VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA VYBRANÝCH ALERGENŮ VE VONNÝCH KOMPOZICÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. ADÉLA KOLÁČKOVÁ
AUTHOR

BRNO 2010

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA VYBRANÝCH ALERGENŮ VE VONNÝCH KOMPOZICÍCH

ANALYSIS OF SELECTED ALLERGENS IN FRAGRANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Bc. ADÉLA KOLÁČKOVÁ
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. JANA ZEMANOVÁ, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2010

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	**FCH-DIP0375/2009**	Akademický rok:	**2009/2010**
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Student(ka):	**Bc. Adéla Koláčková**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)		
Vedoucí práce	**Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**		
Konzultanti:	Ing. Radka Mokáňová		

Název diplomové práce:

Analýza vybraných alergenů ve vonných kompozicích

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na alergenní vonné látky v kosmetických přípravcích, metody jejich kontroly a sledování.
2. Pro vybrané zástupce vypracovat metodiku stanovení a ověřit ji na spektru reálných vzorků.
3. Naměřená data zpracovat a odiskutovat.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Adéla Koláčková Student(ka)	Ing. Jana Zemanová, Ph.D. Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc. Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na alergenní vonné látky v kosmetických přípravcích. Pro vybrané zástupce jsou popsána jejich specifika, metody kontroly a sledování. Dále jsou také uvedeny dermatologické problémy související s používáním parfémovaných kosmetických výrobků, v nichž se zmíněné alergenní ingredience nachází, a možnosti jejich regulování.

Vonné látky jsou směsi přírodního nebo syntetického charakteru, které dodávají vůni. V přírodě je produkují zejména rostliny. Již více než 100 vonných látek bylo identifikováno jako alergenní. 26 vonných látek je deklarováno jako potenciálně alergenní substance. Alergenní složky parfémových kompozic způsobují v největší míře alergickou kontaktní dermatitidu.

Experimentální část práce je zaměřena na metodiku stanovení vybraných zástupců alergenních vonných látek (α-Amylcinnamaldehyd, Anýzalkohol, Benzylsalicylát, Cinnamaldehyd, α-Hexylcinnamaldehyd, 7-Hydroxycitronellal a Methyl-2-oktynoát). Pro extrakci, analýzu a identifikaci těchto substancí byla využita headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem (HS-SPME-GC-FID). Metoda byla validována a aplikována na spektrum reálných vzorků kosmetických přípravků.

ABSTRACT

This thesis is focused on potentially allergenic substances (PASs) in cosmetics. Their specific features, methods of control and observation are described. There are also mentioned dermatology problems connected with usage of perfumed cosmetic products in which the allergenic ingredients can be found and possibilities of their regulation.

Fragrances are mixtures of natural or synthetic character which give the aroma. In nature, fragrances are produced mainly by plants. More than one hundred fragrances have been identified as allergens. Twenty six of them were declared as PASs. Allergenic components of perfume compositions are the main cause of allergic contact dermatitis.

Experimental part of the thesis is focused on the procedure of analysis of specific allergenic fragrances (α-Amylcinnamaldehyde, Anisealcohol, Benzylsalicylate, Cinnamaldehyde, α-Hexylcinnamaldehyde, 7-Hydroxycitronellal and Methyl-2-octynoate). Headspace-Solid Phase Microextraction connected with Gas Chromatography-Flame Ionisation Detector (HS-SPME-GC-FID) was used for extraction, analysis and identification of these substances. The method was validated and applied on the spectrum of real samples of cosmetic products.

KLÍČOVÁ SLOVA

vonné látky, alergeny, kosmetika, validace, SPME-GC-FID

KEYWORDS

fragrances, allergens, cosmetics, validation, SPME-GC-FID

KOLÁČKOVÁ, A. *Analýza vybraných alergenů ve vonných kompozicích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 104 s. a 15 s. příloh. Vedoucí diplomové práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

…….
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě chci poděkovat paní Ing. Janě Zemanové, Ph.D., paní Ing. Evě Vítové, Ph.D. a slečně Ing. Radce Mokáňové za jejich vstřícný a přátelský přístup a podnětné připomínky při zpracování mojí diplomové práce.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 TEORETICKÁ ČÁST 9
2.1 Vonné látky 9
2.1.1 Přírodní vonné látky 9
2.1.2 Syntetické vonné látky 12
2.1.3 Chemický charakter vonných látek 13
2.1.4 Využití vonných látek v kosmetice 14
2.2 Alergenní složky parfémových (vonných) kompozic 15
2.2.1 Dermatologické problémy související s používáním parfémů a parfémovaných výrobků 16
2.2.1.1 Alergická kontaktní dermatitida 17
2.2.1.2 Iritační kontaktní dermatitida 19
2.2.1.3 Alergická a iritační kontaktní dermatitida: Jak se liší? 20
2.2.2 Diagnostikování kontaktní alergie na vonné látky 20
2.2.2.1 Epikutánní testy 21
2.2.2.2 Hodnocení reakcí v epikutánním testu 23
2.3 Regulace kosmetického průmyslu 25
2.3.1 Regulace vonných látek v kosmetických výrobcích 25
2.3.1.1 Regulace v rámci Evropské unie 25
2.3.1.2 Regulace ve Spojených státech amerických 27
2.3.1.3 Regulace v Kanadě 27
2.3.1.4 Regulace v Japonsku 28
2.3.1.5 Regulace v Austrálii 28
2.3.2 Nařízení o jiných složkách v kosmetických výrobcích 29
2.3.3 Organizace RIFM a IFRA 29
2.3.3.1 RIFM 29
2.3.3.2 IFRA 30
2.3.4 Legislativa týkající se alergenů 30
2.3.4.1 Vyhláška č. 26/2001 Sb. 31
2.3.4.2 Vyhláška č. 268/2001 Sb. 32
2.3.4.3 Vyhláška č. 444/2004 Sb. 32
2.3.4.4 Vyhláška č. 126/2005 Sb. 32
2.3.4.5 Vyhláška č. 104/2006 Sb. 33
2.4 Stanovení přírodních esenciálních olejů a vonných ingrediencí v kosmetických produktech 33
2.4.1 Analýzy přírodních esenciálních olejů a vonných materiálů 33
2.4.1.1 Metody pro stanovení esenciálních olejů a potenciálně alergenních vonných látek 35
2.4.2 Stanovení jiných vonných chemikálií v kosmetických produktech 38
2.4.3 Stanovení příbuzných látek v kosmetických produktech 39
2.5 Plynová chromatografie 39
2.5.1 Instrumentace plynové chromatografie 40
2.6 Mikroextrakce tuhou fází (SPME) 42
2.7 Validace analytické metody 46
2.7.1 Vybrané metrologické charakteristiky (validované parametry) analytické metod ... 46
2.7.2 Vybrané statistické parametry pro vyhodnocení naměřených dat 47

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 49
3.1 Laboratorní vybavení 49
3.1.1 Chemikálie 49
3.1.2 Plyny 49
3.1.3 Přístroje a pracovní pomůcky 50
3.2 Podmínky GC-FID 51
3.3 Optimalizované extrakční podmínky SPME metody 51
3.4 Přehled vlastností standardů vybraných alergenních vonných látek 51
3.5 Reálné vzorky kosmetických přípravků 59
3.6 Pracovní postupy 60
3.6.1 Příprava vzorků standardů alergenních vonných látek 60
3.6.2 Sorpce a desorpce analytů 60
3.6.3 Identifikace standardů alergenních vonných látek 61
3.6.4 Stanovení opakovatelnosti 61
3.6.5 Stanovení linearity 61
3.6.6 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti 62
3.6.7 Příprava reálných vzorků kosmetických přípravků 62
4 VÝSLEDKY A DISKUSE 63
4.1 Identifikace standardů alergenních vonných látek 63
4.2 Stanovení opakovatelnosti 66
4.3 Stanovení linearity 67
4.4 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti 72
4.5 Analýza reálných vzorků kosmetických přípravků 77
5 ZÁVĚR 83
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ 85
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 98
8 PŘÍLOHY 104

1 ÚVOD

V moderní lidské společnosti má průmysl vonných látek své nezastupitelné místo. Od poloviny 19. století se parfumérský svět od základů změnil. Výroba vonných látek se z řemesla rozvinula v průmyslové odvětví zasahující do všech oblastí lidského života. Moderní parfumérství je kombinací umění a vědy. Díky analytické a syntetické chemii je možné identifikovat a vytvářet vonné materiály přítomné v přírodě. Chemici jsou schopni poskytnout přírodně identické materiály ve vysoké a stálé kvalitě za podstatně nižší cenu. Navíc byly vytvořeny dříve neznámé syntetické molekuly s novými charakteristikami a objevily se tak další možnosti při vytváření vůní.

Vonné látky jako směsi přírodního nebo syntetického charakteru, které poskytují vůni celé řadě výrobků nebo zakrývají jejich zápach. Přirozeně jsou produkovány zejména rostlinami a stěžejními metodami jejich získávání jsou extrakce nepolárními rozpouštědly, destilace vodní parou a lisování. Většina používaných vůní je však tvořena syntetickými sloučeninami.

Vůně je organoleptická vlastnost některých látek, kterou vnímáme především čichovými smyslovými buňkami. Působí na naše smysly, ovlivňuje naše emocionální vnímání, vyvolává jak pocity příjemné, tak i nepříjemné. Vůně mají schopnost ovlivnit naši náladu. Mají vliv jak na psychologické, tak na fyziologické zdraví. Vůně jsou každodenní součástí naší existence, neboť vonné látky lze dnes nalézt nejen v parfémech či kolínských a toaletních vodách, ale i v jiných kosmetických přípravcích, v pracích i čisticích prostředcích a v řadě dalších výrobků.

Široce diskutovaným problémem jsou negativní účinky, které používání parfémovaných produktů může vyvolat. Vonné chemikálie mohou způsobit podráždění nebo alergické reakce u citlivých jedinců. Vonné látky způsobují více nežádoucích reakcí než jiné kosmetické ingredience. Typické reakce zahrnují především dýchací potíže a kontaktní dermatitidy. Alergenní složky parfémových kompozic způsobují v největší míře alergickou kontaktní dermatitidu. K potvrzení kontaktní alergie na určitý produkt nebo sloučeninu bývají využívány zejména tzv. epikutánní testy (náplasťové testy; *patch tests*). Jelikož se však vonné látky skládají z mnoha různých chemikálií, identifikace původce přecitlivělosti bývá obtížná.

Nejlepší prevencí vzniku nežádoucích projevů na působení vonných látek u citlivých jedinců je vyvarování se styku s těmito substancemi, což je téměř nemožné, neboť výrobci často na etiketách výrobků neuvádí specifické typy a kombinace chemikálií kvůli ochraně svého obchodního tajemství. V opozici s širokým rozšířením a použitím těchto látek je právě nedostatek informací o vonných materiálech obsažených v různých výrobcích.

Parfumérský průmysl je samoregulován. Především díky spolupráci mezi Výzkumným ústavem aromatických látek (RIFM; New Jersey, USA) a Mezinárodní asociací pro výzkum aromatických látek (IFRA; Švýcarsko).

Existuje seznam 26 vonných látek deklarovaných Přílohou III Evropské kosmetické direktivy jako potenciálně alergenní substance (PASs). Až 90 % přírodních surovin obsahuje vždy nejméně 1 z 26 sledovaných alergenů.

Nejčastější metodou aplikovanou na vonné látky v kosmetice je plynová chromatografie (GC), která je také nejčastěji využívanou technikou pro analýzu potenciálně alergenních vonných substancí. Ve skutečnosti však neexistují oficiální analytické metody na stanovování vonných ingrediencí v kosmetických výrobcích, kromě metody navržené IFRA k určování 24 PASs, jíž je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Ta slouží ke kvantifikaci potenciálně alergenních vonných látek ve vonných sloučeninách.

Cílem této diplomové práce bylo vypracování literární rešerše se zaměřením na alergenní vonné látky v kosmetických přípravcích, metody jejich kontroly a sledování. Experimentální část práce se zabývá metodikou stanovení vybraných zástupců alergenních vonných látek, a to headspace mikroextrakcí tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem (HS-SPME-GC-FID). Daná metoda byla validována a aplikována na spektrum reálných vzorků kosmetických přípravků.

Ernest Meaux, 1952:

> *„Budeme se muset spolehnout na chemiky, že naleznou nové chemikálie, z nichž vytvoříme nové originální akordy. Budoucnost parfumérství je v rukou chemie.“* [1]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vonné látky

Vonné látky jsou poměrně silně vonící organické sloučeniny s charakteristickými, obvykle příjemnými vůněmi. Jsou využívány v parfémech a parfémovaných produktech [2].

Jedná se o směsi přírodního nebo syntetického charakteru, které dodávají vůni výrobkům nebo zakrývají jejich zápach. Vůně je organoleptická vlastnost některých látek, vnímána je čichovými smyslovými buňkami – receptory. Aromatické látky se používají především pro své organoleptické vlastnosti, tedy schopnosti působit na smyslové orgány, zejména na čich a chuť [3].

Čich je stejně jako chuť chemickým smyslem, kterým neustále monitorujeme své okolí. Člověk je schopen rozeznat mnohem více odlišných vůní, než dokáže rozlišit zvuků. A to v koncentracích, které jsou běžnými fyzikálními a chemickými metodami nezjistitelné [4].

Většina vonných látek svou vůní vyvolává pocity smíšené a často spojené s drážděním dalších čidel, např. chuťových. Tzv. čichové pocity poskytuje přibližně jen 50 látek, jež je možné rozdělit na vůně či pachy [4]:

- kořenné,
- květinové,
- ovocné,
- pryskyřičné,
- hnilobné,
- spáleninové.

