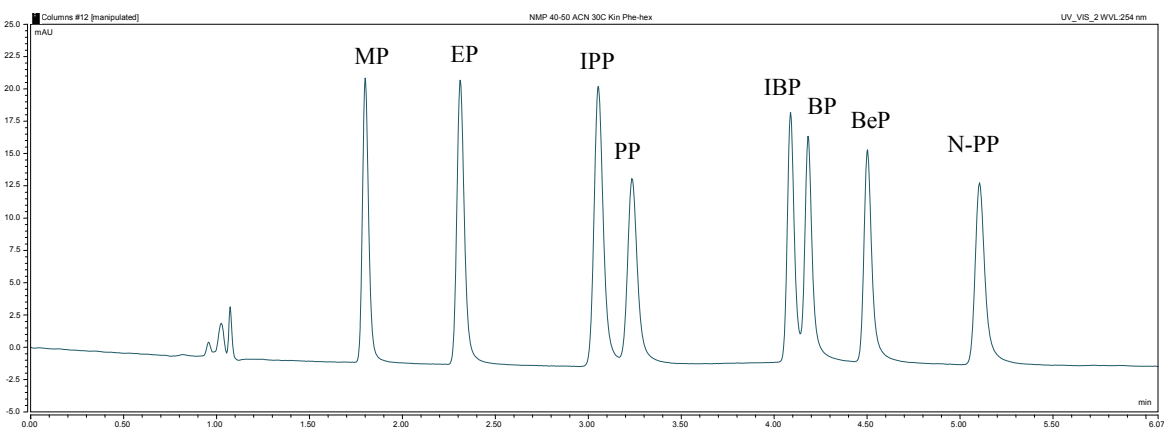
Obrázek 12 - Separace - stacionární fáze - Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 2.7 μ m 100 x 3 mm



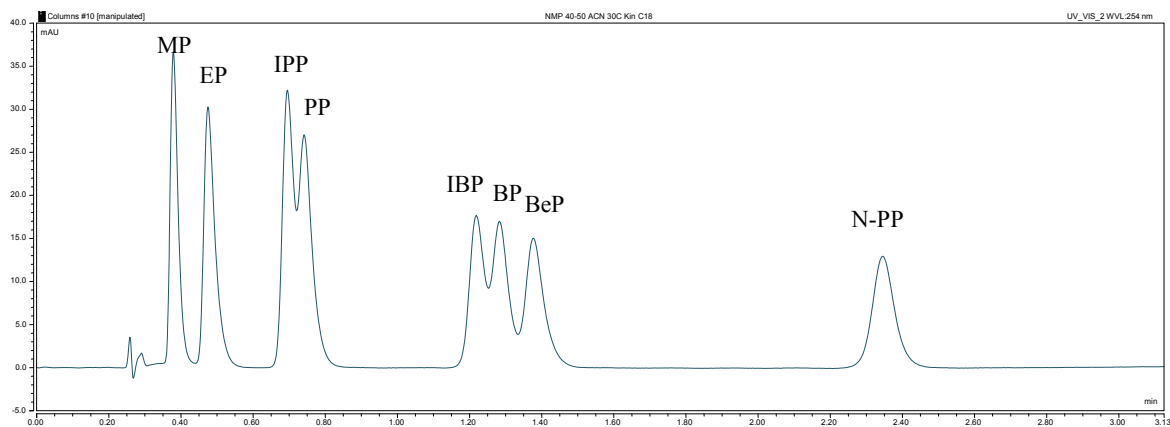
Obrázek 13 - Separace - stacionární fáze - Ascentis Express C18, 2.7 μ m 100 x 2.1 mm



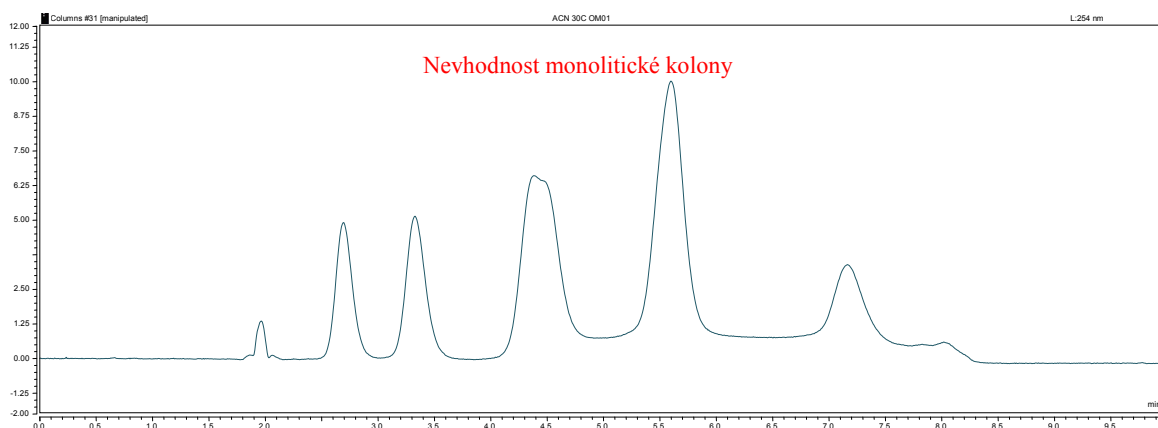
Obrázek 14 - Separace - stacionární fáze - Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm



Obrázek 15 - Separace - stacionární fáze - Kinetex Phenyl-Hexyl 100A, 2.6 μ m 100 x 4.6 mm



Obrázek 16 - Separace - stacionární fáze - Kinetex C18 100A, 2.6 μ m 100 x 2.1 mm



Obrázek 17 - Separace - stacionární fáze - Onyx™ Monolithic C18, 100 x 4.6 mm

6.1.2 Výběr mobilní fáze

Vzhledem k rozpustnosti látek byly testované mobilní fáze zvoleny dvě (acetonitril, methanol a jejich kombinace). Obě tyto fáze jsou polárními rozpouštědly a jejich vhodnost pro tuto analýzu je následující:

- Gradientová eluce – acetonitril/voda 40 % - 50 % - se ukázala jako nejlepší volba, proto byla ponechána jako další parametr.
- Gradientová eluce – methanol/voda 40 % - 50 % - se ukázala jako nevhodná, nedokázala odseparovat všechny parabeny a čas se velice prodloužil.

- Gradientová eluce – acetonitril + methanol 2:1/voda 40 % - 50 % - došlo ke zlepšení oproti eluci metanol/voda avšak nedosahovala takových kvalit jako acetonitril/voda.

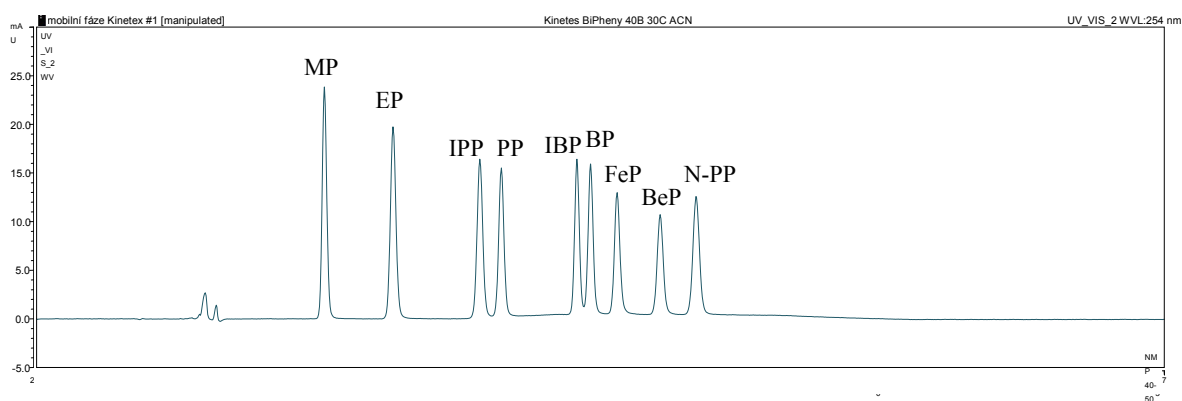
V této části analýzy už byla dostupná surovina fenylyparaben, proto od této chvíle jsou již výsledky zobrazovány s touto látkou jako sedmým píkem.

Podmínky při hledání optimální mobilní fáze:

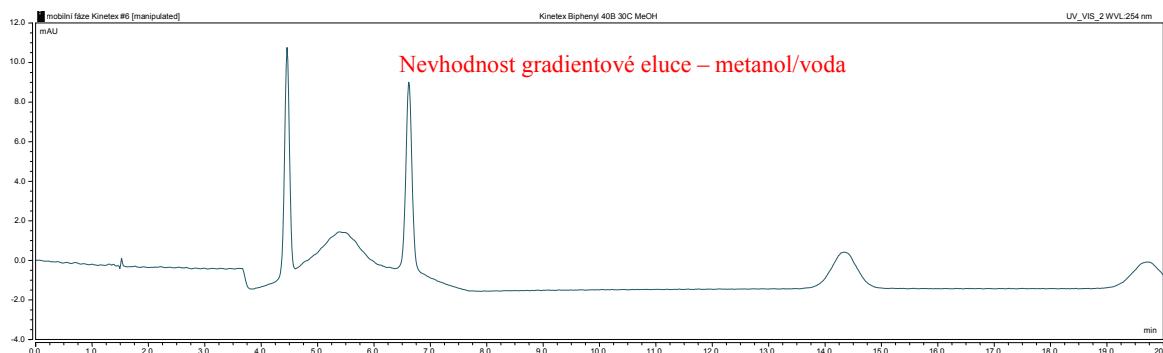
- Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
- Testované mobilní fáze
- Teplota – 30 °C.
- Rychlost průtoku - 1 ml/min.