Vonné látky se skládají ze stovek vonných chemikálií. Každá z těchto složek má svoji charakteristickou vůni. Vonné látky mohou být děleny dle zdrojů, z nichž jsou získávány, respektive dle způsobu výroby na [5]:

- přírodní vonné látky – vychází z přírodních produktů, z rostlin i zvířat,
- syntetické vonné látky – jsou tvořeny syntetickými složkami.

Z chemického hlediska jsou vonné látky děleny na [6]:

- izoláty – získávají se ze silic fyzikálně-chemickými separačními metodami,
- polosyntetické produkty – vznikají chemickými syntézami izolátů,
- syntetické produkty – připravují se synteticky z ropy nebo uhlí.

Základní, surové materiály pochází z řady přírodních a syntetických zdrojů. Dříve byly nejčastějšími využívanými materiály přírodní deriváty z rostlinných nebo živočišních zdrojů. Nyní jsou hojně produkovány syntetické ingredience, díky komplexním organickým reakcím, které nahradily mnoho přírodních látek [7].

2.1.1 Přírodní vonné látky

Přírodní vonné látky jsou získávány z odlišných částí rostli, jako jsou květy, ovoce, kořeny, listy, dřevo, kůra stromů, pryskyřice, semena anebo z celých rostlin; také jsou získávány ze zvířecích žláz a orgánů. Aromatické látky však v přírodě produkují zejména rostliny [3; 5].

Vůni květů a ostatních částí rostlinných organismů tvoří silice, tedy směsi fyziologicky účinných a příjemně vonících přírodních těkavých látek rostlinného původu. Příbuzné silicím jsou také tekuté balzámy a tuhé pryskyřice, které jsou většinou patologickými rostlinnými produkty, avšak s využitím v řadě průmyslových odvětví, včetně kosmetiky [3; 8].

Nejznámější vonné látky živočišného původu využívané v parfumérii jsou [3]:

- ambra – vorvaň,
- mošus (pižmo) – kabar pižmový,
- cibet – cibetka,
- kastoreum – bobr evropský.

I když přírodní vonné látky tradičně pochází z rostlinných a živočišných zdrojů, dnes jsou primárními zdroji rostliny. Je možné izolovat tisíce vonných látek ze všech částí rostlin, včetně listů, kůry, ovoce, kořenů, plodů, semen, květů a dřeva. Rostlinné materiály využívané pro získání vonných látek tedy jsou [2; 3; 7]:

- *esenciální oleje* – sestávají z těkavých lipolytických substancí a nacházejí se ve specifických rostlinách; obsahují zejména uhlovodíky, terpeny a sesquiterpeny, ale mohou obsahovat i aromatické a heterocyklické sloučeniny; získávají se různými typy destilací výchozích rostlinných produktů a také metodou vytlačení,
- *extrakty* – dle metody jejich přípravy jsou děleny na pomády, konkréty, absoluty, resinoidy nebo tinktury:
    - pomády – skládají se z tuků, které obsahují vonné látky a jsou získávány enfleuráží rostlin za horka nebo za studena,
    - konkréty a absoluty – absolutní silice (absolut) je vyráběna extrakcí rostlinného materiálu nízkovroucími organickými rozpouštědly (zejména petroletherem); produkt získaný extrakcí a následným oddestilováním rozpouštědla je zpravidla voskovitá, polotuhá hmota a nazývá se konkrétní silice (konkrét),
    - resinoidy – rostliny produkují kromě esenciálních olejů pryskyřice, jež mohou být extrahovány k tvorbě resinoidů; tyto materiály se díky své nízké těkavosti využívají jako ustalovače (fixátory) vonných látek – omezují těkavost jiných ingrediencí obsažených v parfému, stabilizují parfémové kompozice; důležité druhy pryskyřic obsahují gumy (pryskyřičné materiály získané vařením kůry, větví nebo listů stromů a křovin ve vodě) a balzámy (jsou podobné gumám mimo těch, které obsahují skořicové a benzoové kyseliny a jejich deriváty),
    - tinktury – alkoholické roztoky, které jsou připravené zpracováním přírodních materiálů s ethanolem nebo ethanol-vodnou směsí, také mohou být získány rozpouštěním jiných extraktů v těchto rozpouštědlech.

Esenciální oleje jsou tedy přírodní vonné látky komplexního složení charakteristické pro aromatické rostliny. Mohou obsahovat od desítek až po stovky různých komponent, zejména pak uhlovodíky (terpeny a sesquiterpeny) a kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny, fenoly, oxidy, laktony, acetály, ethery a estery). Jak uhlovodíky, tak kyslíkaté sloučeniny jsou zodpovědné za charakteristické vůně. Zastoupení jednotlivých sloučenin v oleji se liší od stopových množství až po více než 90 %. Vonný olej je tak výsledkem kombinací vůní všech jeho komponent. Složky ve stopových množstvích jsou důležité, protože dodávají oleji charakteristickou a přírodní vůni [9].

Důležitou součástí esenciálních olejů jsou sesquiterpeny. Jsou to 15C terpenoidy, které se v přírodě objevují jako uhlovodíky nebo jako alkoholy, ketony, aldehydy, kyseliny či laktony. Těkavé terpenoidy jsou tvořeny dvěma skupinami biosynteticky příbuzných látek: monoterpenoidy a sesquiterpenoidy [10; 11].

Aromatické esenciální oleje nepřináší jen příjemné vůně, ale také mohou zmírnit neklid, stres a napravovat určité typy onemocnění. Některé z nich ovlivňují centrální nervový systém působením na humorální a kognitivní funkce, některé mají protikřečový efekt, jiné jsou známé díky svým antimikrobiálním vlastnostem. Avšak přírodní aromatické esenciální oleje obsahují také řadu alergií vyvolávajících látek [12].

Esenciální oleje jsou využívány kvůli jejich baktericidním, fungicidním, antiparazitálním, insekticidním, léčivým a kosmetickým vlastnostem, v současnosti zejména ve farmaceutickém, zdravotnickém, kosmetickém, zemědělském a potravinářském průmyslu. Kvůli způsobu extrakce, především díky destilaci aromatických rostlin, obsahují škálu těkavých molekul, jako jsou terpeny a terpenoidy, deriváty fenolu a alifatické sloučeniny. Většina z nich byla také charakterizována jako antioxidanty [13].

Výběr metody získání přírodních vonných látek závisí na samotném produktu a na chemikáliích, které jsou zodpovědné za vůni. Většina izolačních technik využívá některou formu extrakce nebo destilace, popřípadě kombinaci obou. Tyto metody jsou založeny na rozdílné rozpustnosti látek v různých rozpouštědlech (extrakce a chromatografie) a na rozdílech v tlacích par (destilace) [5; 14].

Hlavní způsoby získávání přírodních aromatických látek jsou [3; 5; 6; 9; 14]:

- *extrakce* – uhlovodíková rozpouštědla (např. hexan, petrolether, methanol, ethanol) jsou přidávána k rostlinným nebo živočišným látkám za účelem extrakce citlivých vonných substancí; nejčastěji používanými rozpouštědly jsou organické sloučeniny, které mají nízký bod varu (pentan, hexan, methanol, ethanol, dichlormethan, chloroform, ethylacetát, ethylether a aceton); pro extrakci termolabilních přírodních produktů mohou být také využity superkritické plyny, jako amoniak, oxid uhličitý, oxid dusný, ethylen a některé fluorouhlíky; využívána je k extrakci také Soxhletova aparatura; výhodou přímé extrakce je, že těkavé látky s nízkou i vysokou rozpustností ve vodě jsou izolovány v jedné operaci; jedním z problému přímé extrakce ovšem je, že netěkavé látky, jako vosky a tuky, jsou extrahovány také; extrakce komponent esenciálního oleje za využití rozpouštědla při vysokém tlaku nebo superkritické tekutiny reprezentuje alternativu ke konvenčním procesům, jakou jsou extrakce organickým rozpouštědlem a destilace parou,
- *destilace* – tradičně bývá na esenciální oleje aplikována destilace vodní parou, která je velmi důležitou metodou pro izolaci a zakoncentrování těkavých látek z matrice, zpracováváno je s ní téměř 80 % rostlinného materiálu; destilace je dělena do dvou kategorií: frakční destilace a destilace vodní parou; v obou případech musí být vhodný startovací materiál a požadované aromatické sloučeniny musí být stabilní při podmínkách destilace; destilací vodní parou jsou získávány silice z plodů, z celé natě nebo jen z listů aj.; silice jsou také destilovány z ostatních rostlinných orgánů – kořeny, dřevo, oddenky i květy; jednou velkou nevýhodou této metody však je, že esenciální oleje podléhají chemické modifikaci a teplotně senzitivní sloučeniny se snadno zničí, navíc kvalita destilátu je extrémně zhoršena,

- *kombinace destilace a extrakce* – organické sloučeniny izolované destilací musí být separovány z vody, často pomocí extrakce rozpouštědlem nebo využitím kombinace destilace vodní parou s kontinuální extrakční aparaturou,
- *lisování* – tato metoda je používána zejména pro získání esenciálních olejů z čerstvé ovocné kůry, jež je za studena stlačována; je vhodné pro tepelně nestabilní složky.

2.1.2 Syntetické vonné látky

Zatímco v dřívějších dobách byly zdrojem vonných látek výhradně přírodní materiály, dnes je rozvoj této oblasti nemyslitelný bez látek vyrobených synteticky. Při aplikacích jde vždy o pestré směsi často několika desítek látek a to ryze přírodního, ryze syntetického nebo kombinovaného původu. Velmi často je požadavek přírodního původu, který je běžný především u chuťových komplexů, pouze komerční záležitostí, neboť kvalita resp. čistota syntetických složek je mnohdy vyšší než složek přírodních. Jisté ovšem je, že bez syntetických látek se moderní průmysl vonných látek neobejde. V našich zeměpisných šířkách je tento fakt podtržen ještě tím, že klimatické podmínky nejsou příliš vhodné pro zajišťování kvalitních přírodních surovinových zdrojů v potřebném množství [15].

Syntetické vonné látky jsou vyráběny z chemikálií získaných v rámci syntetických procesů. Snahou je napodobit přírodní vonné složky. Výhodou využívání syntetických složek je, že snižují ceny parfémů srovnatelných s těmi přírodními; mohou být také bez problémů kdykoliv získány; lze syntetizovat nové chemikálie, a tudíž i vyvíjet nové vůně, jež není možné nalézt v přírodě [5].

Nevýhodou však je, že není možné zcela napodobit přírodní parfém, který je složen ze stovek až tisíců vonných látek; jednotlivé komponenty se mohou navzájem ovlivňovat, a tak výsledný syntetický parfém může mít odlišnou vůni; navíc se mnohé vonné chemikálie mohou nacházet ve více izomerních formách [5].

V současnosti je vyráběno a používáno již několik tisíc syntetických aromatických látek. Rozvoj jejich výroby navazuje na analytickou chemii, zabývající se izolací a studiem vonných principů přírodních aromatických surovin [3].

Výroba některých klasických vonných látek je poměrně jednoduchá, avšak většina z nich je produktem složitých, vícestupňových chemických syntéz. Široká škála syntetických vonných látek poskytuje značné možnosti v jejich kombinování. Díky syntéze je dnes možné vyrábět rekonstituované nebo syntetické silice v potřebném množství, jež by z přírodního rostlinného či živočišného materiálu nebylo možné vyprodukovat [3].

Syntetické aromatické sloučeniny jsou odvozeny od chemických reakcí, jež jako výchozí produkt využívají zejména ropný nebo terpentýnový olej. U těchto látek jsou menší problémy s jejich zásobami, mají také vyšší kvalitu a povětšinou vyžaduje jejich zpracování nižší náklady než u přírodních materiálů. Jedná se ovšem nejčastěji o jednoduché molekuly, jež mohou perfektně odpovídat přírodním vícesložkovým ekvivalentům [7].

Hlavními surovinami pro výrobu syntetických aromatických látek jsou především produkty ropného průmyslu a suroviny získávané při chemickém zpracování uhlí. Důležité místo však stále mají některé přírodní materiály, které jsou vyráběny ve velkých množstvích, jako je např. již zmíněný terpentýn nebo některé tuky [3].

Mnoho vonných látek, spotřebovávaných ve velkých množstvích, je vyráběno z toluenu, fenolů a styrenu, případně jejich derivátů. Monoterpenické látky se syntetizují z isoprenu a pinenů. Četné vonné látky lze vyrobit také z ricinového oleje a mastných kyselin, získávaných z rostlinných i živočišných tuků [3].

Základní suroviny pro výrobu syntetických vonných látek tedy jsou [3]:

- toluen,
- styren,
- fenoly,
- isopren,
- terpentýn,
- ricinový olej.

2.1.3 Chemický charakter vonných látek

Chemikálie způsobující aromatický charakter vonných látek jsou děleny na dva základní typy [16]:

- izolované chemikálie získané extrakcí, purifikací a krystalizací obsahů přírodních parfémů a chemickou výrobou,
- chemikálie vyráběné organickým chemickým procesem.