Mobilní fáze	Čas analýzy (v min)
Acetonitril	6
Methanol	20
Acetonitril + Methanol 2:1	11

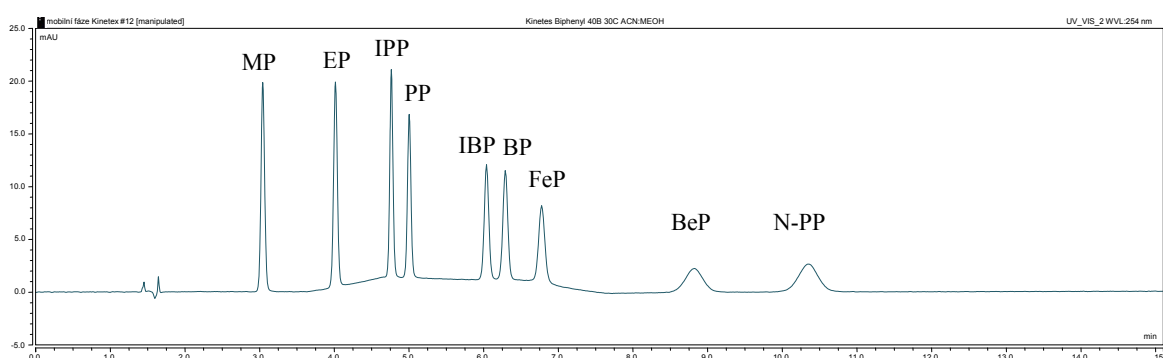
Tabulka 3 - Vyjádření časů analýz při použití různých mobilních fází



Obrázek 18 - Separace - mobilní fáze: gradientová eluce acetonitril/voda



Obrázek 19 - Separace - mobilní fáze: gradientová eluce methanol/voda



Obrázek 20 - Separace - mobilní fáze: gradientová eluce acetonitril + methanol 2:1/voda

6.1.3 Vliv teploty

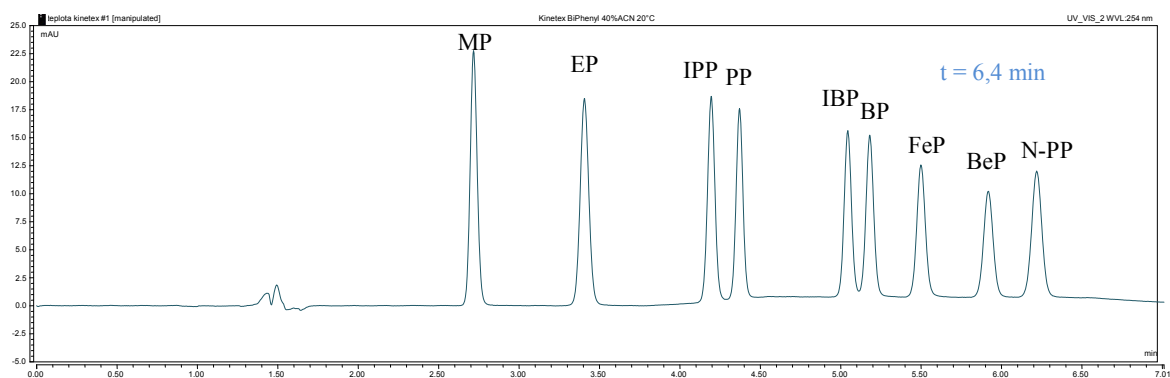
Byly testovány následující teploty: 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C - ukázalo se, že s rostoucí teplotou klesá čas analýzy ale nepatrně se zhoršuje tvar píků, proto podle sledování počtu teoretických pater hlavně u píku č. 5, 6, 7, byla vybrána teplota 40°C. Pro další práci na chromatografickém přístroji to bylo i snadnější než udržování vysoké teploty, kde čas analýzy byl pouze o 6 sekund rychlejší.

Podmínky při hledání optimální teploty:

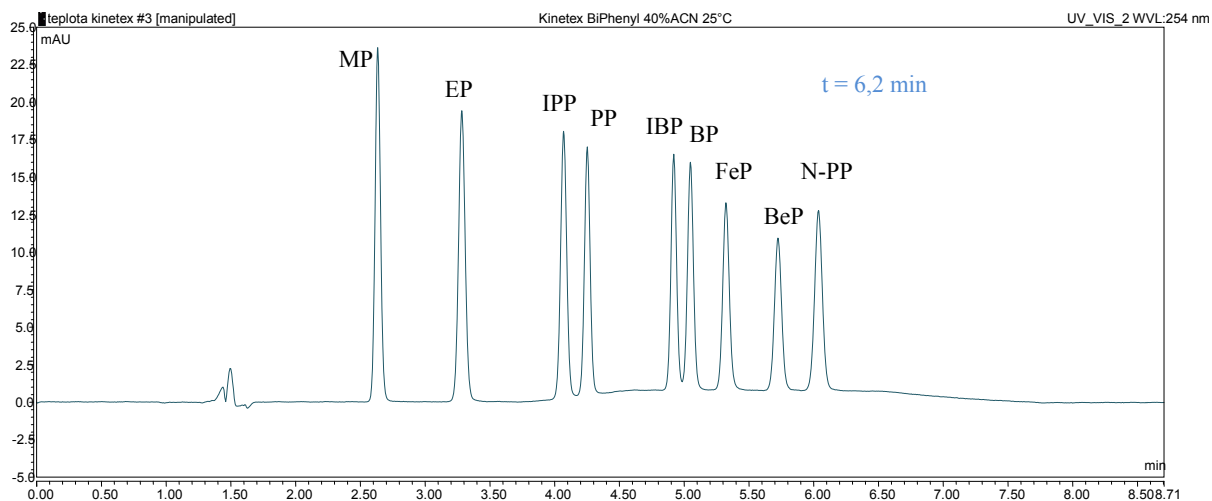
- Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm.
- Gradientová eluce – acetonitril/voda – 40 % - 50 %.
- Testované teploty.
- Rychlost průtoku - 1 ml/min.

Teplota (v °C)	Čas analýzy (v min)
20	6,4
25	6,2
30	6,0
35	5,8
40	5,6
45	5,4
50	5,25
55	5,1
60	4,9

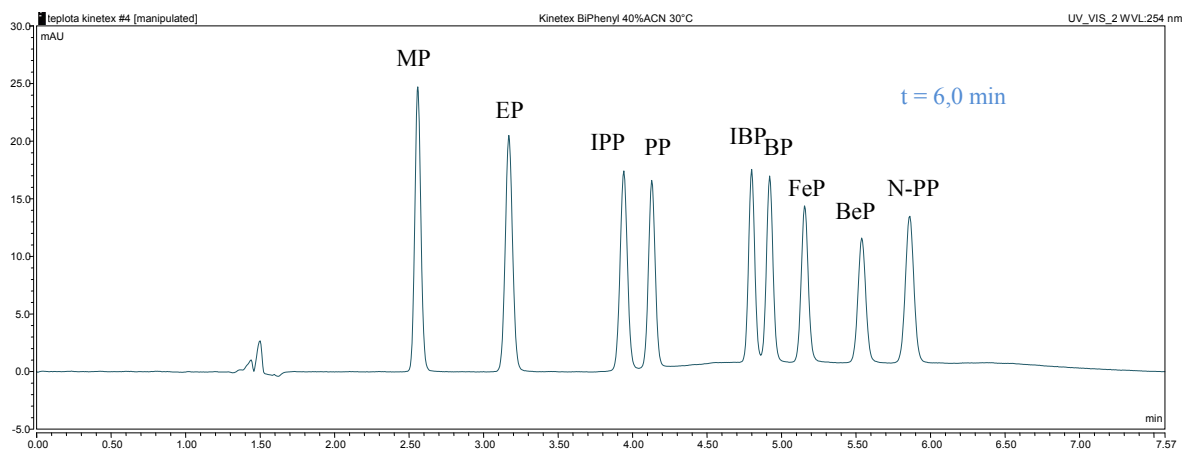
Tabulka 4 - Vyjádření časů analýz při použití různých teplot