Dále je možné chemikálie způsobující aromatický charakter vonných látek zařadit do následujících kategorií [2; 7]:

- *acyklické terpeny* – acyklické terpeny (C10) a sesquiterpeny (C15); uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, kyseliny a estery, dusík a síru obsahující deriváty acyklických terpenoidů (např. nitrily); základem molekulové struktury terpenoidu je pětiuhlíkatá jednotka – isopren – různý počet těchto molekulových jednotek produkuje různě vonící terpenoidové sloučeniny; patří sem např. trans- nebo cis-citral, linalool, mentol, citronellol, citronellal aj.,
- *cyklické terpeny* – uhlovodíky (monocyklické terpenové uhlovodíky – např. limonen; bicyklické terpenové uhlovodíky – např. pineny; polycyklické terpenové uhlovodíky), alkoholy (cyklické terpenové alkoholy – např. menthol; cyklické sesquiterpenové alkoholy – např. cedrol) a ethery, aldehydy a ketony, estery (zejména acetáty), sloučeniny s obsahem dusíku nebo síry,
- *alifatické sloučeniny* – jedná se o organické chemikálie s lineárním řetězcem, jež tvoří hlavní část moderních vůní; alifatické látky dělíme dle molekulové struktury na uhlovodíky, aldehydy, alkoholy, acetály, kyseliny, estery, ketony a laktony, thioly, dialkyl sulfidy a bisulfidy (např. methyl 2-oktynoát),
- *aromatické sloučeniny* – sloučeniny obsahující benzenové jádro; uhlovodíky, alkoholy (např. benzylalkohol, skořicový alkohol) a ethery, aldehydy (např. cinnamaldehyd, α-amylcinnamaldehyd, α-hexylcinnamaldehyd, benzaldehyd), ketony, estery (např. benzylacetát, fenylethyl acetát, benzoáty, fenylacetáty) a kyseliny, aromatické sloučeniny obsahující dusík (např. nitro mošusy),
- *fenoly a fenolové deriváty* – alkoholy, estery, ethery, aldehydy, ketony, karboxyláty; např. eugenol, isoeugenol, anýzalkohol, vanillin, salicyláty aj.,
- *O- a O,S-heterocykly* – cyklické ethery (např. linalool oxid), laktony (např. kumarin) a řada dalších.

Syntetické vonné látky lze nalézt téměř ve všech hlavních skupinách organických sloučenin, ať jsou to uhlovodíky, halogenderiváty, alkoholy a fenoly, thioly, ethery, sulfidy, dusíkaté deriváty, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty – především estery a laktony, heterocyklické sloučeniny a další [15].

Většina z nich obsahuje pětiuhlíkatou isoprenovou jednotku, tzv. terpeny: monoterpenové uhlovodíky (limonen), sesquiterpenové uhlovodíky (α-farnesen), alkoholy (cis-3-hexenol), monoterpenové alkoholy (linalool), sesquiterpenové alkoholy (farnesol), fenoly (eugenol), aldehydy (2, 6-nonadienal), terpenové aldehydy (citral), ketony (cyklohexanon), terpenové ketony (β-ionon), laktony (γ-undekalakton), estery (methylsalicylát), terpenové estery (linalyl acetát), oxidy (eukalyptol) a další [5; 13].

Následující typy sloučenin jsou nejčastěji využívány jako vonné chemikálie [16]:

- alkoholy (geraniol, citronellol, terpineol, mentol, santalol aj.),
- aldehydy (lyral, lilia aj.),
- ketony (methyljonon, mošus mosken aj.),
- estery (benzyl acetát, methyl jasmonát aj.),
- laktony (jasmín lakton, cyklopentadekanolid aj.),
- oxidy (galaxolid, ambroxan aj.).

2.1.4 Využití vonných látek v kosmetice

Vonné látky hrají v kosmetice důležitou roli. Spotřebitelé je dostávají ve formě parfémů, kolínských a toaletních vod, v různých kosmetických výrobcích, v mýdlech, v pracích a čisticích prostředcích a v dalších, donedávna vůbec neparfémovaných technických výrobcích. Dodávají vůni kosmetickým přípravkům pro krásu a zdraví. U převážné většiny kosmetických, pracích a čisticích produktů se parfém významným způsobem podílí na dotvoření celkového příznivého vjemu výrobku. Vůně má i další důležitou funkci, a to maskovací efekt. Mnoho kosmetických přípravků musí být parfémováno za účelem maskování nežádoucí vůně jiných složek a s tím úzce související záruky jejich příjemnosti. Určitý zápach může být maskován za předpokladu, že překrývající vůně je dostatečně vydatná. Trikem maskování je udělat původní zápach báze součástí konečné vůně výrobku. Vůně jsou nezastupitelnou součástí kosmetických přípravků také díky jejich případnému psychologickému efektu [5; 7; 15; 16].

Z jednotlivých vonných látek jsou sestavovány vonné (parfémové) kompozice. Parfémové kompozice jsou vyráběny z kvalitních přírodních materiálů (silic, destilátů, extraktů) a dále z tzv. přírodně identických látek, tj. látek běžně se vyskytujících v přírodě, vyráběných ale z ekonomických důvodů synteticky. Vedle toho se pak používají i látky, které se v přírodě nevyskytují a jsou vyrobeny zcela synteticky [15; 17].

Jednotlivé vonné akordy parfému hrají svou roli v odlišných periodách použití. Je také důležité, aby látka působila na smyslové orgány v optimální koncentraci. Existují látky, které jsou příjemné jen ve velmi nízké koncentraci a dokonce odporné v koncentraci vyšší. Existují též látky, jejichž vůňový charakter se s koncentrací významně mění [15].

Kosmetické výrobky mohou být z hlediska funkce vůně rozděleny do dvou kategorií. První skupinu tvoří přípravky, ve kterých je vůně klíčovým faktorem, např. deodoranty, pěny do koupele, aviváže nebo osvěžovače vzduchu. Do druhé skupiny výrobků mohou být zařazeny šampóny, kondicionéry, krémy a prací prášky, tedy výrobky, jejichž vůně není při nakupování považována za rozhodující [15].

Parfém (*Parfum*) obsahuje 15 až 30 % parfémové kompozice, toaletní parfém (*Eau de Parfum*) 8 až 15 % kompozice, toaletní voda (*Eau de Toilette*) 4 až 8 % kompozice v koncentrovaném ethanolu. Kolínská voda (*Eau de Cologne*) obsahuje 3 až 5 % kompozice ve zředěném, často 70 % ethanolu ***(Tab. 1)*** [3].

Parfémy se vyrábějí ze 4 typů vonných látek [17]:

- základní látky – mají nejtrvanlivější vůni,
- upravovací látky – jimi se základní vůně zjemňuje,
- působící látky – dávají vůni určitou originalitu a nenapodobitelnost,
- ustalovací látky – spojují všechny látky do harmonického, stabilního a vůni neměnícího celku.

Na výrobu parfémů je využíváno okolo 500 přírodních materiálů a 1 000 aromatických chemikálií. Jednoduché parfémy mohou obsahovat 10 až 30 složek, sofistikovanější se mohou skládat z 50 až 100 vonných komponent [16].

Tab. 1 *Koncentrace parfémové složky v různých produktech* [5; 18]

Produkty	**Koncentrace [%]**
aerosol osvěžovač	0,5–2,0
čisticí prostředky do koupelny	≤ 5,0
tekutý prostředek na nádobí	0,1–0,5
make-up	1,0
pomáda na vlasy	0,5
sprej na vlasy	0,1–0,3
prací prášek	0,1–0,3
rtěnka	1,0
tekuté detergenty	0,1–1,0
sprchové a koupelové přípravky	0,5–4,0
péče o pokožku	0,01–0,5
mýdlo	0,5–2,0
vlasová péče	0,01–1,0
zubní pasta	0,5–1,0

2.2 Alergenní složky parfémových (vonných) kompozic

Nejdůležitějšími alergenními složkami kosmetických přípravků jsou vonné látky a konzervanty. Parfémové komponenty mohou být alergenními samy o sobě. Ale také mohou obsahovat senzibilizující kontaminanty, jako např. vysoce alergenní oxidační produkty. Dalšími potenciálními senzibilizátory mohou být v kosmetice antioxidanty, emulgátory, barviva, UV filtry a také řada přírodních ingrediencí [19].

Vonné složky jsou u testovaných pacientů druhou nejčastější příčinou kontaktní alergie hned po solích niklu. Parfemace je častá a množství látek vyvolávajících senzibilizaci je rozdílné v různých zemích, používá se více než 3 000 různých chemických látek a míra expozice je rozsáhlá [20].

Vonné ingredience jsou nejčastějšími viníky při kosmetických alergiích. Z tisíců různých vonných složek, které se používají, bylo již nejméně 100 vonných látek identifikováno jako alergenní, přičemž nejvíce reakcí je zapříčiněno osmi z nich v tzv. vonné směsi (*Fragrance mix I*): α-amylcinnamaldehyd, cinnamalkohol, cinnamaldehyd, eugenol, geraniol, hydroxycitronellal, isoeugenol a extrakt z větvičníku slívového. Extrakt z větvičníku slívového, isoeugenol a skořicový aldehyd jsou hlavními senzibilátory [16; 21; 22].

Od roku 1977 se *Fragrance mix I* rutinně používá k odhalování kontaktní alergie na vonné látky. *Fragrance mix I* představuje stále nejlepší screeningový nástroj na zjištění kontaktní alergie způsobené vonnými látkami, protože by měl detekovat 70 % až 80 % všech takových alergií. Nicméně je potřeba jej testovat ještě s dalšími vonnými alergeny [20; 22].

Kontaktní alergii na určitý produkt či sloučeninu je možné diagnostikovat tzv. epikutánními (*patch*, náplasťovými) testy. Při neprůkazném náplasťovém testu je dalším užitečným nástrojem test opakované aplikace (ROAT) [21].

Příklady alergenů, jež jsou obsaženy v silicích [23]:

- levandule – linalool 30–50 %,
- pomeranč – limonen 98 %,
- šalvěj – linalool 10 %,
- hřebíček – eugenol 90 %,
- bergamot – linalool 15 %; limonen 35 %,
- skořice – cinnamaldehyd 70–90 %,
- geránie – geraniol 60–75 %,
- růže – citronellol 50 %; geraniol 13 %,
- citron – limonen 70 %; citral 3–5 %,
- litsea cubeba – citral 55–75 %.

2.2.1 Dermatologické problémy související s používáním parfémů a parfémovaných výrobků

Alergie na parfémy a parfémované produkty je poměrně častá, se vzrůstající tendencí vzhledem k rostoucímu používání těchto produktů. Kosmetické přípravky jsou příčinou kontaktního ekzému asi u 10 % vyšetřovaných pacientů. Převážně jsou postiženy ženy, protože používají kosmetické produkty ve větší míře [20; 24].

Kontaktní přecitlivělost na kosmetické přípravky je vyvolána dlouhodobým a opakovaným používáním kosmetických přípravků. Může být zapříčiněna účinnou látkou i látkami pomocnými, které však mají nízký senzibilizační potenciál, a může vzniknout různým způsobem [20; 25]:

- *přímým kontaktem* (např. ekzém očních víček po nanesení maskary),
- *reakcí na výrobek nanesený v určité vzdálenosti* (např. ekzém očních víček na základě použití kosmetického výrobku na jiném místě na obličeji než na očích),
- *po dotyku rukou* (výrobek určen k používání na jiné části těla a nechtěně aplikován na obličej nebo na krk; např. ekzém na krku způsobený lakem na nehty),
- *kontaktem se vzduchem* (alergen je přenášen vzduchem a dostane se do kontaktu s kůží; např. stříknutí kapek parfému do obličeje jinou osobou, rozprašování WC deodorantů),
- *kontaktem s jinou osobou* (reakce na výrobek nošený jinou osobou; např: ekzém na hrudníku způsobený barvou na vlasy),

- *při vystavení se slunečnímu záření* (v přítomnosti slunečního záření se molekuly, které jsou běžně dobře tolerovány, stávají „fotoalergeny“; vyrážka vyvolaná výrobkem se vyskytuje jen v oblasti vystavené slunci; např. ekzém na obličeji a ve výstřihu způsobený krémem na opalování).

Většina látek se dostává do těla inhalací nebo přes pokožku, což je mnohem častější než příjem orální. Nepříznivé účinky vonných látek v parfémech a v parfémovaných kosmetických produktech zahrnují alergickou kontaktní dermatitidu, iritační kontaktní dermatitidu, fotosenzitivitu (citlivost na světlo), okamžité reakce (kontaktní kopřivka), pigmentační kontaktní dermatitidu a zhoršující se respirační problémy. Typickým klinickým projevem alergie na parfémy jsou dermatitidy na rukou, v obličeji, na nohou a v podpaždí. Citlivost je nejčastěji vybuzena silně parfémovanými produkty, jako jsou toaletní vody, vody po holení, deodoranty a antiperspiranty [16; 21; 22; 26].

Na hlavě je především kůže za ušima a na krku často vystavena vysokým koncentracím vonných látek v parfémech a vodách po holení. Citlivá pokožka v okolí očí (kůže očních víček) je vystavena parfémovaným produktům pro péči o pokožku, produktům dekorativní kosmetiky, čisticím přípravkům a také látkám šířeným ovzduším (tzv. vzdušná kontaktní dermatitida). Většina reakcí je slabá a charakterizovaná červenými a oteklými očními víčky. Někdy se ovšem mohou taktéž vyskytovat zduřelé léze s pupínky a váčky [21].

Dermatitidy spojené s parfémy a toaletními vodami mají rychlý nástup. V některých případech vyrážka souvisí s dalšími kožními nemocemi, jako je např. mazová dermatitida, folikulitida ve vousaté části obličeje nebo infekční podráždění kůže (vřídky) [21].

Léze na kůži mohou být zaměněny za atopické dermatitidy. Obvykle se nejdříve vyskytne dráždivá (iritační) či atopická dermatitida, která je později zkomplikována kontaktem s alergenem v produktech používaných k léčbě (parfémované léky) nebo k prevenci (ruční krémy a mléka) dermatitid na rukou, nebo v dalších parfémovaných výrobcích využívaných v domácnosti, při odpočinku či v práci [21].

Citlivost na vonné látky může být, kromě nejčastěji používaných parfémů a deodorantů, zapříčiněna také čisticími prostředky, tuhými deodoranty nebo mléky. Nové vyrážky se mohou objevovat nebo mohou být zhoršovány kontaktem s dalšími parfémovanými produkty: kosmetickými a toaletními výrobky, produkty ústní hygieny a pro užití v domácnosti, papírem a papírovými výrobky, tkaninami a oblečením, lokálními léčivy a vonnými látkami využívanými jako koření v jídle a pití. S parfémovanými výrobky je každý z nás v každodenním kontaktu, je proto nemožné se jim vyhnout. Navíc zavedení tzv. „*fragrance-free*“ přípravků neznamená, že přípravek neobsahuje vonné složky. Ty mohou být skryty např. ve formě konzervačního přípravku či maskovaného parfému [20; 21].

2.2.1.1 Alergická kontaktní dermatitida

Více než 60 000 substancí může způsobit kontaktní dermatitidu. Přes 3 000 může zapříčinit alergickou kontaktní dermatitidu [26].

Alergeny jsou nízkomolekulární (< 500 až 1 000 Da) molekuly schopné penetrovat kůží a vázat se na kožní proteiny za vytvoření množství rozdílných antigenů, které mohou vyvolat alergickou odpověď [21; 27].

K nejčastějším alergenům patří kovy, dále parfémy, léky, pryž, barviva, konzervační látky rostliny a kosmetika. Tyto látky jsou také obsaženy v Evropském standardu epikutánních, tzv. standardních testů. Profesionální alergická kontaktní dermatitida patří také k nejčastějším kožním chorobám z povolání [21; 27].

Modifikace kožního proteinu (haptenace) je považována za klíčový krok v manifestaci alergie na chemikálie s malou molekulovou hmotností. Pro senzibilizující chemikálie, které nejsou „protein reaktivní“, existuje hypotéza, že díky metabolickému působení může dojít ke konverzi takové sloučeniny na „protein reaktivní“ toxin uvnitř kůže [28].

Alergická kontaktní dermatitida se vyvine po opakovaném kontaktu kůže s alergenem. Je nutné se tedy zaměřit na dvě důležité oblasti: a) vztah struktury a aktivity – studium kontaktní alergie založené na konceptu hapten-protein vazby; b) aktivace nereaktivních sloučenin na kontaktní alergeny oxidací na vzduchu nebo působením kožního metabolismu [29].

Alergická kontaktní dermatitida se odlišuje od ostatních typů dermatitid způsobených rostlinami v tom, jako je například mechanická a chemická iritace a fototoxicita, že je zprostředkována skrze imunitní systém lidského těla [30].

Po expozici alergenu v senzibilizované kůži vzniká ekzémová reakce. Nejčastěji za 24 až 48 hodin a sílí ještě v dalších několika dnech, i když byl kontakt s vyvolávajícím alergenem přerušen [21; 27].

Alergická dermatitida vyvolaná kosmetikou se může projevit různými formami [25]:

- *svědění* – svědění v místě a v okolí aplikace kosmetického výrobku – první příznak alergie,
- *erytém* – nejčastější reakce, je to zarudnutí různého rozsahu, beze změny povrchu nebo tloušťky kůže, které mizí pod tlakem prstů,
- *ekzematid* – obvykle nazývané „lupy“ – jsou to malá růžová ložiska pokrytá značným množstvím jemných šupinek umístěných v limitovaných oblastech těla nebo jsou roztroušena po celém těle; všeobecně nejsou příliš svědivá a nejsou projevem přecitlivělosti na kosmetický výrobek,
- *ekzém* – neexistuje jenom jeden typ ekzému, ale je jich mnoho forem; mezi akutním a chronickým ekzémem existují četné přechodné formy, které se někdy těžko diagnostikují:
    - akutní ekzém – může se vyskytnout po aplikaci kosmetického výrobku obsahujícího molekulu zvanou „alergen“, která spustí imunologickou reakci odmítnutí; po třetím nebo čtvrtém nanesení výrobku se může objevit svědění, po němž následuje zarudnutí kůže, edém, puchýře a mokvání; pokud se aplikování škodlivého produktu přeruší, na kůži se vytvoří strup, který se samovolně odloupne a zanechá novou, růžovou, jemnou, ale zdravou kůži; v případě pokračující aplikace alergizujícího výrobku ekzém nabývá stále akutnější podobu, stále více mokvá, roste a šíří se i mimo místo aplikace,
    - chronický ekzém – na rozdíl od akutního ekzému nikdy nemokvá, povrch kůže je suchý, zhrublý a popraskaný; jako všechny druhy ekzémů je velmi svědivý; škrábání postižených částí kůže má za následek zhrubnutí označované jako „lichenifikace“,

- *kopřivka* – můžeme ji přirovnat ke kožním projevům, které vznikají po kontaktu s kopřivou; jsou to rudá, edematózně vyčnívající ložiska různé velikosti, nejčastěji v místě aplikace kosmetického přípravku; projevy jsou lokalizovány obvykle v místě aplikace kosmetického výrobku, málokdy jsou rozšířeny po celém těle; kopřivku provází intenzivní svědění; může zmizet spontánně v průběhu několika hodin, v případě pokračující aplikace se může dále rozšiřovat; kopřivka je kosmetickými výrobky vyvolána v mnohem menším rozsahu než ostatní typy alergických reakcí,
- *pigmentace* – je charakterizována změnou barvy kůže, která ztmavne; stejně tak se může vyskytnout i pigmentace nehtů způsobená aplikací různých kosmetických výrobků.

V žádném případě není možná desenzibilizace vůči kontaktním alergenům obsaženým v kosmetických výrobcích. Jediným účinným způsobem, jak dosáhnout vyléčení, je úplné a trvalé zamezení kontaktu s alergenem [25].

2.2.1.2 Iritační kontaktní dermatitida

Jedná se o komplexní skupinu lokalizovaných zánětlivých reakcí, které následují po neimunologickém poškození kůže. Zánět může být výsledkem akutního toxického (obvykle chemického) poškození kůže nebo opakovaného a kumulativního poškození slabšími iritanty (chemickými nebo fyzikálními). Není definován žádný laboratorní test, diagnóza se provádí dle klinické morfologie anebo je negativním výsledkem náplasťového testu [21].

Příčinou jsou nealergické, dráždivé, převážně zevní faktory (povahy fyzikální, chemické nebo biologické). Z hlediska průběhu se používají termíny akutní (toxická) dermatitida či chronická (kumulativní) dermatitida. Mechanismus působení iritancií je rozdílný, ve svém důsledku však vyvolávají nespecifickou imunitní odpověď [27].

Z chemických příčin to jsou především voda, detergenty, alkálie, kyseliny, organická rozpouštědla, cement, vápno, minerální oleje, chladicí emulze. Z fyzikálních se pak jedná o termické vlivy (teplo a mráz), radiační vlivy (světlo a záření), klimatické vlivy (sucho a vlhko), mechanické vlivy (tření, tlak, písek, minerální vlákna) a další vlivy včetně vzdušných (prach, kouř, výpary, éterické a těkavé látky). K biologickým iritačně působícím agens patří mikrobi, rostlinné a živočišné šťávy. V praxi se často tyto faktory kombinují [27].

Na rozdíl od alergické kontaktní dermatitidy jsou postiženi všichni exponovaní jedinci. Reakce je ohraničená, nešíří se a subjektivně spíše pálí a bolí. K vyvolání akutní reakce stačí jedna expozice. Intenzita projevů závisí na koncentraci či dávce a době působení agens, dále na chemické struktuře a schopnosti penetrace. V takovém případě projevy vznikají rychle, respektive akutně do několika minut, u slabších iritancií do 24 hodin po expozici, intenzita může mít několik stupňů od erytému, edému až k vezikulám či bulám, u fyzikálních a chemických traumat až po nekrózu. Při dlouhodobém, opakovaném působení i primárně nedráždivých látek anebo jen slabých iritancií se u disponovaných jedinců reakce vyvíjí po měsíce až léta a má á priori chronický charakter [27].

2.2.1.3 Alergická a iritační kontaktní dermatitida: Jak se liší?

Alergie a podráždění (iritace) kůže se často omylem zaměňují. Je důležité je rozpoznat, protože léčba těchto kožních reakcí a jejich prognóza jsou zcela odlišné ***(Tab. 2)*** [25].

Tab. 2 *Rozdíly alergické a iritační kontaktní dermatitidy* [25]

	Alergická dermatitida	**Iritační dermatitida**
Doba vzniku	po opakovaných kontaktech výrobku s kůží, nebo když začal být výrobek po určité době znovu používán	okamžitě nebo po několika aplikacích
Místo výskytu vyrážky	alergie se často rozšiřuje i mimo místo aplikace	omezeno na oblast kontaktu s výrobkem
Predispozice	individuální přecitlivělost na výrobek	může se vyskytnout u kohokoli
Klinické symptomy	zarudnutí, edém, puchýřky, trhlinky na kůži a silné svědění	trnutí, napjatost, zarudnutí, trhliny, puchýřky, svědění minimální nebo žádné
Rozsah výskytu vyrážky	reakce je možná i při malé a krátkodobé aplikaci výrobku	variabilní, podle koncentrace, doby působení a množství aplikovaného výrobku
Klinický průběh	pomalé zotavení, nutnost celkového vyšetření, častý návrat alergie při přetrvávajícím kontaktu s alergenem	obvykle rychlé a snadné vyléčení
Příčina	reakce na molekulu, která se stala „alergenem“	nesprávný výběr výrobku, nevhodný pro typ pleti
Výrobky a molekuly, které vyvolávají danou reakci	parfémy, kolínské vody a parfémované výrobky, konzervační látky, masťové základy (lanolín), barvy na vlasy, odlakovače a jiné výrobky na nehty, krémy na opalování atd.	mýdla, šampóny, deodoranty, pěny na holení, voňavky, kolínské vody a výrobky, které jsou příliš tučné, výrobky proti stárnutí kůže s AHA a/nebo s kyselinou vitamínu A
Nejčastěji postižené oblasti	oční víčka, zbytek obličeje, krk, rty, kůže na hlavě, ruce (hřbet) a konečky prstů	oční víčka, ruce (hřbet ruky nebo dlaň), podpaždí, genitálie, krk, rty

2.2.2 Diagnostikování kontaktní alergie na vonné látky

Vonné látky jsou nejdůležitějšími kosmetickými alergeny. V případě předpokládané alergie na parfémované produkty jsou dnes nejčastěji využívány následující markery: *Fragrance mix I, Fragrance mix II* a *Peruánský balzám*. K nim je připojen seznam 26 nejsilnějších senzibilizujících vonných látek (PASs) identifikovaných Evropskou kosmetickou direktivou. Pomocí Peruánského balzámu je možné detekovat pouze 50 % alergií. Lepším nástrojem pro detekci jsou tedy *fragrance mixy* [26; 31].

Fragrance mix I byl zaveden jako screeningový nástroj na zjištění citlivosti vonné látky již v 70. letech 20. století. Směs obsahuje osm nejčastěji využívaných vonných látek: α-amylcinnamaldehyd, cinnamalkohol, cinnamaldehyd, eugenol, geraniol, hydroxycitronellal, isoeugenol a extrakt z větvičníku slívového. Díky této směsi bylo možné prokazatelně detekovat 70–80 % všech případů citlivosti na vonné látky. Reakce na vonnou směs je u dnešních dermatologických pacientů v rozsahu od 6 do 14 % [21].

V roce 2005 byl představen nový *fragrance mix*, který obsahuje 6 ingrediencí, tzv. *Fragrance mix II*: citronellol 0,5 %; lyral 2,5 %; hexylcinnamal 5,0 %; citral 1,0 %; kumarin 2,5 %; farnesol 2,5 %. Nejvýznamnějšími alergeny jsou lyral a farnesol [20; 32].

V případě podezření na alergickou kontaktní dermatitidu jsou testovány pacientovy osobní věci (produkty osobní hygieny) a mohou dát pozitivní reakce v náplasťovém testu (*patch test*), což prokáže alergii pacienta na daný produkt [21].

Při neprůkazném náplasťovém testu je dalším užitečným nástrojem test opakované aplikace (ROAT). Podezřelý alergen, jímž může být jednotlivá vonná látka nebo parfémovaný produkt, je aplikován na loketní jamku dvakrát denně po dobu maximálně 14 dnů. Pozitivní reakce potvrzuje kontaktní alergii [21].

2.2.2.1 Epikutánní testy

Epikutánní testy (*patch tests*; ET) slouží ke zjišťování alergické kontaktní dermatitidy, která je typem imunologické reakce. Test spočívá v aplikaci podezřelé substance na kůži zad na dobu 48 hodin, odečítání probíhá ještě po dalších 24 a 48 hodin. Interpretace výsledků bývá velmi obtížná. Úspěšnost vyšetření podmiňuje správná volba alergenu ve vhodné a dostatečné (alergologické) koncentraci, adsorpce a permeace látky do epidermis, vhodná a správná technika testu, doba vyšetření a místo aplikace testu, dostatečná doba odečítání a zkušeností s hodnocením reakcí a interpretací výsledků [33; 34].

Testovací materiál je připravován průmyslově. Obsahuje celkem 10 kruhových papírových, plsťových, hliníkových terčíků (komůrkové testy) o vnitřním průměru 8 mm na hypoalergenní náplasti. Obvyklý počet v jednom setu je 10 testovacích polí [33].