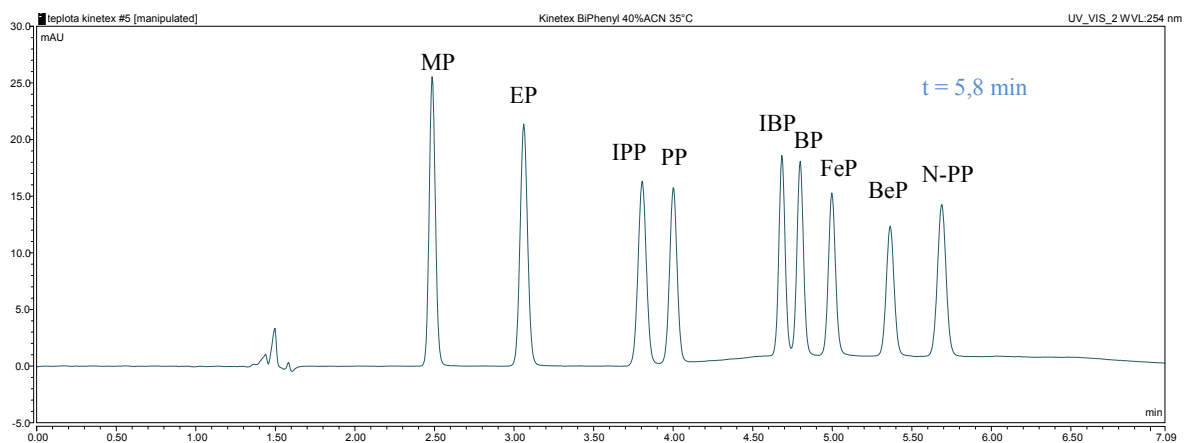
Obrázek 21 - Separace - teplota 20°C



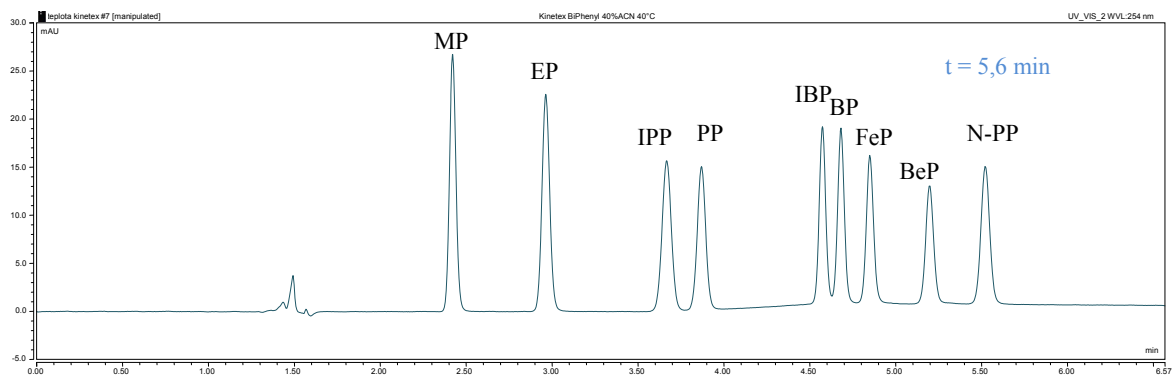
Obrázek 22 - Separace - teplota 25°C



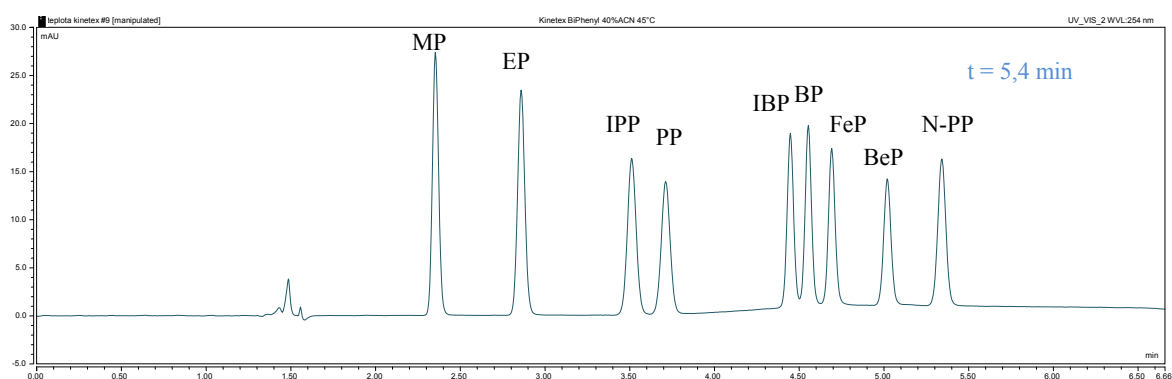
Obrázek 23 - Separace - teplota 30°C



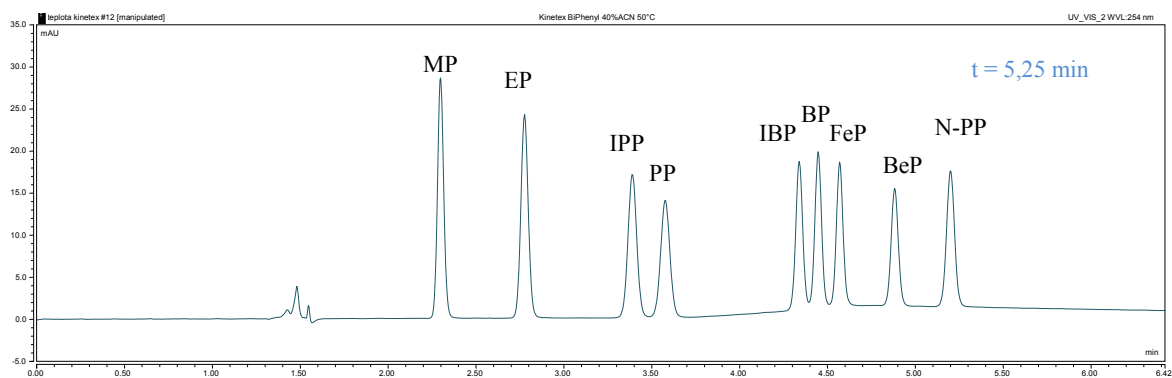
Obrázek 24 - Separace - teplota 35°C



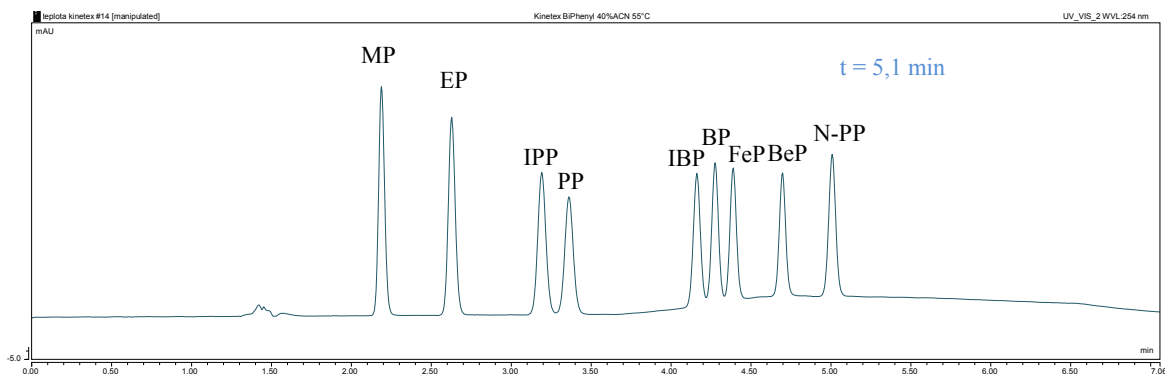
Obrázek 25 - Separace - teplota 40°C



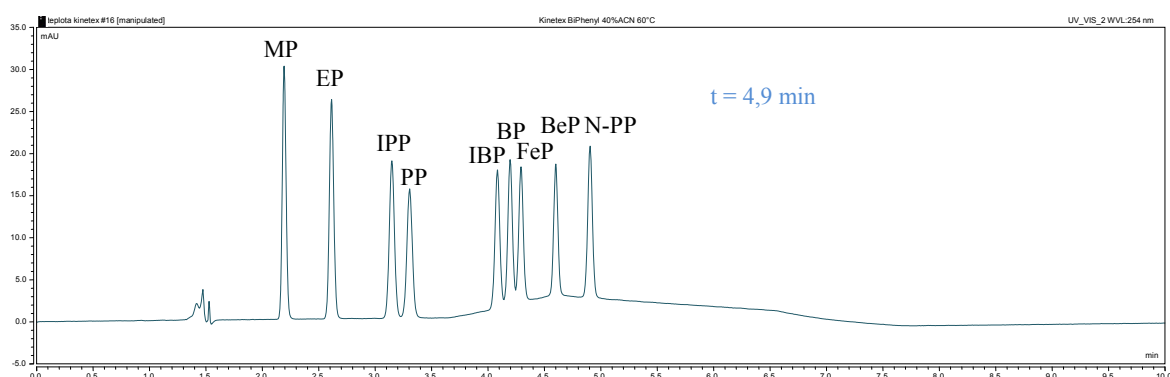
Obrázek 26 - Separace - teplota 45°C



Obrázek 27 - Separace - teplota 50°C



Obrázek 28 - Separace - teplota 55°C



Obrázek 29 - Separace - teplota 60°C

6.1.4 Vliv rychlosti průtoku mobilní fáze

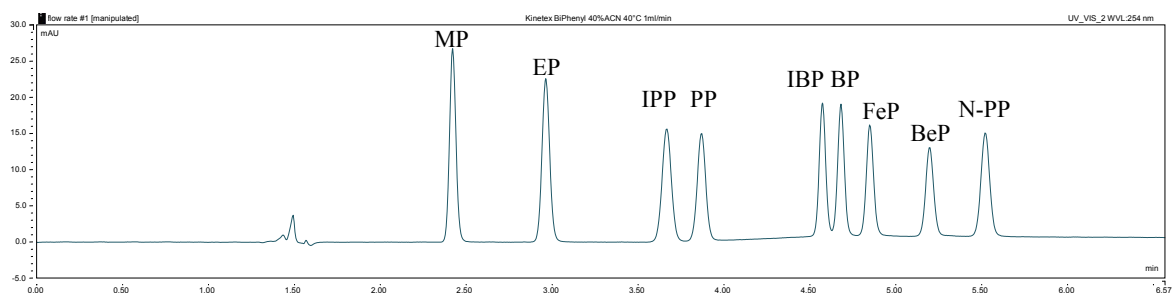
Byly zkoumány tři různé rychlosti průtoku: 1 ml/min, 2 ml/min a 2,5 ml/min. Ukázalo se, že čím vyšší je rychlost průtoku, tím rychlejší je analýza i lepší separace, ale došlo i k tomu, že se plocha píků zmenšila o polovinu. Při této rychlosti nebyl možný dostatečně rychlý sběr dat detektorem, proto byla zvolena střední hodnota 2 ml/min, která nám analýzu snižuje na celkový čas 3,6 min.

Podmínky při hledání optimální teploty:

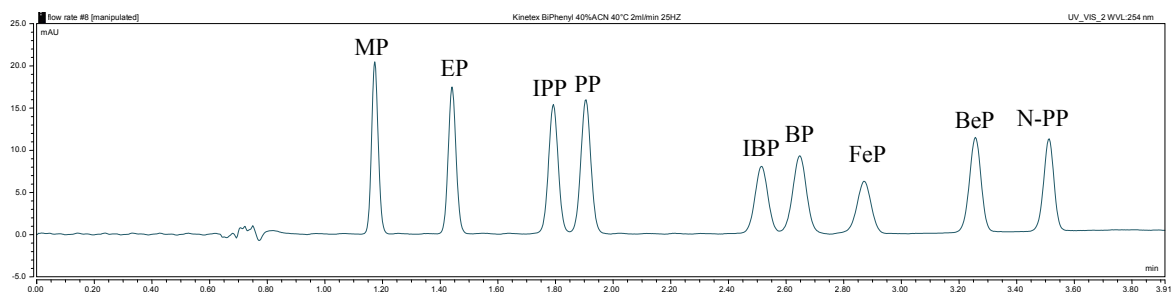
- Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm.
- Gradientová eluce – acetonitril/voda – 40 % - 50 %.
- Teplota 40 °C.
- Testované rychlosti průtoku.

Rychlost průtoku (ml/min)	Čas analýzy (v min)
1	5,6
2	3,6
2,5	1,7

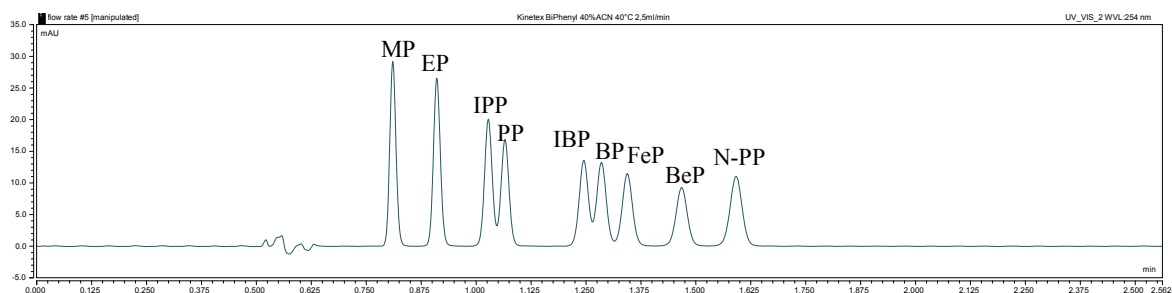
Tabulka 5 - Vyjádření časů analýz při použití různých rychlostí průtoků mobilní fáze



Obrázek 30 - Separace - rychlost průtoku 1 ml/min



Obrázek 31 - Separace - rychlost průtoku 2 ml/min



Obrázek 32 - Separace - rychlost průtoku 2,5 ml/min

6.1.5 Vliv gradientu

V předchozích optimalizacích byly testovány podmínky separace při gradientové eluci od 40 % do 50 % modifikátoru. Při další optimalizaci separace na vybrané koloně byly testovány gradientové eluce od 40 % - 60 % a 40 % - 70 % organické složky (acetonitrilu).

Při zvyšování gradientu nám klesal retenční čas daných látek, proto bylo rozhodnuto, že nejvyšší gradient bude poslední optimální podmínkou v hledání a následné aplikaci na reálné vzorky.

Podmínky při hledání optimální teploty:

- Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm.
- Gradientová eluce – acetonitril/voda – testovaný gradient.
- Teplota 40 °C.
- Rychlost průtoku 2 ml/min.

Gradient (%)	Čas analýzy (v min)
40 - 50	3,60
40 - 60	3,45
40 - 70	3,40

Tabulka 6 - Vyjádření časů analýz při použití různých gradientů modifikátoru

Čas analýzy (min)	Acetonitril (%)	Voda (%)
0	run	
2	40	60
3	50	50
4	50	50
5	50	50
6	40	60

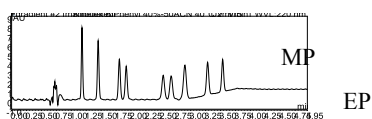
Tabulka 7 - Průběh gradientové eluce - 40 % - 50 %

Čas analýzy (min)	Acetonitril (%)	Voda (%)
0	run	
2	40	60
3	60	40
4	60	40
5	60	40
6	40	60

Tabulka 8 - Průběh gradientové eluce - 40 % - 60 %

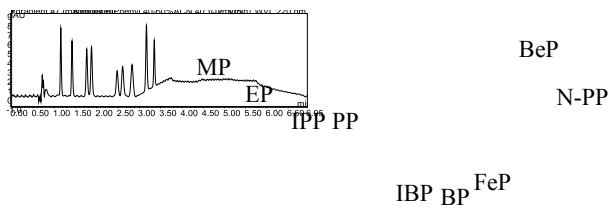
Čas analýzy (min)	Acetonitril (%)	Voda (%)
0	run	
2	40	60
3	70	30
4	70	30
5	70	30
6	40	60

Tabulka 9 - Průběh gradientové eluce - 40 % - 70 %

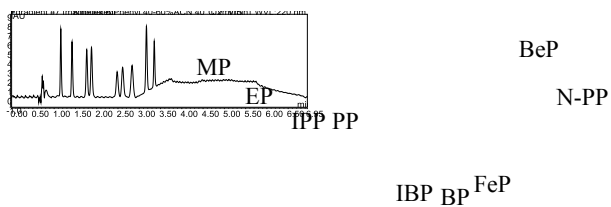


IPP
PP
IBP BP
FeP
BeP N-PP

Obrázek 33 - Separace - gradientová eluce 40 % - 50 %



Obrázek 34 - Separace - gradientová eluce 40 % - 60 %



Obrázek 35 - Separace - gradientová eluce 40 % - 70 %

6.1.6 Optimální podmínky

Po analýzách prověřující vlivy všech parametrů, byly zvoleny nejvhodnější podmínky, při kterých probíhala validace metody a aplikace na reálné vzorky.

Stacionární fáze: Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm

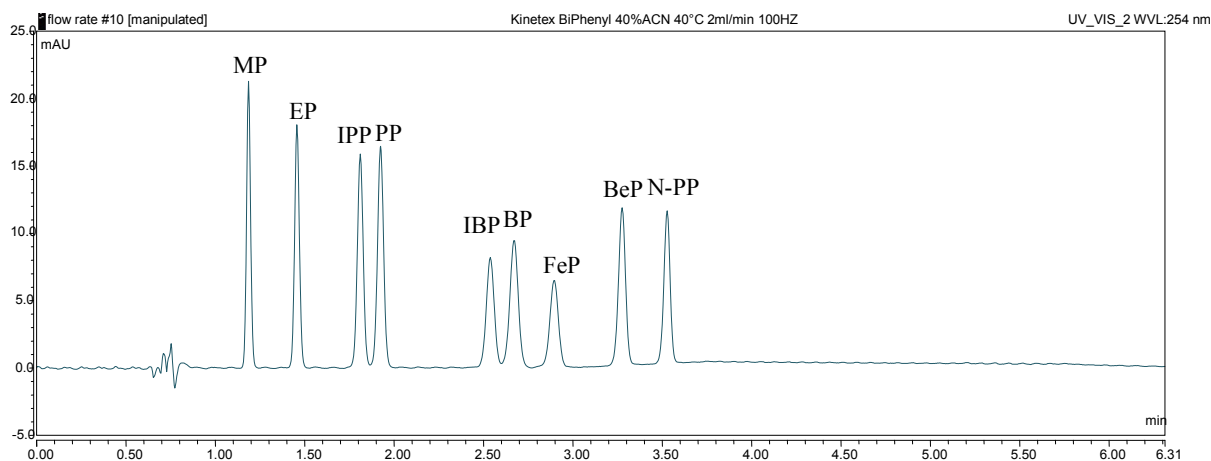
Gradientová eluce: Acetonitril/voda v poměru 40 % - 70 %

Teplota: 40°C

Průtok: 2 ml/min

Čas analýzy (min)	Acetonitril (%)	Voda (%)
0	run	
2	40	60
3	70	30
4	70	30
5	40	60
6	40	60

Tabulka 10 - Průběh gradientové eluce v čase



Obrázek 36 - Chromatogram s optimálními podmínkami- stacionární fáze: Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm, gradientová eluce: Acetonitril/voda 40 % - 70 %, teplota: 40 °C, průtok: 2 ml/min.

6.2 Validace

6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Prvním validačním testem je posouzení vhodnosti metody, porovnáním parametrů (faktor symetrie, rozlišení a počet teoretických pater). Tyto parametry jsou limitovány dle Českého Lékopisu i F.D.A. (Food and Drug Administration, USA, Maryland). Pro tento test byla připravena koncentrace 50 μ g/ml, která byla dávkována sedmkrát.

Analyzovaná látka	As	Rs	N
Methylparaben	1,09	6,62	17044
Ethylparaben	1,08	7,34	18351
Isopropylparaben	1,05	2,04	18657
Propylparaben	1,10	9,44	18725
Isobutylparaben	1,00	1,85	19815
Butylparaben	1,06	3,06	21546
Fenylparaben	1,00	4,63	31470
Benzylparaben	1,09	3,35	95782
N-pentylparaben	1,07	0	139123

Tabulka 11 - Tabulka analyzovaných látek s hodnotami zkoušených parametrů (As-faktor asymetrie, Rs- rozlišení, N- počet teoretických pater)

Limit udávaný Českým lékopisem pro faktor symetrie je 0,8 - 1,5, podle F.D.A. do 2,0. Naše výsledky tedy splňují požadavky. Dalším parametrem je rozlišení, které dle F.D.A. musí být větší než 2, kromě isobutylparabenu, který se nepatrně liší a N-pentylparabenu, u kterého tento parametr nelze stanovit ani v jednom nástřiku, všechny hodnoty odpovídají. Poslední zkoumanou veličinou je počet teoretických pater, které dle F.D.A. musí být větší než 2000, což splňují všechny látky [25].

6.2.2 Test specificity

V tomto testu se dokazuje, že označené parabeny na chromatogramech jsou opravdu danými látkami, můžeme to dokázat díky shodným retenčním časům, látek v samostatném roztoku i látek ve směsi. Použili jsme koncentraci 10 ppm, každou samostatnou látku třikrát změřili a zaznamenali průměr tohoto parametru. Poté jsme třikrát změřili koncentraci 10 ppm směsi a také provedli průměr retenčních časů látek. Vše je zobrazeno v následující tabulce.

Standard	Retenční čas (v min), standard	Retenční čas (v min), ve směsi
Methylparaben	1,216	1,223
Ethylparaben	1,49	1,5
Isopropylparaben	1,849	1,861
Propylparaben	1,96	1,975
Isobutylparaben	2,579	2,597
Butylparaben	2,706	2,729
Fenylparaben	2,929	2,941
Benzylparaben	3,17	3,179
N-pentylparaben	3,299	3,307

Tabulka 12 - Retenční časy ukazující shodu retenčních časů ve standardech a směsi

6.2.3 Linearita metody

Linearita metody byla testována pomocí kalibračních křivek všech látek a jejich 6 koncentrací, které byly 5, 10, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$. Každá koncentrace byla změřena třikrát k získání tří chromatografů a z nich ploch píků, postup přípravy roztoků je popsán v kapitole 4.7.2 . Hodnoty měření byly zaneseny do kalibračních křivek a byl vyhodnocen korelační koeficient, který byl u daných látek (Methylparaben - 0,9946, Ethylparaben- 0,9907, Isopropyl-paraben- 0,9622, Propylparaben-0,9711, Isobutylparaben- 0,964, Butylparaben- 0,9693, Fenylparaben- 0,9725, Benzylparaben- 0,9451, N-pentylparaben- 0,9694), korelační koeficient nemá ideální hodnotu, mohla to způsobit chyba v přípravě roztoků.

Analyzovaná látka	Rovnice	Korelační faktor
Methylparaben	$y = 0,204x - 1,0303$	$r = 0,9946$
Ethylparaben	$y = 0,0548x - 0,1398$	$r = 0,9907$
Isopropylparaben	$y = 0,0137x - 0,0253$	$r = 0,9620$
Propylparaben	$y = 0,0218x - 0,0889$	$r = 0,9711$
Isobutylparaben	$y = 0,0176x - 0,0982$	$r = 0,9640$
Butylparaben	$y = 0,0142x - 0,0592$	$r = 0,9693$
Fenylparaben	$y = 0,058x - 0,3093$	$r = 0,9725$
Benzylparaben	$y = 0,0167x - 0,0313$	$r = 0,9451$
N-pentylparaben	$y = 0,0136x - 0,0487$	$r = 0,9694$

Tabulka 13 - Přehled linearit

6.2.4 Opakovatelnost nástřiku

Touto kontrolní metodou, kdy připravíme 3 různé koncentrace a každou změříme sedmkrát, získáme hodnoty retenčního času a plochy píku. Z těchto hodnot stanovíme směrodatné odchyly, které jsou limitovány 2 %, nebo můžeme říct, že hodnota směrodatné odchyly musí být menší než číslo 0,02. Směrodatná odchylyka všech retenčních časů je splněna a směrodatná odchylyka ploch píků je plně splněna pouze u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$. U koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ nesplňuje tento limit látka metylparaben a fenylparaben. Směrodatná odchylyka u koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ byla splněna pouze u 2 látek, a to u metylparabenu a N-pentylparabenu. Ostatní látky této koncentrace byly nad limit 2 %. Tato metoda je hlavním ukazatelem přesnosti. Výsledky jsou ukázány v následující tabulce.

Analyzovaná látka	10µg/ml		50µg/ml		100µg/ml	
	A	tr (RSD %)	A	tr (RSD %)	A	tr (RSD)
	(RSD %)		(RSD %)		(RSD)	
Methylparaben	0,49%	0,04%	2,20%	0,10%	2,68%	0,00%
Ethylparaben	0,34%	0,04%	0,13%	0,16%	0,91%	0,05%
Isopropylparaben	0,75%	0,05%	0,33%	0,26%	5,45%	0,05%
Propylparaben	1,40%	0,04%	0,68%	0,26%	2,98%	0,05%
Isobutylparaben	0,10%	0,04%	1,43%	0,36%	4,63%	0,05%
Butylparaben	0,93%	0,04%	0,58%	0,39%	7,96%	0,05%
Fenylparaben	0,92%	0,07%	3,47%	0,36%	4,64%	0,05%
Benzylparaben	0,93%	0,00%	0,92%	0,26%	3,55%	0,05%
N-pentylparaben	0,44%	0,04%	1,01%	0,23%	0,98%	0,05%

Tabulka 14 - Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků

6.2.5 Přesnost a správnost metody

Přesnost metody je těsnost shody mezi nezávislými výsledky za předem definovaných podmínek, směrodatná odchylka je definována jako míra přesnosti. Správnost metody je těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou [32].