Standardizace alergenů zajišťuje jejich přesné chemické složení a čistotu. Dodávány jsou v injekčních stříkačkách a aplikují se přímo na testoplast polí [33].

Každý alergen je rozpuštěn v inertním vehikulu. Bývá jím nejčastěji vazelína. Tekutými vehikuly bývá voda, olej, aceton a ethanol. U komůrkových testů se aplikují na filtrační papír. Koncentrace pro jednotlivé speciální alergeny je udávána v tabulkách knih o kontaktní dermatitidě nebo v katalozích firem distribuujících alergeny [33].

Využívány jsou následující druhy epikutánních testů [33; 34]:

- *uzavřené ET* – klasický uzavřený ET; skarifikační ET; fotosenzibilizační ET,
- *otevřené ET* – otevřený ET, iontoforetický ET.
- *bukální ET.*

Uzavřený epikutánní test

Čtvereček několika vrstev hydrofilové gázy o velikosti 1 × 1 cm (nosič alergenu) je navlhčen 2 kapkami roztoku alergenu nebo potřen či posypán alergenem ve vazelíně či prášku nebo je vystřižen stejně veliký vzorek pevné hmoty (textil, kůže, část rostliny aj.) a fixován lepivou náplastí na kůži zad odmaštěnou etherem [34].

Pro ET jsou vyráběny tzv. testoplasty, kde je v centru mezikruží z celofánu nebo měkkého PVC na lepivé náplasti upevněn vlastní nosič alergenu – vrstva plátna, netkaný textil, filtrační papír aj. Modernější tzv. komůrkové testy neprodyšně uzavírají test okrajovým vyvýšením kruhového výlisku z hliníkového plíšku nebo z polypropylenu. Centrální prohlubeň výlisku je vyplněna alergenem [34].

Každý test je značen při horním okraji lepivé náplasti na kůži barevnou značkou a testy jsou na líci náplasti očíslovány v pořadí shodném s protokolem testů. Náplast s testy je odstraněna obvykle po 24 až 48 hodinách, pevné hmoty jsou ponechány působit 2 až 3 dny. Testy jsou odečítány na kůži za 24, 48 a 72 hodin, výjimečně 96 hodin až týden od aplikace. Po celou dobu odečítání jsou nemocnému zakázány sprchy, celkové koupele, práce spojené s nadměrným pocením, slunění, škrabání zad a zbytečné dotyky prstů rukou. Reakce jsou hodnoceny vizuálně [34].

Klasický uzavřený ET

Je prováděn na klinicky zdravé kůži zad po odmaštění kůže etherem nebo alkoholem. Testy jsou přikládány asi 10 cm pod poslední krční obratel a místa nad hrudními obratli jsou vynechávána. Alergeny jsou obvykle ponechány v kontaktu s kůží 48 hodin (u očekávaných silných reakcí může být kontakt alergenu s kůží jen 24 hodin, u pevných látek a látek se špatným průnikem do kůže naopak až 72 hodin). První odečet reakcí následuje po 48 hodinách, další po 4 až 8 dnech od nalepení testů. Odečty musí být minimálně dva [33].

Skarifikační ET

Skarifikační ET je modifikací uzavřeného ET. Užívá se pro alergeny, u kterých je známo, že mají velkou molekulu a špatně pronikají do kůže. Jde např. o sulfonamidy, neomycin, proteinové alergeny (srst, maso, vejce, zelenina a další). ET se přikládá na místo, na kterém byla před aplikací daného alergenu narušena epidermis několika nekrvácejícími tahy hrotu injekční jehly. Na toto poškození kůže musí být pamatováno během odečítání testů (falešně pozitivní reakce) [33; 34].

Fotosenzibilizační ET

Fotosenzibilizační ET se používá k diagnostice fotoalergické kontaktní dermatitidy. Alergická reakce se rozvíjí až za účasti UV záření. Látek, které tyto reakce mohou způsobit, je celá řada (např. sulfonamidy, tetracyklinová antibiotika, antidiabetika, parfémy, estery kyseliny skořicové, rostliny, sunscreeny aj.) [33; 34].

Technika tohoto testu je odlišná od prostého ET. Dvě sady podezíraných alergenů jsou aplikovány na záda či paže, poprvé se odečítají obě sady za 48 hod. Poté je jedna sada zakryta a druhá ozářena přírodním sluncem 1 až 2 hodiny, xenonovou lampou nebo UVA zářičem v dávce 5–10 $J \cdot cm^{-2}$. Následuje další odečítání opět obou sad za dalších 24 a 48 hodin, eventuálně i později. Pozitivita v ozářených polích s negativitou v neozářených polích potvrzuje fotokontaktní alergii, pozitivita v obou srovnávaných polích svědčí pro prostou kontaktní alergii [33].

Otevřený ET

Otevřené ET se používají pro alergeny rozpuštěné v těkavých rozpouštědlech (lihu, acetonu, benzínu). Aplikovány jsou na kůži předloktí nebo břicha a bez krytí náplastí se nechají zaschnout. Odečítána je reakce časná (za 20 až 30 minut) a reakce pozdní (za 48 a 72 hodin). Tyto testy jsou používány při testování látek neznámého složení a účinku, při vyšetřování nemocných s očekávanou silnou alergickou reakcí či při hrozbě anafylaktického šoku, při vyšetřování kontaktní urtikárie a kontaktní proteinové dermatitidy. Alergeny se zakapávají kolodiem a pak se jedná o kompromis mezi otevřeným a uzavřeným testem. Test se vzorkem alergenu neuzavíráme a lepivou náplast v úzkém proužku použijeme jen pro fixaci alergenu na kůži po dobu sledování očekávané reakce. Stejně tak je možné po odečtení časné reakce alergen uzavřít pod testoplast a postupovat jako u klasického uzavřeného testu [33; 34].

Metoda umožňuje určit snadno práh alergologické i toxické koncentrace a včas zasáhnout při narůstající toxické reakci či hrozbě anafylaxe [34].

Iontoforetický ET

Iontoforetický ET využívá elektrické disociace alergenů ve vodě. Metoda vychází z předpokladu, že na standardní ploše aktivní elektrody, při stejné intenzitě proudu a konstantní době aplikace je do epidermis vpraveno standardní množství alergenu z roztoku o dané molární koncentraci. Metoda se využívá u sporných reakcí na kovy a u alergenů s velkou molekulou. Je ovšem použitelná pouze pro alergeny rozpustné ve vodě, jen pro vybrané alergeny a pouze v některých indikovaných případech, neboť je časově náročná. Výsledky testů jsou reprodukovatelné a v případě špatně pronikajících alergenů i výhodné [33; 34].

Aktivní elektroda o rozměru 1 cm^2 je přiložena na kůži přes několik vrstev filtračního papíru napuštěného roztokem alergenu. Větší indiferentní elektrodu drží nemocný v gáze smočené vodovodní vodou v dlani. Doba aplikace je 20 až 90 sekund proudem o intenzitě 0,3–0,5 $mA \cdot cm^{-2}$ podle alergenu. Elektrický náboj alergenu rozhoduje o tom, zda je látka aplikována z anody či katody [34].

Bukální test

Je využíván pro průzkum alergenu podezíraného z vyvolání alergického kontaktního ekzému v dutině ústní, pakliže ET na zádech nedal pozitivní reakci a podezření na jeho působení trvá. Provádí se na bukální sliznici, na níž se přidrží malá částečka podezřívaného léku či tampón zvlhčený roztokem látky v alergologické koncentraci na dobu 20 až 30 minut. Pozitivní reakce se projeví do 24 hodin jako erytém, edém až puchýřky [34].

2.2.2.2 Hodnocení reakcí v epikutánním testu

Při ET je možné obdržet dva typy reakcí, alergické a iritační. Odlišení zejména slabých reakcí bývá obtížné a při posuzování rozhoduje morfologický obraz reakce, její ohraničení a rozsah, dynamika rozvoje, případně subjektivní pocity vyšetřovaného [34].

Doporučená odečítací škála reakcí je následující [33]:

- ? nejasná reakce, lehký erytém,
- + erytém, infiltrace, ojediněle papuly,
- ++ předcházející + četné papuly a vehikuly,
- +++ předcházející + buly a mokvání,
- - negativní reakce.

Alergická reakce má morfologický vzhled i dynamiku ekzému, postupně zesiluje od negativity při prvním čtení, svědí a šíří se do okolí testovaného pole. Hodnocena je následovně ***(Tab. 3)*** [34]:

Tab. 3 *Hodnocení alergické reakce* [34]

+	++	+++	++++
erytém	papulky	papulovezikuly, drobné vezikuly a edém	puchýř a mokvání

Vyvolání alergické reakce je cílem vyšetření. Kromě uvedené odečítací škály pozitivní reakce jsou posuzovány i další charakteristiky reakce [33]:

- neostré ohraničení reakce v testovacím poli,
- reakce „dobíhají“,
- vývoj reakce je pomalejší, zesilují nebo přetrvávají ve stejné intenzitě během odečítacích dnů.

Iritační reakce vzniká nedostatečným ředěním některých hmot nebo zvýšenou dráždivostí kůže vyšetřovaného, pro vyhodnocení alergie je bezcenná. Má morfologii a dynamiku rozvoje jako každá akutní iritativní dermatitida. Vniká záhy a v průběhu odečítání testů slábne a odeznívá. Zůstává omezena na místo aplikace testů a nešíří se. Slabá reakce nečiní nemocnému potíže, silnější pálí až bolí. Jednotlivé stupně jsou značeny takto ***(Tab. 4)*** [34]:

Tab. 4 *Hodnocení iritační reakce* [34]

+	++	+++	++++
erytém	erytém a edém	vezikula až bula	nekróza

Pozitivní reakce iritačního typu se může v epikutánním testu také vyskytnout, méně zkušeným může být považována za alergickou reakci. Bývá způsobena zvýšenou dráždivostí kůže nebo příliš vysokou koncentrací testované látky a má některé typické znaky [33]:

- reakce je ostře ohraničená na testovací pole,
- klinicky se jedná o decentní erytém, puchýř, nekrózu, hemorhagie, petechie,
- reakce persistuje krátkou dobu,
- reakce zeslabuje, popř. vymizí během odečítacích dnů.

2.3 Regulace kosmetického průmyslu

2.3.1 Regulace vonných látek v kosmetických výrobcích

Cílem regulace parfumérského průmyslu je zajistit bezpečné používání látek tím, že budou stanoveny jejich kvalitativní a kvantitativní limity a že dojde k zamezení jejich potenciálně nebezpečných účinků. Většina látek je využívána mnoho desetiletí, je ovšem nutné pravidelně všechny látky monitorovat bez ohledu na délku jejich používání. V Evropě monitoruje aktivně vonné látky Evropská komise (EC) [23; 35].

2.3.1.1 Regulace v rámci Evropské unie

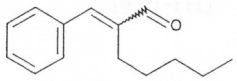
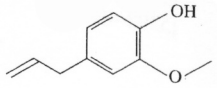
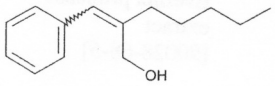
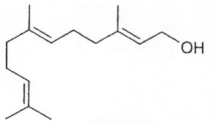
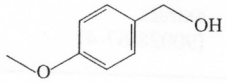
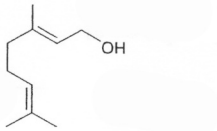
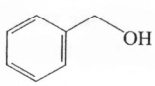
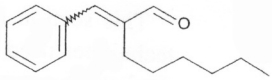
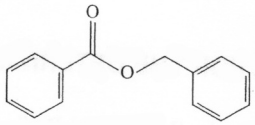
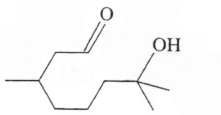
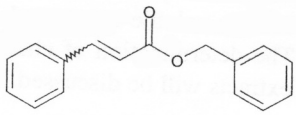
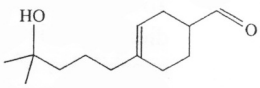
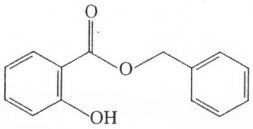
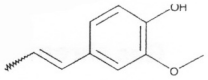
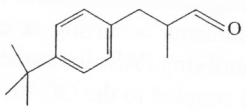
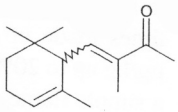
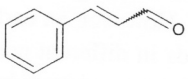
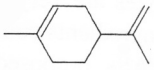
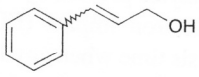
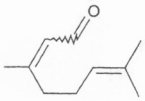
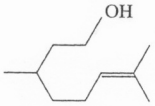
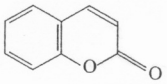
Kosmetické produkty jsou v rámci EU primárně regulovány Evropskou kosmetickou direktivou (*European Cosmetics Directive*) a jejím 7. dodatkem (*7th Amendment to the Cosmetics Directive*), který vešel v platnost 11. března roku 2005 [36; 37; 38].

Dle Evropskou unií publikovaného dodatku (*Directive 2003/15/EC*; z roku 2003) k Příloze III EU Evropské kosmetické direktivy (*Council Directive 76/768/EEC*; z roku 1976) v roce 2003 (v platnosti od 11. března 2005) mohou být veškeré vonné látky, vonné kompozice a materiály zahrnuty dohromady pod označením „*perfume*“ nebo „*aroma*“. Existuje však 26 aromatických látek, deklarovaných Přílohou III Evropské kosmetické direktivy jako potenciálně alergenní vonné látky (PASs) ***(Tab. 5)***, jež musí být uvedeny na etiketách výrobků při překročení koncentrace 100 parts per milion (ppm; $mg \cdot kg^{-1}$) pro *rinse off* přípravky a 10 ppm pro *leave on* přípravky. Tyto ingredience musí být uvedeny pod svými názvy dle Mezinárodní nomenklatury kosmetických ingrediencí (*International Nomenclature for Cosmetic Ingredients*; INCI) [5; 32; 39; 40].