Míra přesnosti je limitována 2 %, tato podmínka je splněna u koncentrace 10 µg/ml, u koncentrace 50 µg/ml to nesplňuje látka (methylparaben a fenylparaben) a u 100 µg/ml to nesplňují látky (methylparaben, isopropylparaben, isobutylparaben, butylparaben, fenylparaben)

Optimum pro správnost je 97 % - 103 %, u všech koncentrací a látek je tato podmínka splněna, u koncentrace 10 µg/ml je rozmezí 97,6 % - 101,4 %. U koncentrace 50 µg/ml je rozptýl hodnot 99,3 % - 100,8 %. U poslední koncentrace 100 µg/ml je rozmezí správnosti 98,5 % - 100,4 %.

Analyzovaná látka	10µg/ml		50µg/ml		100µg/ml	
	Správnost	Přesnost	Správnost	Přesnost	Správnost	Přesnost
Methylparaben	101,27%	0,49%	99,75%	2,20%	100,29%	2,68%
Ethylparaben	100,28%	0,34%	100,23%	0,13%	100,25%	0,91%
Isopropylparaben	98,09%	0,75%	99,95%	0,33%	98,47%	5,45%
Propylparaben	99,35%	1,40%	99,87%	0,68%	99,39%	1,98%
Isobutylparaben	99,92%	0,10%	100,80%	1,43%	100,19%	4,63%
Butylparaben	101,42%	0,93%	100,61%	0,58%	99,41%	7,96%
Fenylparaben	97,59%	0,92%	99,26%	3,67%	100,38%	4,64%
Benzylparaben	99,69%	0,93%	100,78%	0,92%	99,75%	1,55%
N-pentylparaben	100,83%	0,44%	99,46%	1,01%	99,58%	0,98%

Tabulka 15 - Přehled hodnot pro správnost a přesnost

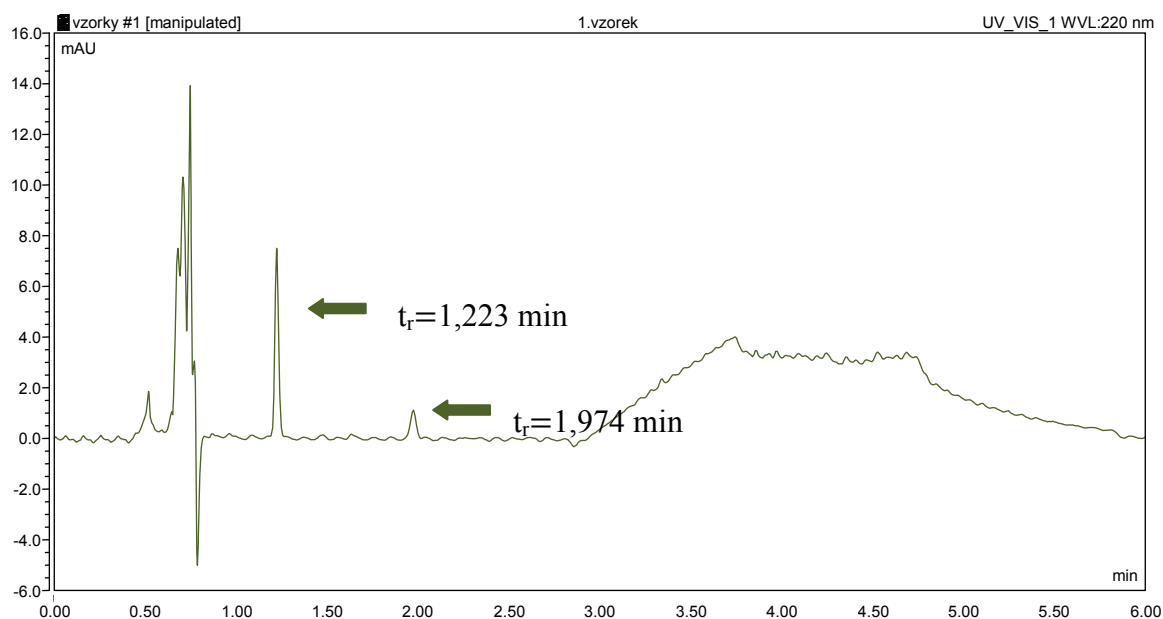
6.3 Aplikace UHPLC metody na reálné vzorky

Po validaci metody byla metoda použita pro aplikaci na reálné vzorky. Reálné vzorky byly náhodně vybrané na trhu v České Republice. 1. Emulze po opalování sun spray, 2. Hydratační krém na ruce, 3. Olivový krém na ruce, 4. Peeling na pleť, 5. Spray, 6. Šampon na vlasy. V těchto přípravcích jsme hledali přítomnost nelegálních i legálních konzervačních látek.

V tabulce č. 16 najdeme retenční časy jednotlivých látek stanovované ze směsi, které odpovídají metodě za validovaných podmínek. Tyto retenční časy umožňují identifikovat parabeny v reálných vzorcích.

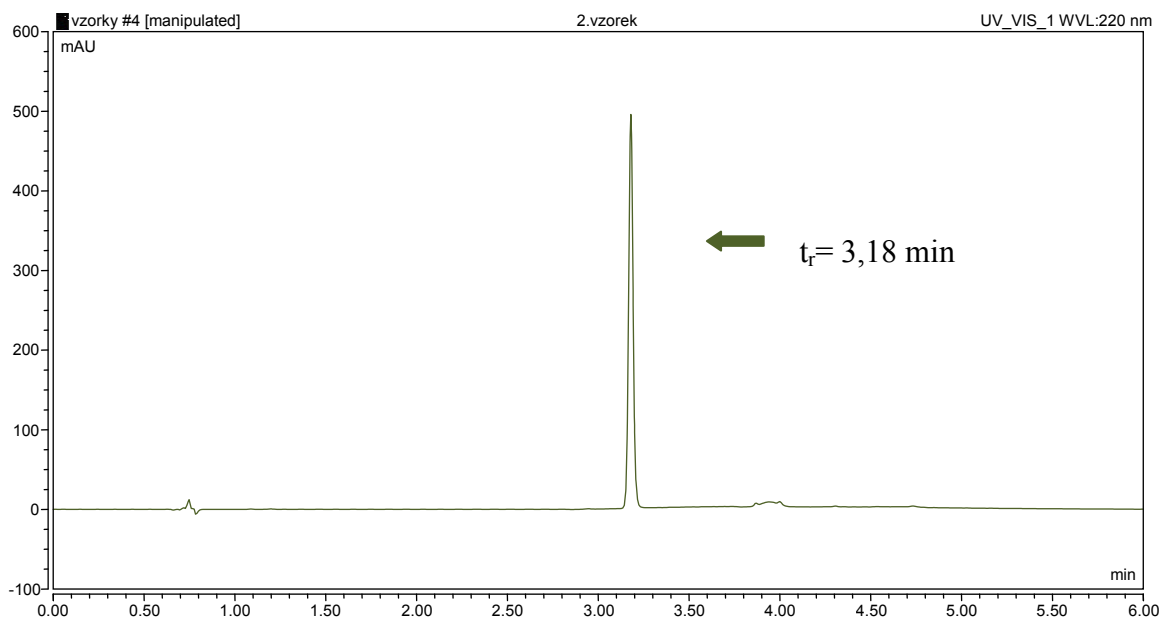
Standard	Retenční čas (v min)
Methylparaben	1,223
Ethylparaben	1,500
Isopropylparaben	1,861
Propylparaben	1,975
Isobutylparaben	2,597
Butylparaben	2,729
Fenylparaben	2,941
Benzylparaben	3,179
N-pentylparaben	3,307

Tabulka 16 - Retenční časy jednotlivých látek získaných ze vzorku směsi



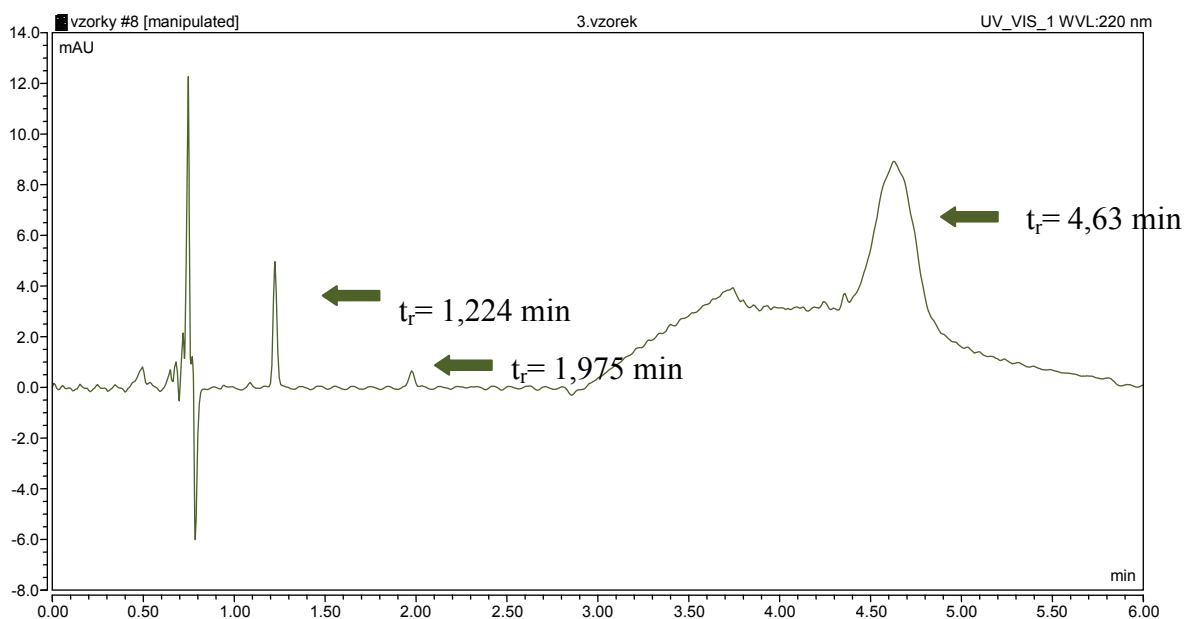
Obrázek 37 - Chromatogram zobrazující obsah v emulzi po opalování

V tomto vzorku byly objeveny píky, které mají retenční časy shodné s časy parabenů, methylparabenem a propylparabenem. Tento vzorek kosmetiky obsahuje methylparaben a propylparaben.



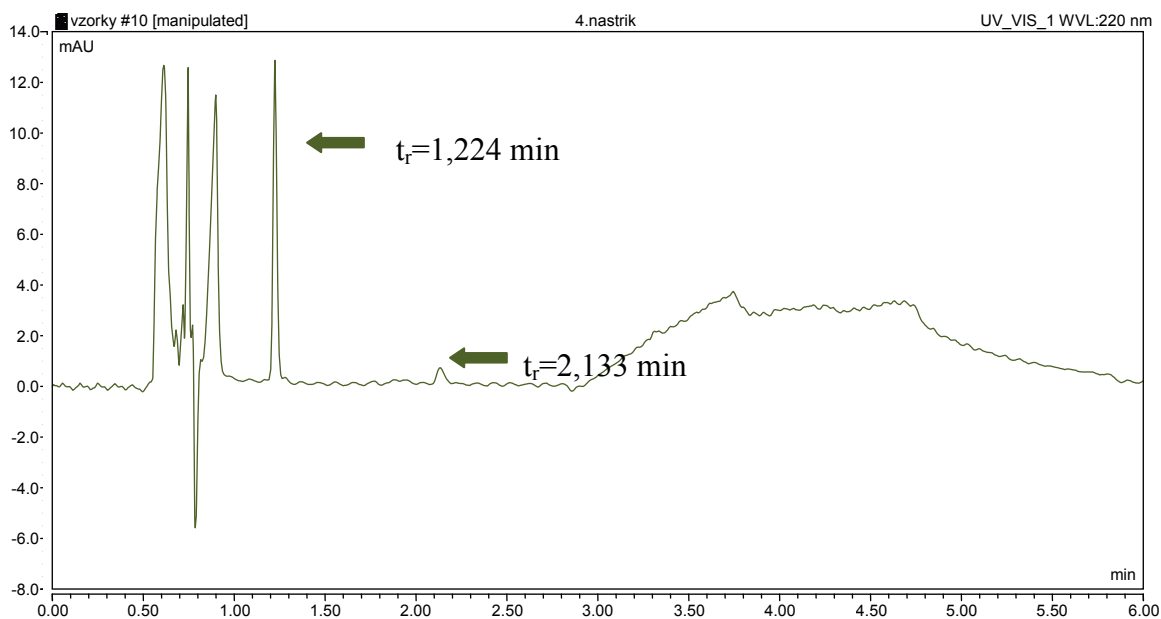
Obrázek 38 - Chromatogram zobrazující obsah hydratačního krému na ruce

Na obrázku 38 vidíme detekci benzylparabenu, opět se retenční čas shoduje se stanovenými hodnotami retenčních časů.



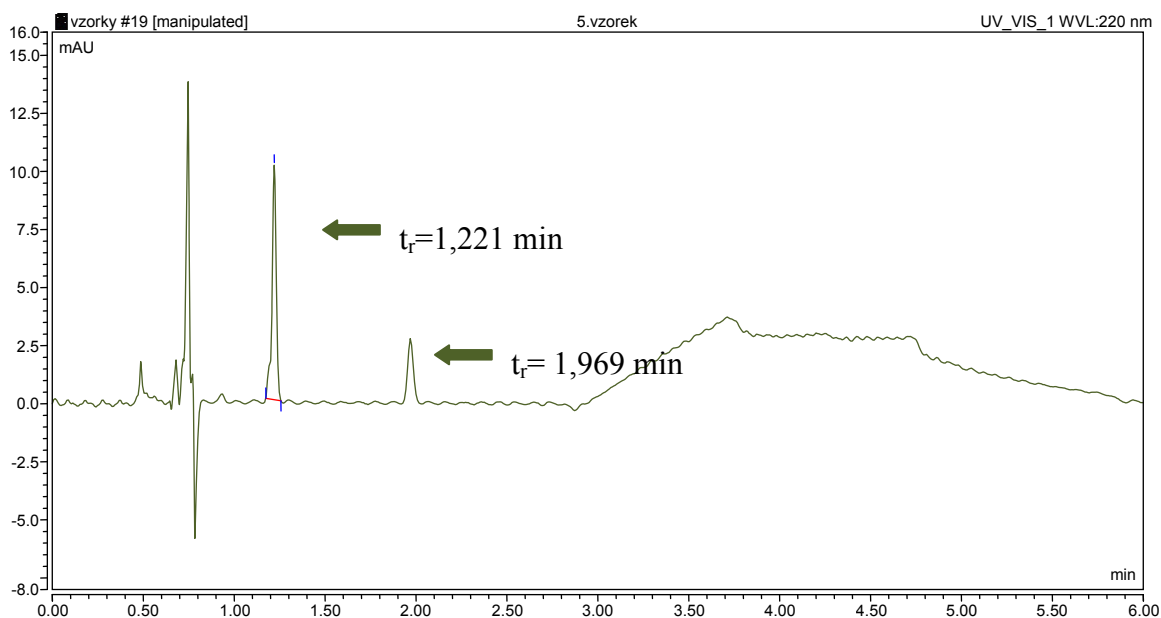
Obrázek 39 - Chromatogram zobrazující obsah v olivovém krému na ruce

V tomto vzorku lze opět potvrdit přítomnost methylparabenu, propylparabenu, poslední pík, není žádná z hledaných látek, může se i jednat o nečistotu.



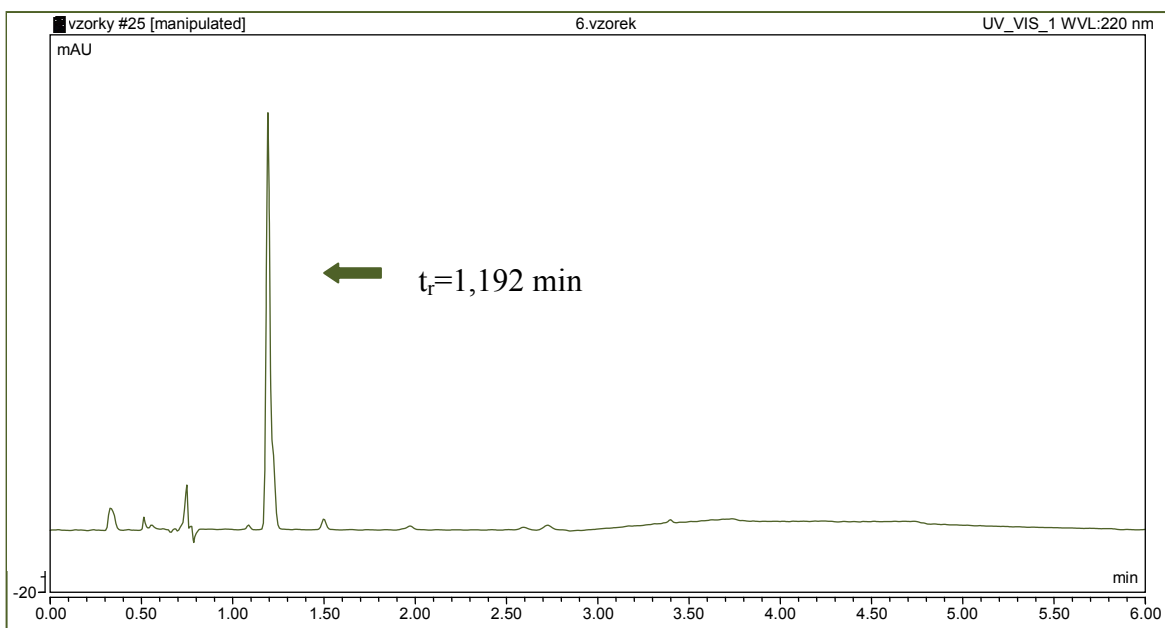
Obrázek 40 - Chromatogram zobrazující obsah peelingu na pleť

V tomto reálném vzorku byl potvrzen methylparaben, další látka s minimálním obsahem není shodná s retenčními časy, lze se domnívat, že se jedná o cizí látku, která se vyseparovala, vzhledem k podobným vlastnostem.



Obrázek 41 - Chromatogram zobrazující obsah ve spreji na tělo

Na tomto obrázku je opět vidět píky se stejnými retenčními časy jako jsou retenční časy u legálních konzervačních látek (methyl a propylparabenu).



Obrázek 42 - Chromatogram zobrazující obsah ve vlasovém šampónu

Retenční čas 1,192 min se přímo neshoduje s žádným retenčním časem, ale je velice blízko hodnotě methylparabenu, s velikou pravděpodobností lze tvrdit, že se jedná o methylparaben.

7 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo nalezení optimálních podmínek metody k separaci konzervačních látek, především parabenů a jejich následnou detekci v kosmetických přípravcích. V teoretické části jsem se zaměřila na popis vlastností a vývoj chromatografických metod, především na metodu UHPLC, která byla zvolena jako separační metoda pro tuto práci. Dále jsem se zabývala problémem používání konzervačních látek v kosmetice, zjistila jsem, které z našich látek jsou legální (methylparaben, ethylparaben) a které nelegální (isopropylparaben, isobutylparaben, fenylparaben, pentylparaben), podle Nařízení Komise EU.

Během hledání vhodných podmínek pro analýzu bylo testováno několik chromatografických kolon a různých mobilních fází. Pro analýzu byly po optimalizaci metody zvoleny následující parametry, které nejlépe odpovídaly požadavkům rychlé separace: stacionární fáze: Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm, mobilní fáze: Acetonitril, teplota: 40 °C, průtok: 2 ml/min, gradient: od 40 % do 70 % modifikátoru během 6 minut. Díky těmto podmínkám docházelo k separaci všech 9 látek.

Metoda byla validována pomocí testu specificity, testu vhodnosti, opakovatelnosti, linearity, přesnosti a správnosti.