Jelikož vonné látky nemusí být deklarovány na obalu výrobku, kromě již zmíněných 26 požadovaných Evropskou kosmetickou direktivou, je nemožné znát přesný obsah vonných substancí v kosmetických produktech [5; 39].

Kromě 26 PASs regulovaných Přílohou III, Evropská kosmetická direktiva zakazuje použití více než 50 vonných substancí v kosmetických výrobcích, jichž se týká Příloha II. Zvláštní pozornost je věnována syntetickým mošusům. Zejména mošusový ambrett je spojován s různými typy dermatitid, s karcinogenními vlivy a s endokrinní dysfunkcí. Mošusový ambrett a mošusový tibeten jsou zakázány v kosmetických přípravcích dle Přílohy II, zatímco mošusový xylen a mošusový keton jsou povoleny s omezeními stanovenými Přílohou III Evropské kosmetické direktivy [5].

Tab. 5 *Seznam 26 PASs dle Evropské kosmetické direktivy* ***(Příloha III: Tab. VIII)*** [39; 42]

Název [CAS č.]	Struktura	Název [CAS č.]	Struktura
α-Amylcinnam aldehyd [122-40-7]		Eugenol [97-53-0]	
α-Amylcinnamyl alkohol [101-85-9]		Farnesol [106-28-5]	
Anýz alkohol [105-13-5]		Geraniol [106-24-1]	
Benzyl alkohol [100-51-6]		α-Hexylcinnam aldehyd [101-86-0]	
Benzyl benzoát [120-51-4]		7-Hydroxy citronellal [107-75-5]	
Benzyl cinnamát [103-41-3]		Lyral [31906-04-4]	
Benzyl salicylát [118-58-1]		Isoeugenol [97-54-1]	
Butylfenyl methylpropional [80-54-6]		α-Isomethyl jonon [127-51-5]	
Cinnamaldehyd [104-55-2]		Limonen [5989-27-5]	
Cinnamylalkohol [104-55-1]		Linalool [78-70-6]	
Citral [5392-40-5]		Methyl-2-oktynoát [111-12-6]	
Citronellol [106-22-9]		Evernia prunastri extrakt [90028-68-5]	(extrakt z dubového mechu)
Kumarin [91-64-5]		Evernia furfuracea extrakt [90028-67-4]	(extrakt z lišejníku)

2.3.1.2 Regulace ve Spojených státech amerických

Ve Spojených státech amerických spadají kosmetické vonné látky zejména do kompetence amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (*U.S. Food and Drug Administration*; FDA). Pravomoc týkající se vonných látek je sdílena FDA a americkou Komisí pro bezpečnost spotřebitelských výrobků (*U.S. Consumer Product Safety Commission*; CPSC); některé regulační aspekty, pokud jde o komtaminaci ovzduší a vod, spadají pod Agenturu pro ochranu životního prostředí (*U.S. Environmental Protection Agency*; EPA) [35].

Zákon o potravinách, léčivech a kosmetice (*Food, Drugs and Cosmetics Act*; FD&C Act) definuje kosmetiku jako výrobky určené k aplikaci na lidské tělo s účelem čištění, zkrášlování, podpory atraktivnosti nebo provádění změn vzhledu bez ovlivnění tělních struktur a funkcí [35].

Jednotlivé komponenty tvořící vůni nemusí být uvedeny na obalu výrobku. Vonné nebo chuťové látky mohou být uvedeny pod pojmem „*fragrance*“ nebo „*flavour*“ [5; 35].

Produkty, které obsahují vonné látky využívané k maskování nebo překrytí zápachu jiných přítomných látek, nemusí mít „*fragrance*“ zmíněn v ingrediencích. Obvykle jsou tyto maskující látky v nízkých koncentracích [35].

CPSC je zodpovědná za bezpečnost spotřebitelských produktů, které nejsou považovány za kosmetické [35].

EPA se zajímá o environmentální aspekty produkce a používání vonných látek. Tyto látky mohou ovlivnit kvalitu ovzduší a jsou důkazy, že vzdušné polutanty mohou hrát roli ve zhoršení astmatu [35].

EPA se také podílí na eliminaci těkavých organických sloučenin (VOCs) ve spotřebitelských produktech. Prakticky všechny vonné chemikálie jsou těkavými nebo polotěkavými sloučeninami [35].

2.3.1.3 Regulace v Kanadě

I když je Kanada blízce spjatá se Spojenými státy americkými, má své vlastní zákony aplikované na kosmetické produkty. V Kanadě je za bezpečnost kosmetických produktů zodpovědná kanadská národní zdravotnická agentura *Health Canada* [35; 43].

Ještě nedávno neexistoval v Kanadě zákon, který by vyžadoval seznam ingrediencí na kosmetických přípravcích. Avšak od 16. listopadu roku 2006 vešel v platnost zákon, který vyžaduje uvedení seznamu ingrediencí na kosmetickém produktu, s nímž je obchodováno kdekoliv na území Kanady [43].

Největším historickým problémem byla v Kanadě potřeba dvojjazyčnosti. Pro výrobky jsou vyžadovány dva seznamy ingrediencí: jeden v angličtine a druhý ve francouzštině. Kanadská vláda však nyní uznává většinu standardních názvů ingrediencí. U látek, které ovšem nejsou shodné s těmi americkými, je stále aplikován požadavek dvojjazyčnosti. Existuje tedy jistá zmatenost v požadavcích díky tomu, že francouzština je oficiálním jazykem v provincii Quebec, zatímco angličtina je oficiálním jazykem v ostatních kanadských provinciích. Povinné značení musí být v obou jazycích, tak jako varovná sdělení. Avšak v provincii Quebec musí mít prodávaný produkt kompletní dvojjazyčné značení [43].

Další změnou je vytvoření NHP (*Natural Health Products*) programu. Tento regulační systém byl vytvořen zejména proto, aby existovala kategorie pro produkty s přírodními ingrediencemi, které měly historické terapeutické nebo praktické využití. Z této nové kategorie nebyla vyloučena kosmetika. Kategorie NHPs obsahuje některé produkty, které byly považovány za kosmetické. Tudíž nyní kromě dvou původních kategorií, kosmetické produkty a Kategorie IV léčiva (produkty považované za terapeutické, ale bez požadavku na předpis), existují kategorie tři: kosmetické produkty, Kategorie IV léčiva a NHPs [43].

2.3.1.4 Regulace v Japonsku

Japonsko má oproti jiným zemím přísnější regulaci vonných látek. Používání nitro-mošusových sloučenin bylo zakázáno již v 80. letech 20. století kvůli dopadu na životní prostředí. Některé časté senzibilizátory je zakázano zcela používat. Díky tomu byly v Japonsku sníženy alergie na vonné látky [35].

Existuje názor, že kůže Japonců může být citlivější na některé chemikálie a konečné produkty. Po mnoho let byl tento názor překážkou při schvalování nových chemikálií v kosmetice. Primárně je pro Japonce nejdůležitější veřejné zdraví a bezpečnost [43].

Od 1. dubna 2001 už není v Japonsku vyžadováno formální schválení pro produkty, které spadají pod definici kosmetiky. Tento proces se změnil na oznámení, v němž je sděleno, kdo má na starosti daný produkt a kdo je za něj zodpovědný. Tím byla zrušena půlroční čekací doba pro formální schválení. Avšak díky tomu, že byl schvalovací proces nahrazen pouze oznámením, se japonská vláda více zaměřila na kontroly. Ve zdlouhavém schvalovacím procesu vláda primárně převzala zodpovědnost za bezpečnost produktu. Ovšem bez něj mají nyní distributoři plnou odpovědnost za bezpečnost konečného produktu. Všichni, kdo do Japonska importují i všichni japonští výrobci, musí být licencovaní [43].

Stejně jako v Kanadě i v Japonsku dříve neexistoval požadavek na kompletní seznam ingrediencí na kosmetickém produktu. Nyní musí být zmíněny všechny ingredience využité v produktu. Všechny součásti musí být uvedeny pod japonským názvem. Přibylo požadavků na označování výměnou za urychlení uvedení výrobku do oběhu [43].

2.3.1.5 Regulace v Austrálii

Také tato země má svůj unikátní regulační systém. Austrálie má vlastní schválený seznam ingrediencí pro kosmetické výrobky a chemikálie využité v jiných produktech, tzv. Australský seznam chemických substancí (*Australian Inventory of Chemical Substances*; AICS). Jestliže byla některá ingredience použita v kosmetice, musí bý na seznamu AICS. Pokud ne, musí být zahrnuta v rámci Národního ohlašování chemických látek a scénáře hodnocení zdravotních rizik (*National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme*; NICNAS). Je-li ingredience schválena, je povoleno ji využít do kosmetického přípravku importovaného nebo vyrobeného v Austrálii [43].

I když neexistuje žádné oficiální schvalování kosmetického produktu, stavební materiály musí být vždy schváleny, aby mohly být použity do prodávaných výrobků [43].

Terapeutické zboží musí obsahovat jen schválené ingredience a musí být zahrnuto v Australském registru terapeutického zboží (*Australian Register of Therapeutic Goods*; ARTG).

2.3.2 Nařízení o jiných složkách v kosmetických výrobcích

Existují substance související s vonnými látkami, které také podléhají různým omezením, zejména kvůli jejich nežádoucím vedlejším účinkům [5].

Např. estery ftalátů (ftaláty) byly využívány jako rozpouštědla a nosiče pro vonné složky, jako fixátory vůně a denaturační prostředky alkoholů. Některé ftaláty, jako třeba dibutylftalát, diethylhexylftalát, dimethoxyethylftalát, pentyl- a dipentylftalát a benzylbutylftalát jsou zakázány Přílohou II na základě toho, že jsou klasifikovány jako toxické pro reprodukci (teratogenní) dle Nařízení Komise 76/769/EEC [5].

Nicméně další ftaláty, jako dimethylftalát a diethylftalát, jsou v kosmetických výrobcích povoleny bez omezení i přes to, že existují důkazy spojující expozici ftalátů s poškozením DNA v lidských spermiích. Navíc současné výzkumy ukazují na vztah mezi ftaláty a respiračními potížemi u dospělých [5].

2.3.3 Organizace RIFM a IFRA

Parfumerský průmysl je samoregulován. Zejména díky blízké spolupráci mezi Výzkumným ústavem aromatických látek (*Research Institute for Fragrance Materials*; RIFM) a Mezinárodní asociací pro výzkum aromatických látek (*International Fragrance Research Association*; IFRA) a také díky kooperaci mezi RIFM a FDA [32].

RIFM a IFRA formálně přijaly přístup Kvantitativního zhodnocení rizika (*Quantitative Risk Assessment*; QRA), redefinovaný pro vonné látky identifikované jako kontaktní alergeny, jako centrální strategii pro primární prevenci kožní přecitlivělosti na tyto materiály ve spotřebitelských produktech. QRA metodologie je v souladu s principy toxikologického hodnocení rizika; může být aplikována na kožní přecitlivělost; zaměřuje se na faktory, které jsou specifické pro kožní senzibilizaci [44].

Klíčové kroky QRA jsou: 1) stanovení mezní hodnoty; 2) aplikace senzibilizačních hodnotících faktorů (*Sensitization Assessment Factors*; SAF); 3) kalkulace vystavení konzumenta danému produktu při jeho používání [45].

2.3.3.1 RIFM

Organizace RIFM byla založena ve Spojených státech amerických v roce 1966 a sídlí v New Jersey. Tato nezisková, vědecká a nezávislá instituce vyhodnocuje a rozšiřuje vědecké poznatky týkající se bezpečnosti vonných látek nacházejících se v kosmetických výrobcích a dalších produktech. RIFM udržuje největší databázi toxikologických dat, jenž se týkají vonných a chuťových materiálů; zahrnuje více než 4 500 složek [5; 23; 32].

Cílem práce je systematicky studovat a testovat vonné látky běžně používané v parfumérském průmyslu a zajistit tak jejich nezávadnost a maximální bezpečnost používání do vonných směsí a dále do spotřebitelských výrobků. RIFM posuzuje lidské zdraví a environmentální rizika představovaná těmito materiály [23; 46].

Kritéria, podle nichž jsou vonné látky posuzovány, jsou [23]:

- kvantita použití,
- expozice,
- chemická struktura.

Panel expertů RIFM (*Expert Panel of RIFM*; REXPAN), který představují mezinárodně uznávaní vědci z oblasti dermatologie, farmakologie, toxikologie a ekologie, hodnotí výsledky výzkumu a podílí se na stanovení bezpečnostních limitů látek. Jejich konečná rozhodnutí jsou základem pro stanovení tzv. Standardů vydávaných IFRA [23; 46].

2.3.3.2 IFRA

Organizace IFRA byla založena v roce 1973 v Ženevě. Tato asociace dohlíží na dodržování pokynů týkajících se vonných látek založených na závěrech RIFM. Z výsledků testů RIFM ustanovuje závěry a doporučení ohledně používání vonných látek ve formě tzv. Standardů [5; 23; 32].

Možné závěry o použití vonných látek jsou [23]:

- bez omezení,
- s omezením,
- zakázáno.

Standardy jsou předávány národním a regionálním asociacím, jež o nich nadále informují jednotlivé členské společnosti (RIFM → REXPAN → IFRA → členové). Standardy jsou pro všechny členy závazné [23].