V poslední fázi diplomové práce byla vyvinutá metoda aplikovaná na reálné vzorky a shodou s retenčními časy byly identifikovány nalezené látky. Nejčastěji se jednalo o legislativně povolené konzervanty - methylparaben, propylparaben, ale i benzylparaben, který patří mezi zakázané konzervační látky.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schéma kapalinového chromatografu [18].....	8
Obrázek 2 - Vyjádření přesnosti a správnosti [22].....	10
Obrázek 3 - Chemická struktura methylparabenu [24]	11
Obrázek 4 - Chemická struktura ethylparabenu [24].....	12
Obrázek 5 - Chemická struktura propylparabenu [24]	12
Obrázek 6 - Chemická struktura butylparabenu [24]	13
Obrázek 7 - Chemická struktura isopropylparabenu [24]	13
Obrázek 8 - Chemická struktura isobutylparabenu [24].....	14
Obrázek 9 - Chemická struktura fenylparabenu [24]	14
Obrázek 10 - Chemická struktura benzylparabenu [24].....	15
Obrázek 11 - Chemická struktura pentylparabenu [24].....	15
Obrázek 12 - Separace - stacionární fáze - Ascentis Express Phenyl-Hexyl, 2.7 µm 100 x 3 mm	25
Obrázek 13 - Separace - stacionární fáze - Ascentis Express C18, 2.7 µm 100 x 2.1 mm	26
Obrázek 14 - Separace - stacionární fáze - Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 µm 150 x 4.6 mm	26
Obrázek 15 - Separace - stacionární fáze - Kinetex Phenyl-Hexyl 100A, 2.6 µm 100 x 4.6 mm	26
Obrázek 16 - Separace - stacionární fáze - Kinetex C18 100A, 2.6 µm 100 x 2.1 mm ...	27
Obrázek 17 - Separace - stacionární fáze - Onyx™ Monolithic C18, 100 x 4.6 mm	27
Obrázek 18 - Separace - mobilní fáze: gradientová eluce acetonitril/voda.....	28
Obrázek 19 - Separace - mobilní fáze: gradientová eluce methanol/voda	29
Obrázek 20 - Separace - mobilní fáze: gradientová eluce acetonitril + methanol 2:1/voda	29
Obrázek 21 - Separace - teplota 20°C	30
Obrázek 22 - Separace - teplota 25°C	31
Obrázek 23 - Separace - teplota 30°C	31
Obrázek 24 - Separace - teplota 35°C	31
Obrázek 25 - Separace - teplota 40°C	32
Obrázek 26 - Separace - teplota 45°C	32
Obrázek 27 - Separace - teplota 50°C	32
Obrázek 28 - Separace - teplota 55°C	33

Obrázek 29 - Separace - teplota 60°C	33
Obrázek 30 - Separace - rychlost průtoku 1 ml/min.....	34
Obrázek 31 - Separace - rychlost průtoku 2 ml/min.....	34
Obrázek 32 - Separace - rychlost průtoku 2,5 ml/min.....	34
Obrázek 33 - Separace - gradientová eluce 40 % - 50 %	36
Obrázek 34 - Separace - gradientová eluce 40 % - 60 %	37
Obrázek 35 - Separace - gradientová eluce 40 % - 70 %	37
Obrázek 36 - Chromatogram s optimálními podmínkami- stacionární fáze: Kinetex Biphenyl 100A, 2.6 μm 150 x 4.6 mm, gradientová eluce: Acetonitril/voda 40 % - 70 %, teplota: 40 °C, průtok: 2 ml/min.....	38
Obrázek 37 - Chromatogram zobrazující obsah v emulzi po opalování	44
Obrázek 38 - Chromatogram zobrazující obsah hydratačního krému na ruce	45
Obrázek 39 - Chromatogram zobrazující obsah v olivovém krému na ruce	45
Obrázek 40 - Chromatogram zobrazující obsah peelingu na pleť	46
Obrázek 41 - Chromatogram zobrazující obsah ve spreji na tělo.....	46
Obrázek 42 - Chromatogram zobrazující obsah ve vlasovém šampónu	47

9 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Retenční časy jednotlivých látek, připravovaných jako samostatné vzorky k určení jejich identifikace	24
Tabulka 2 - Vyjádření časů analýz při použití jednotlivých stacionárních fází	25
Tabulka 3 - Vyjádření časů analýz při použití různých mobilních fází.....	28
Tabulka 4 - Vyjádření časů analýz při použití různých teplot.....	30
Tabulka 5 - Vyjádření časů analýz při použití různých rychlostí průtoků mobilní fáze ...	34
Tabulka 6 - Vyjádření časů analýz při použití různých gradientů modifikátoru.....	35
Tabulka 7 - Průběh gradientové eluce - 40 % - 50 %.....	35
Tabulka 8 - Průběh gradientové eluce - 40 % - 60 %.....	36
Tabulka 9 - Průběh gradientové eluce - 40 % - 70 %.....	36
Tabulka 10 - Průběh gradientové eluce v čase	38
Tabulka 11 - Tabulka analyzovaných látek s hodnotami zkoušených parametrů (As-faktor asymetrie, Rs- rozlišení, N- počet teoretických pater).....	39
Tabulka 12 - Retenční časy ukazující shodu retenčních časů ve standardech a směsi.....	40
Tabulka 13 - Přehled linearit	41
Tabulka 14 - Směrodatné odchylky retenčních časů a ploch píků	42
Tabulka 15 - Přehled hodnot pro správnost a přesnost.....	43
Tabulka 16 - Retenční časy jednotlivých látek získaných ze vzorku směsi	44

10 Použitá literatura

- [1] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 3. Ostrava: Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [2] MOTYKA, Kamil a Jan HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [3] PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. ISBN 545 844 0758.
- [4] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [5] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. Praha: Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4243.
- [6] SMOLKOVA, Eva, Ladislav FELTL a Věra PACÁKOVÁ. *Plynová chromatografie: Teoretické základy*. 1. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 1983.
- [7] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: Kapalinová vysokoučinná kolonová chromatografie*. 1. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN 541 183 (075 8).
- [8] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Český lékopis 2009: Doplněk 2014*. 7. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5193-1.
- [9] DOUŠA, M. Validace. [online]. 2016 [cit. 2017-08-16]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [10] DOUŠA, M. Přesnost metody. [online]. 2016 [cit. 2017-08-16]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>.
- [11] MACHOVCOVÁ, A. Skryté a neočekávané alergenů v kosmetických přípravcích. Dermatologická praxe [online]. 2007 [cit. 2017-08-1]. Dostupné z: www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=2564&magazine_id=11 .

- [12] *Parabeny* [online]. [cit. 2017-08-11] . Dostupné z:
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Parabeny>.
- [13] *Parabeny* [online]. [cit. 2017-08-11] Dostupné z: <http://arnika.org/parabeny>
- [14] ORTH, D. S. *Handbook of Cosmetic Microbiology*. USA: Marcel Dekker, Inc., 1993, . ISBN 0-8247-9012-X. 3.
- [15] KRS, V. *Materiály I: pro 1. a 2. ročník oboru Kosmetička*, 1. vydání, Praha: INFORMATORIUM, 2001, ISBN 80-8607-373-4.
- [16] *Paraben mix* [online]. [cit. 2017-07-17]. Dostupné z:
<http://www.epitesty.cz/pasports/Mx%2003%20C.pdf>
- [17] *Vše co potřebujete vědět o parabenech* [online]. [cit. 2017-08-02]. Dostupné z:
<http://www.medaprex.cz/cs/magazin-krasy/problemy-s-pleti/vse-co-potrebujete-vedet-o-parabenech-v-kosmetice-106.html#ixzz4pkDho1BX>
- [18] *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. Pavel Coufal, 1996 [cit. 2017-08-11]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [19] MEYER, V. R., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4. vydání. John Wiley & Sons, 2004. ISBN 0-470-09378-1.
- [20] KARLÍČEK, R., POLÁŠEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M., SOLICH, P., *Analytická chemie pro farmaceuty*, 3. vydání. Univerzita Karlova v Praze, Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1453-3
- [21] MCMASTER, Marvin C. *HPLC a practical user's guide*. 2. vydání. Hoboken, New Jersey. John Wiley & Sons, ISBN-13: 978-0-471-75401-5.
- [22] VYMAZAL, Tomáš. *Řízení kvality, zabezpečování správnosti a přesnosti výsledků zkoušek a vzorkování* [online]. In: Ústav stavebního zkušebnictví: Brno [cit. 2017-07-01].

[23] Open chemistry database

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23019#section=Computed-Properties> [online]. USA [cit. 2017-08-10].

[24] Chemspider Search and share chemistry. In: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure> [online]. USA: Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2017-08-11].

[25] Food and Drug Administration. In: <https://www.fda.gov> [online]. USA, Maryland [cit. 2017-08-11].

[26] Nařízení komise EU č. 1004/2014. In.: Úřední věstník Evropské unie, 2014.

[27] FENG-LIAN WANG, YONG-GANG ZHAO, NADEEM MUHAMMAD, SHU-CHAO WU a YAN ZHU. *Simultaneous determination of parabens and inorganic anions in cosmetics by two-dimensional ultrahighperformance liquid chromatography-ion chromatography valve-switching method* [online]. [cit. 2017-09-01] Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/317658985_Simultaneous_determination_of_parabens_and_inorganic_anions_in_cosmetics_by_two-dimensional_ultrahighperformance_liquid_chromatography-ion_chromatography_valve-switching_method

[28] NJIES PEDJIE. *Rapid UHPLC Determination of Common Preservatives in Cosmetic Products* [online]. [cit. 2017-09-02] Dostupné z: https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74319APP_UHPLCDeterminationofPreservativesinCosmetics.pdf

[29] BASIMA AROUS a MOHAMMAD AMER AL-MARDINI. *Development of A Validated HPLC Method for the Analysis of Two Preservative Agents “Methylparaben & Propylparaben” in Topical Creams Containing Steroids in the Patient’s Terms of Use* [online]. [cit. 2017-09-02]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Basima_Arous2/publication/280883531_Development_of_A_Validated_HPLC_Method_for_the_Analysis_of_Two_Preservative_Agents_Methylparaben_Propylparaben_in_Topical_Creams_Containing_Steroids_in_the_Patient%27s_Terms_of_Use_by_Basima_Arous_Moham/links/55ca607308aeca747d69e7d6/Development-of-A-Validated-HPLC-Method-for-the-Analysis-of-Two-Preservative-Agents-

Methylparaben-Propylparaben-in-Topical-Creams-Containing-Steroids-in-the-Patients-Terms-of-Use-by-Basima-Arous-Moh.pdf?origin=publication_detail

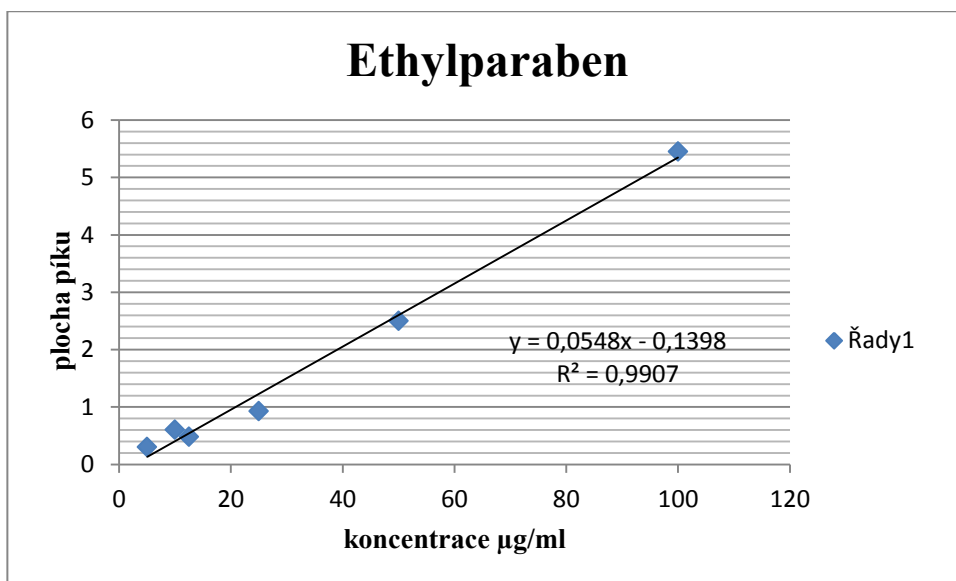
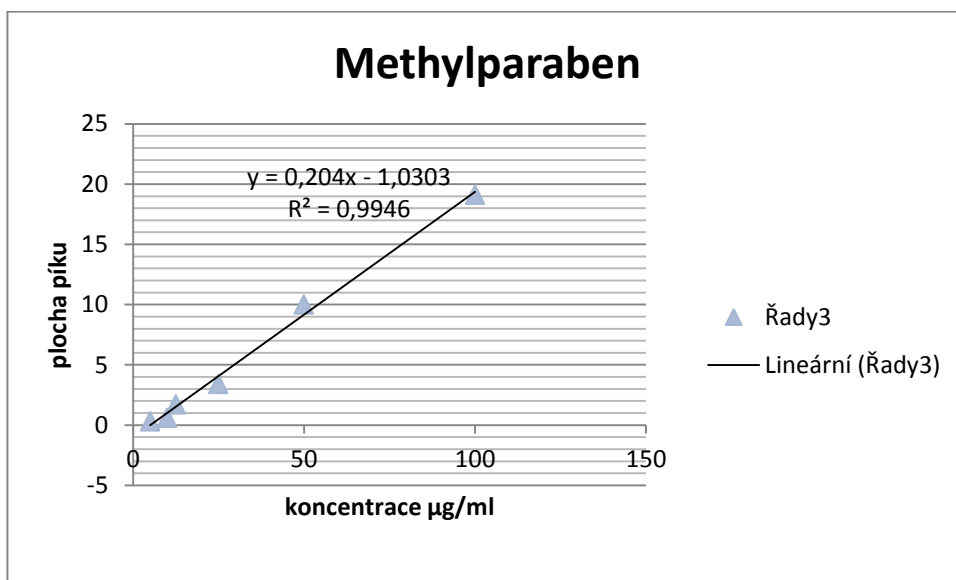
[30] FANG HOU, XIAOYING DENG, XINYU JIANG a YANGUNG YU. *Determination of Parabens in Beverage Samples by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Droplet*[online]. [cit. 2017-09-02]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article/52/10/1332/311455/Determination-of-Parabens-in-Beverage-Samples-by>

[31] PARASKEVAS D. TZANAVARAS¹, THEANO D. KARAKOSTA¹, PANTELIS G. RIGAS, DEMETRIUS G. THEMELIS a ANASTASIA ZOTOU. *Isocratic liquid chromatographic determination of three paraben preservatives in hygiene wipes using a reversed phase core-shell narrow-bore column* [online]. [cit. 2017-09-02]. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/chem.2012.10.issue-5/s11532-012-0091-5/s11532-012-0091-5.pdf>

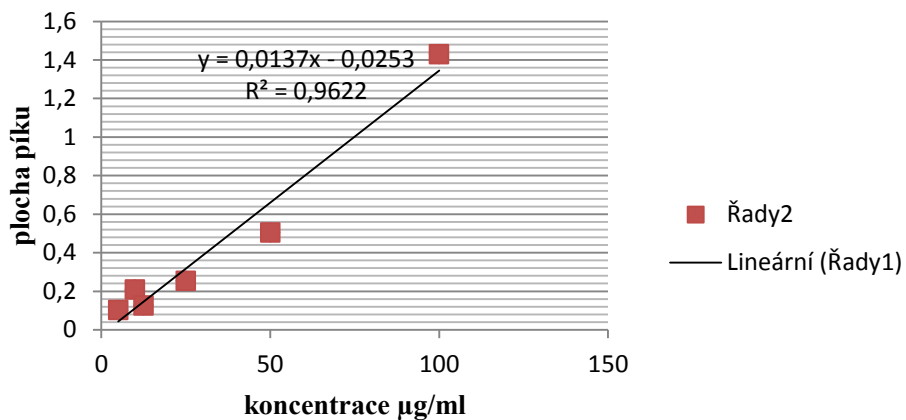
[32] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

11 Příloha

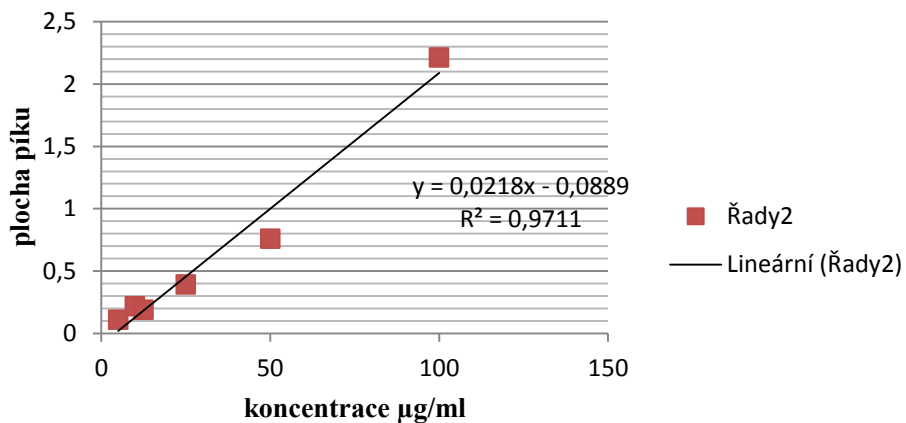
Grafy kalibračních křivek:



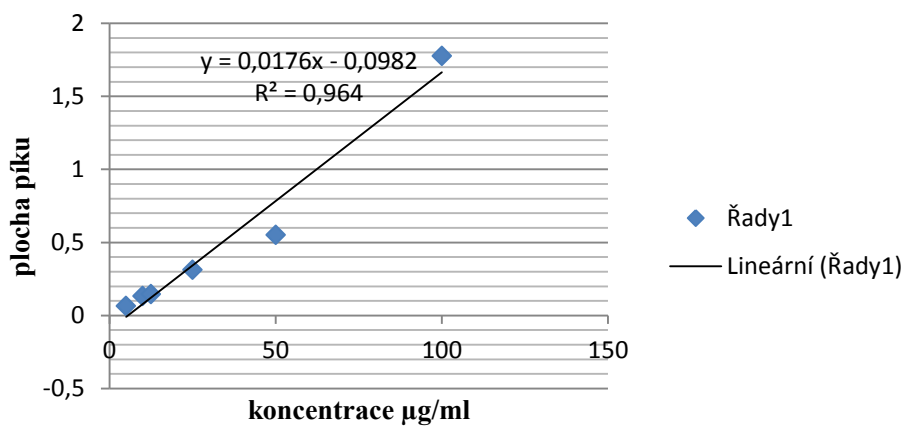
Isopropylparaben



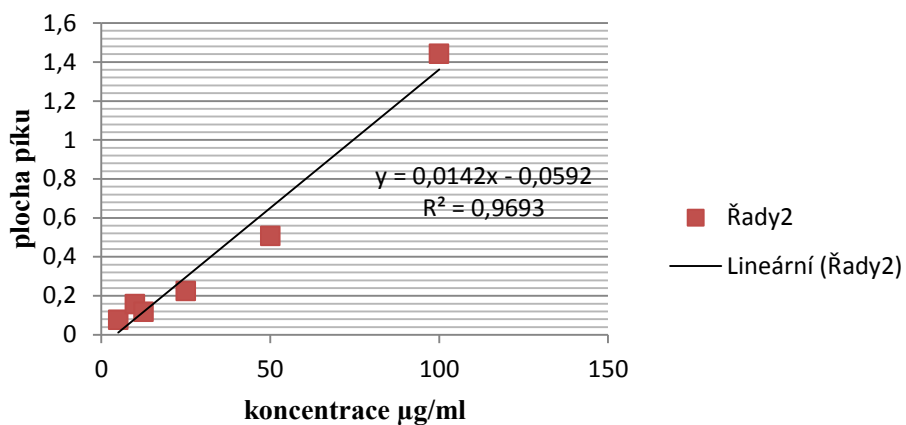
Propylparaben



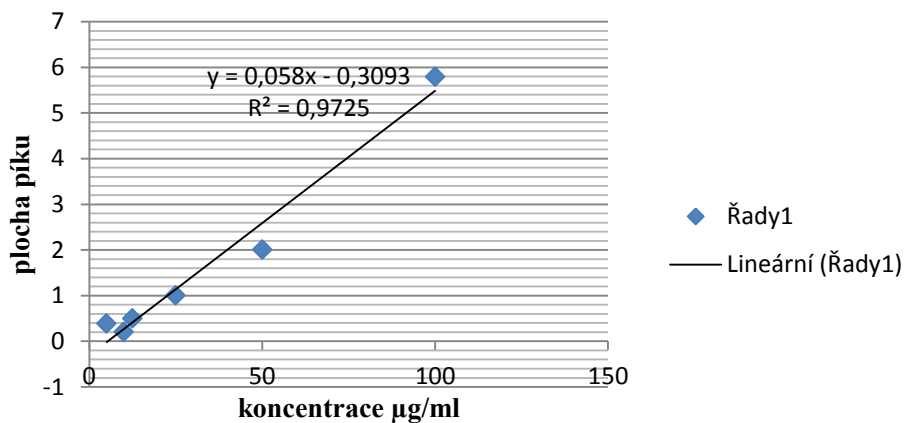
Isobutylparaben



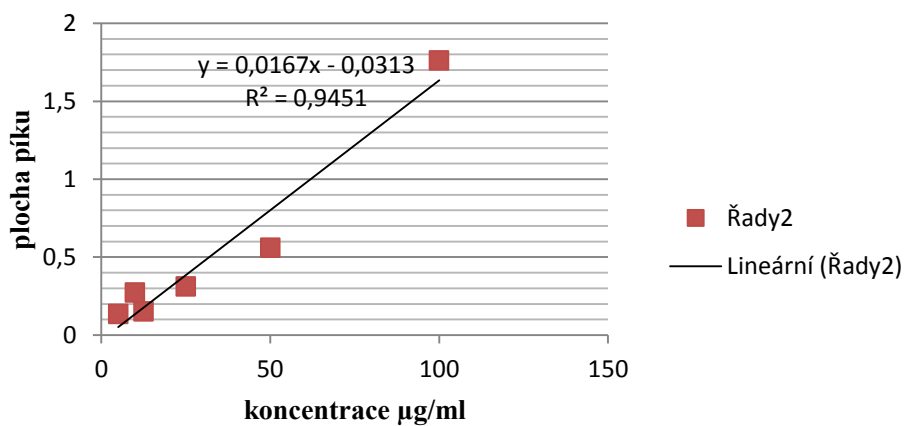
Butylparaben



Fenylparaben



Benzylyparaben



N-pentylparaben