IFRA vydává seznamy vonných látek a na základě probíhajících testů a jejich výsledků doporučuje koncentrace při použití v parfémových kompozicích. Doporučení jsou uváděna na internetových stránkách a neustále doplňována. Používání určité látky může být zpřísněno nebo může být na základě nejnovějších testů doporučený limit zvýšen [23; 47].

2.3.4 Legislativa týkající se alergenů

V prosinci 1999 Vědecký výbor pro kosmetické a nepotravinové produkty (*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products*; SCCPNFP) stanovil 24+2 přírodních produktů jako potenciální alergeny (PASs). SCCPNFP nepřipouští zásadní rozdíl mezi přírodní surovinou (komplexní vonný celek s nezaměnitelnou a jedinečnou identitou) a namíchanou směsí z jednotlivých chemických látek. Až 90 % přírodních surovin obsahuje vždy nejméně 1 z 26 sledovaných alergenů [23].

Pro splnění požadavků legislativy je nutné značení alergenů na obalu kosmetického výrobku, pokud překročí následující limity [48; 49; 50]:

- 0,001 % (10 $mg \cdot kg^{-1}$; ppm; $\mu g \cdot ml^{-1}$) *leave on* v konečném výrobku (po nanesení se kosmetický prostředek nesmývá),
- 0,01 % (100 $mg \cdot kg^{-1}$; ppm; $\mu g \cdot ml^{-1}$) *rinse off* v konečném výrobku (po nanesení se kosmetický prostředek smývá max. do 20 minut).

Při vyšší koncentraci a době nad 20 minut je povinnost uvedení příslušné látky na obal výrobku [23].

Vlastnosti bezalergenních parfémů jsou [23]:

- prakticky bez přírodních látek, tedy bez účinků navíc,
- méně atraktivní po senzorické stránce,
- často obtížně realizovatelné a drahé.

Výrobci parfémových kompozic mají povinnost poskytnout odběrateli informace o přítomných alergenech v dané vůni – nutné je přesné analytické změření a dobrý informační systém [23].

Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady Evropské unie č. 648/2004 ze dne 31. března 2004 o detergentech (s platností od 8. října 2005) existuje již také povinnost označování obalů detergentů prodávaných veřejnosti – parfémy musí být uvedeny bez ohledu na jejich koncentraci. Pokud jsou přidávány jako takové v koncentracích vyšších než 0,01 % hmot. alergenní vonné látky, které se vyskytují v seznamu látek v Příloze III směrnice 76/768/EHS v důsledku její změny směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2003/15/ES provedené za účelem zařazení alergenních parfémových složek ze seznamu poprvé zřízeného Vědeckým výborem pro kosmetické prostředky a nepotravinové výrobky (SCCPNFP), musí být uvedeny, přičemž se použije názvosloví uvedené směrnice; stejně tak musí být uvedeny i ostatní vonné látky, které byly následně doplněny do Přílohy III části I směrnice 76/768/EHS v rámci přizpůsobení uvedené přílohy technickému pokroku [51].

Povinnost označovat alergeny znamená citelný zásah do fungování parfumérského průmyslu. Do budoucna bude docházet k narůstání počtu omezených a zakázaných látek a budou ustanovena přísnější kritéria testování látek, tedy čím dál nižší přípustné limity [23].

2.3.4.1 Vyhláška č. 26/2001 Sb.

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ze dne 8. ledna 2001 o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích) [52; 53].

K výrobě kosmetických prostředků lze použít pouze látky, které svými vlastnostmi v koncentracích použitých v receptuře výrobku vedou k výrobě takového kosmetického prostředku, který nezpůsobí poškození zdraví fyzických osob [53].

Vyhláška dále stanovuje seznam látek, které kosmetické prostředky nesmí obsahovat a které mohou být v kosmetických prostředcích přítomny jen s omezením [53].

Na obalu kosmetického prostředku musí být ve srozumitelném, čitelném a nesmazatelném provedení uvedeny látky syntetického nebo přírodního původu použité ve složení kosmetického prostředku („*ingredience*“ nebo „*ingredients*“), přičemž přítomnost parfému se označuje slovy „*parfém*“, „*parfum*“ nebo „*perfume*“. Ingredience se uvádí v sestupném pořadí podle hmostnosti v době výroby a názvy musí být uvedeny v českém názvosloví nebo v názvosloví podle INCI. Za ingredience se nepovažují [53]:

- nečistoty v použitých surovinách,
- pomocné technické materiály užívané při výrobě, ale nepřítomné v hotovém výrobku,
- materiály užívané jen v nezbytných množstvích jako rozpouštědla nebo nosiče pro parfémy a aromatické směsi.

O kosmetickém prostředku musí být uchovávány tyto údaje [53; 54]:

- kvalitativní a kvantitativní složení výrobku; u parfémových kompozic a parfémů je nutno uvést název a kódové číslo složení a označení dodavatele,
- fyzikální, chemická a mikrobiologická specifikace surovin a konečného výrobku a kontrolní kritéria kvality a mikrobiologické čistoty u kosmetického výrobku,
- doklady o výrobní metodě vyhovující správné výrobní praxi,
- zhodnocení bezpečnosti finálního výrobku pro zdraví člověka včetně posouzení všeobecného toxikologického profilu ingrediencí, jejich chemické struktury a hladiny expozice,
- jméno, příjmení, adresa a kvalifikace osoby odpovědné za hodnocení bezpečnosti,

- údaje o nežádoucích účincích na fyzické osoby, které plynou z používání kosmetického prostředku,
- důkaz o účincích, které jsou u kosmetického prostředku deklarovány, pokud to povaha účinků nebo výrobku vyžaduje.

2.3.4.2 Vyhláška č. 268/2001 Sb.

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ze dne 12. července 2001, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích) [52; 55].

2.3.4.3 Vyhláška č. 444/2004 Sb.

Vyhláška ze dne 16. července 2004, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích), ve znění vyhlášky č. 268/2001 Sb. [23; 52; 56].

O kosmetickém prostředku musí být uchovávány i tyto další údaje [54; 56]:

- údaje o jakémkoliv zkoušení na zvířatech provedeném výrobcem, jeho zprostředkovateli nebo dodavateli, které má souvislost s vývojem nebo hodnocením bezpečnosti kosmetického prostředku nebo jeho ingrediencí, včetně údajů o jakémkoliv zkoušení na zvířatech provedeném s cílem splnit požadavky právních předpisů nebo opatření zemí, které nejsou členy Evropské unie.

2.3.4.4 Vyhláška č. 126/2005 Sb.

Vyhláška ze dne 16. března 2005, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích), ve znění vyhlášky č. 268/2001 Sb. a vyhlášky č. 444/2004 Sb. [52; 57].

Další látky, které jsou přípustné v kosmetických prostředcích jen s omezením:

- mošusový xylol (CAS 81-15-2), *musk xylene* (1,0 % v parfémech; 0,4 % v toaletních vodách; 0,03 % v ostatních výrobcích),
- mošusový keton (CAS 81-14-1), *musk ketone* (1,4 % v parfémech; 0,56 % v toaletních vodách; 0,042 % v ostatních výrobcích).

2.3.4.5 Vyhláška č. 104/2006 Sb.

Vyhláška ze dne 21. března 2006, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingredience na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích), ve znění vyhlášky č. 268/2001 Sb., vyhlášky č. 444/2004 Sb. a vyhlášky č. 126/2005 Sb. [52; 58].

Týká se výskytu a značení potenciálních alergenů a látek, jež nesmí být součástí kosmetických prostředků. Další látky, které nesmějí být součástí složení kosmetických prostředků (látky zakázané od 31. 3. 2006) jsou [52; 58; 59]:

- olej z kořene costusu, chrpovníku (CAS 8023-88-9), při použití jako vonná přísada,
- 7-ethoxy-4-methylkumarin (CAS 87-05-8), při použití jako vonná přísada,
- hexahydrokumarin (CAS 700-82-3), při použití jako vonná přísada,
- peruánský balzám (CAS 8007-00-9), při použití jako vonná přísada.

Další regulace obsahu látek v kosmetických prostředcích jsou tyto [52; 59]:

- verbena abs. (0,4 %),
- skořicový alkohol (0,8 %),
- skořicový aldehyd (0,1 %),
- skořicový olej (0,2 %),
- isoeugenol (0,02 %),
- hydroxycitronellal (1,0 %),
- kuminový olej (0,4 %),
- hydroxyisohexyl-3-cyklohexen-karboxaldehyd (0,02 %) aj.

2.4 Stanovení přírodních esenciálních olejů a vonných ingrediencí v kosmetických produktech

2.4.1 Analýzy přírodních esenciálních olejů a vonných materiálů

Analýzy přírodních esenciálních olejů jsou děleny následovně [16]:

- Fyzikální měření: – měrná hustota; index lomu; optická otáčivost; rozpustnost v alkoholu aj.
- Chemické analýzy: – číslo kyselosti; esterové číslo; esterové číslo po acetylaci; obsah alkoholů; obsah aldehydů; obsah ketonů aj.
- Analytické metody: – plynová chromatografie (GC); hmotnostní spektrometrie (MS); ultrafialová absorpční spektrometrie (UV spektrometrie); infračervená absorpční spektrometrie (IR spektrometrie); nukleární magnetická rezonance (NMR); vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC); kapalinová chromatografie (LC); chromatografie na tenké vrstvě (TLC) aj.
- Senzorické hodnocení.

Jednotlivé vonné materiály jsou identifikovány dle všeobecně akceptovaných analytických parametrů, jako jsou např. hustota, index lomu, optická otáčivost, bod tání aj. Fyzikálně-chemické konstanty indikují kvalitu esenciálních olejů, jsou důležité při detekci jejich příměsí a znečištění [16; 60].

Kvantitativní i kvalitativní analýzy aromatických látek v původních surovinách, silicích, extraktech, potravinách apod. patří svou komplexností mezi nejobtížnější úkoly analytické a organické chemie. Rozhodující úlohu má špičkové instrumentální vybavení dovolující separaci a identifikaci látek přítomných ve směsi. Způsob izolace stanovované látky závisí zejména na jejím charakteru [61].

Obsah, stejně jako nečistoty, příměsi lze stanovit pomocí chromatografických metod, jako jsou GC, HPLC, CE a spektroskopickými technikami (UV, IR, MS a NMR) [60].

Použití spektroskopických analytických technik, jako UV/VIS spektrometrie, IR spektrometrie a NMR, také poskytuje údaje o kvalitě. Spektroskopické metody, jako IR nebo NIR, se stávají důležitějšími pro rychlé identifikační kontroly. NIR techniky mohou být také využity pro identifikaci jednoduchých a komplexních vonných látek [5; 60].

UV absorpční spektrometire, IR absorpční spektrometrie a ^{1}H, ^{13}C-NMR jsou užitečnými metodami zejména při stanovování struktury. Problémy s přirozeným, botanickým a geografickým původem těchto produktů jsou vyřešeny použitím moderních chromatografických metod (např. separace enantiomerů) a také pomocí spektroskopických analytických technik, jako jsou IRMS a SNIF-NMR [16; 60].

Analýzy těchto látek jsou velmi obtížené, protože jsou složeny až z několika stovek různých součástí. Nejvhodnější jsou pro tento účel separační metody, jako je chromatografie. Plynová chromatografie je všeobecně používána k separaci těkavých sloučenin. Hmotnostní spektrometrie je využívána ke stanovení chemické struktury. MS detektor nabízí velkou citlivost a vyšší selektivitu než jiné detektory [5; 16].

Vonné chemikálie mají obvykle nízký bod varu, a tak je nejrozšířenější technikou v parfumérském průmyslu právě plynová chromatografie, jak s přímým nástřikem, tak i headspace (HS). HS-GC může být použita pro přímou analýzu těkavých látek z rostlin a esenciálních olejů. V mnoha případech bývá pro detekci využíván FID nebo TCD. GC je také používána pro kvantitativní účely [5; 16].

Jednoduchá kolonová plynová chromatografie v kombinaci s FID anebo s MS je běžně využívána při stanovení profilů vonných látek. Pro analýzu komplexních vonných vzorků je používána technika orthogonální dvourozměrné plynové chromatografie (GC×GC). Hmostností spektrometr s kvadrupólovým analyzátorem (qMS) poskytuje vysoce kvalitní hmotnostní spektra [62].

Pro analýzy komplexních směsí je vhodné využít propojené techniky, tak jako GC-MS, GC-FTIR, HPLC-MS, CE-MS, HPLC-NMR a GC×GC [60].

Důležitá je při analýze přírodních esenciálních olejů také optická izomerie. Optické izomery existují v esenciálních olejích buď jednotlivě v D- či L-formě, nebo jako směsi, v nichž jedna z forem existuje ve větším množství než ta druhá. Je důležité sledovat optické otáčivosti ovlivňující vůni. Chirální kolony mohou být využity pro oddělení a kvantifikaci odlišných optických izomerů od stejné chemické sloučeniny [5; 16].

LC a TLC byly již také využity pro kvantitativní anebo kvalitativní účely při analýzách, zejména pro stanovení jak málo těkavých, tak i teplotně nestabilních vonných sloučenin. LC a HPLC jsou používány pro analýzu vysokomolekulárních anebo vysokovroucích sloučenin i tepelně nestabilních látek [5; 16].

Důležitou součástí esenciálních olejů jsou sesquiterpeny, pro jejichž analýzu mohou být využity následující metody: GC, GC-EI-MS, GC-CI-MS, GC-MS/MS, GC-FTIR, GC-UV, GC-AES, ^{13}C-NMR, PY-GC-MS, HPLC, HPLC-TSP, SFE, SFC, SFC-UV. Kombinace GC s MS je nejrozšířenější [10].

Sesquiterpenové laktony je pak možné analyzovat pomocí: HPLC, HPLC-TSP, HPLC-APCI, HPLC-ESI, HPLC-PB, HPLC-NMR, SFC, MEKC, GC, GC-MS, TLC a OPLC. V tomto případě je hlavní volenou metodou HPLC [10].

Stále jsou také používány klasické metody pro přípravu vzorku, jako je destilace a Soxhletova extrakce, ale vzrůstá i využití specifických technik, jako jsou superkritická fluidní extrakce (SFE) a adsorpční techniky, např. mikroextrakce tuhou fází (SPME) a mikroextrakce na magnetickém míchadle (SBSE) využívané k izolaci, separaci a identifikaci aromatických látek [60].

Senzorické metody hodnocení, které využívají čichového a chuťového smyslu jednoho či více expertů, jsou v praxi stále ještě nenahraditelné. Nos a jazyk experta jsou schopny odhalit a rozpoznat i nejjemnější odstíny vůně a chuti. Na druhé straně nejsou metody senzorického hodnocení zcela sjednoceny, proto je senzorické hodnocení vůně a chuti stále diskutovaným problémem. Zvláště obtížné je kvantitativní vyjádření senzorických vjemů, při němž se používají metody matematické statistiky [61].

Také elektronické nosy (chemické senzorické systémy) a „nosy“ trénovaného personálu jsou užitečné při kontrole vonných látek [5; 60].

Plynová chromatografie – olfaktometrie (tzv. „*Sniffing-analýza*“; GC-O) je vynikající metodou pro stanovování komponent, které mají rozsáhlý vliv na vůni esenciálních olejů. Jedna část rozdvojeného konce kolony je propojena s detektorem a druhá umožňuje senzorické zhodnocení plynu. Díky tomu je možné identifikovat aktuální pach každé komponenty při současném monitorování píků v chromatogramu [16].

2.4.1.1 Metody pro stanovení esenciálních olejů a potenciálně alergenních vonných látek

SCCPNFP publikoval přehled potenciálně alergenních vonných substancí (PASs) (SCCPNFP, 1999) a Evropská unie (EU) vydala dodatek k Příloze III Evropské kosmetické direktivy, která předkládá podmínky použití pro 26 vonných substancí (klasifikovaných jako látky způsobující alergické reakce) v kosmetice (Directive 2003/15/EC) [39].

Z výše zmíněných 26 látek je 24 chemicky definovaných těkavých sloučenin, zatímco dvě zbývající jsou přírodní mošusové extrakty a neodpovídají definovaným chemikáliím. Některé ze složek obsažených v těchto přírodních extraktech, jako např. atranol a chloroatranol, byly prokázány jako kožní senzibilizátory. Avšak tyto látky nejsou v mošusech přítomny samotné, nýbrž pocházejí z degradace atranorinu a chloroatranorinu během extrakčního procesu. Nicméně tyto sloučeniny nejsou regulovány jako takové [39].

Metody ke stanovení jednotlivých substancí v současnosti katalogizovaných Evropskou kosmetickou direktivou jako PASs jsou například následující:

- *benzylalkohol* – kvalitativní stanovení pomocí TLC na silikagelu [63]; kvantitativní stanovení – vzorek je extrahován methanolem a množství analytu v extraktu je stanoveno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií [63],
- *cinnamaldehyd* – nejprve derivatizovaný, stanoven pomocí LC-FL (Wisneski a kol., 1984) [5; cit. 64],

- *cinnamyl alkohol* – stanoven za využití LC-FL (Wisneski a kol., 1988) [5; cit. 65] a TLC s ultrafialovou absorpční densitometrií (UAD) (Sherma a Brubaker, 1989) [5; cit. 66],
- *eugenol* – souběžné stanovení eugenolu a jeho derivátů pomocí DRIFTS a GC (Kuo a kol., 2009) [cit. 12],
- *geraniol* – izolace hlavních oxidačních produktů pomocí *flash* chromatografie a preparativní HPLC; identifikace – terpeny jsou všeobecně snadno analyzovatelné pomocí GC-FID; kvantifikace jiných oxidačních produktů než hydroperoxidů pomocí GC-FID; kvantifikace hydroperoxidů v oxidační směsi HPLC-UV (Hagvall, 2007) [cit. 67],
- *isoeugenol* – cis i trans izomery, stanoven kation výměnnou LC s FL detektorem (Wisneski a kol., 1988) [5; cit. 68]; DRIFTS (Kuo a kol., 2009) [cit. 12],
- *kumarin* – kumarin s 6-methylkumarinem, který je také omezen v Příloze III; stanoven LC s UV/VIS detekcí (Bettero a Benassi, 1983) [5; cit. 69]; pomocí GC-ECD (Wisneski, 2001) [5; cit. 70]; souběžné stanovení 6-methylkumarinu a 7-methoxykumarinu v kosmetice za využití trojrozměrné excitačně-emisní maticové (EEM) fluorescence spojené s kalibračními metodami druhého řádu (Nie a kol., 2008) [cit. 71]; detekce a kvantifikaci kumarinu pomocí LC-MS (Jager a kol., 2007, 2008) [cit. 72, 73] a HS–SPME-GC-MS (Jager a kol., 2008) [cit. 73],
- *limonen* – společně s čtyřmi *non*-PASs vonnými chemikáliemi (menton, mentol, karvon a anetol) stanoven pomocí HS-GC-FID (Tavss a kol., 1988) [5; cit. 74],
- *linalool* – oxidační produkty linaloolu (primárními oxidačními produkty jsou hydroperoxidy) byly izolovány *flash* chromatografií a preparativní HPLC a identifikovány pomocí NMR a GC-MS (Sköld a kol., 2004) [cit. 75]; linalool a jeho hlavní oxidační produkty byly kvantifikovány pomocí metod GC a HPLC (Skald a kol., 2004) [cit. 75]; test lokálních lymfatických uzlin (LLNA) byl využit ke zjištění senzibilizujícího potenciálu linaloolu a jeho oxidačních produktů (čistý linalool sám o sobě není senzibilizátorem) (Sköld a kol., 2004) [cit. 75]; společně s pěti dalšími *non*-PASs substancemi (benzyl acetát, allyl heptanoát, undekavertol, 3-fenylethyl isobutyrát, methyldihydrojasmonát) stanoven za využití GC-MS s předchozí extrakcí cílových analytů za použití SPME (Chen a kol., 2006) [5; cit. 76],
- *oakmoss absolut* – identifikace atranolinu a příbuzných potenciálních alergenů pomocí HPLC-MS/MS (Hiserodt, 2000) [cit. 77].

Od chvíle, kdy vešla Direktiva 2003/15/EC v platnost, byly snahy zaměřit se na stanovení všech PASs dohromady. Pro stanovení 24 chemicky definovaných PASs je GC vhodnou technikou využívanou k analýze těkavých sloučenin a nabízející vysokou separační schopnost u komplexních směsí [5; 39].

Přehled dalších metod, které jsou využívány pro analýzu esenciálních olejů, vonných látek a potenciálně alergenních vonných substancí:

- *plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií* (GC-MS):
  (Rastogi, 1995) [cit. 78]; (Rastogi a kol., 1998) [cit. 79]; (Rastogi a kol., 1998) [cit. 80]; (Rastogi, 2000) [cit. 81]; (Marriott a kol., 2001) [cit. 82]; (Rastogi a kol., 2001) [cit. 83]; (Rastogi, 2002) [cit. 84]; (Högnadóttir a Rouseff, 2003) [cit. 85]; (Chaintreau a kol., 2003) [cit. 86]; (Gross, 2004) [39; cit. 87]; (Baier, 2005) [39; cit. 88]; (Leijs a kol., 2005) [cit. 49]; (Tabanca a kol., 2006) [cit. 89]; (David a kol., 2006) [cit. 90],

- *plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií* (GC-MS/MS):
  (Kinani a kol., 2006) [39; cit. 91],
- *mikroextrakce tuhou fází s vysoce rychlostní plynovou chromatografií s TOF-MS* (High-Speed GC-TOF-MS):
  (LECO, 2008) [cit. 92],
- *headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem* (HS-SPME-GC-MS):
  (Jirovetz a kol., 2002) [cit. 93]; (Pellati, 2005) [cit. 94]; (Song a kol., 2007) [cit. 95],
- *plynová chromatografie s kvadrupól hmotnostním spektrometrem* (GC-qMS):
  (Mondello a kol., 2007) [cit. 96],
- *extrakce tuhou fází s rozpouštědlem (solid-phase trapping solvent extraction) s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem* (SPTE-GC-MS):
  (Kim a kol., 2000) [cit. 97],
- *kombinace hydrodestilace se statickou headspace mikroextrakcí kapalnou fází v propojení s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem* (SHD-SHLPME-GC-MS):
  (Heravi a Sereshti, 2007) [cit. 98],
- *gelová permeační chromatografie s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem* (SEC-GC-MS):
  (Niederer a kol., 2006) [cit. 48],
- *plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem* (GC-FID):
  (Rastogi a kol., 1998) [cit. 79]; (Isidorov a kol., 1998) [cit. 99]; (Högnadóttir a Rouseff, 2003) [cit. 85]; (Tabanca a kol., 2006) [cit. 89],
- *extrakce tuhou fází s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem* (SPE-GC-FID):
  (Lukić a kol., 2006) [cit. 100],
- *headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem* (HS-SPME-GC-FID):
  (Jirovetz a kol., 2002) [cit. 93]; (Holt, 2001) [cit. 101];(Bianchi a kol., 2007) [cit. 102],
- *miniaturizované vnitřně chlazené SPME vlákno ve spojení s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem* (SPME-GC-FID):
  (Chen a kol., 2007) [cit. 103],
- *multidimensionální plynová chromatografie* (MDGC):
  (White a kol., 1990) [39; cit. 104]; (Marriott a kol., 2001) [cit. 82]; (David a kol., 2004) [39; cit. 105]; (Dunn a kol., 2006) [cit. 50]; (David a kol., 2006) [cit. 90],
- *orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie* (GC×GC):
  (Liu a Philips, 1991) [39; cit. 106]; (Marriott a kol., 2001) [cit. 82]; (Ong a Marriott, 2002) [39; cit. 107]; (Shellie a Marriott, 2003) [39; cit. 108]; (Blumberg, 2003) [39; cit. 109]; (Dunn a kol., 2006) [cit. 50]; (David a kol., 2006) [cit. 90],
- *orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie s qMS* (GC×GC-qMS):
  (Debonneville a kol., 2004) [cit. 110]; (Debonneville a Chaintreau, 2004) [cit. 111]; (Mondello a kol., 2005) [cit. 62]; (Cordero a kol., 2007) [cit. 112],

- *orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie v kombinaci s* TOF-MS (GC×GC-TOF-MS):
  (Wu a kol., 2004) [cit. 113]; (LECO, 2004), [39; cit. 114]; (Ozel a kol., 2006) [cit. 115],
- *orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie v kombinaci s plamenově ionizačním detektorem* (GC×GC-FID):
  (Shellie a kol., 2004) [cit. 116]; (Cordero a kol., 2007) [cit. 112],
- *kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií* (LC-MS/MS):
  (Bossi a kol., 2004) [39; cit. 117]; (Rastogi a kol., 2004) [39; cit. 118],
- *vysoce účinná kapalinová chromatografie* (HPLC):
  (Lübke a kol., 1995) [cit. 119],
- *vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s plynovou chromatografií* (HPLC-GC):
  (Marriott a kol., 2001) [cit. 82],
- *vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií* (HPLC-MS/MS):
  (Hiserodt a kol., 2000) [cit. 77],
- *rychlá vysoce účinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole* (RP-HPLC-DAD):
  (Villa a kol., 2007) [cit. 120],
- *superkritická fluidní extrakce* (SFE):
  (Pourmortazavi a Hajimirsadeghi, 2007) [cit. 9]; (Marriott a kol., 2001) [cit. 82],
- *senzorická analýza – GC-olfaktometrie* (GC-O):
  (Marriott a kol., 2001) [cit. 82]; (Jirovetz a kol., 2002) [cit. 93]; (Högnadóttir a Rouseff, 2003) [cit. 85]; (Bianchi a kol., 2007) [cit. 102]; (Benzo a kol., 2007) [cit. 121].

V podstatě neexistují oficiální analytické metody na stanovování vonných ingrediencí v kosmetických výrobcích, kromě metody navržené IFRA k určování 24 PASs, jíž je GC-MS kvantifikace potenciálně alergenních vonných látek ve vonných sloučeninách [5; 122].

2.4.2 Stanovení jiných vonných chemikálií v kosmetických produktech

GC je nejpoužívanější analytickou metodou aplikovanou na vonné látky v kosmetice. Rozpracována je též pro analýzu PASs. Jsou ale používány i jiné techniky, a to pro analýzu vonných látek těžko stanovitelných GC díky jejich malé těkavosti anebo termostabilitě [5].

Bylo již publikováno mnoho prací týkajících se stanovení různých vonných látek, jež jsou v současnosti zakázané Evropskou kosmetickou direktivou [5]:

- *bergapten (5-methoxypsoralen) a další laktony* – metoda založená na TLC s fluorimetrickou (FL) detekcí (Wisneski, 1976) [cit. 123],
- *bergapten a citropten* – použita LC-FL (Bettero a Benassi, 1983) [cit. 124],
- *safrol* – karcinogen, určen pomocí LC-FL (Wisneski a kol., 1983) [cit. 125].

Stanovení mošusů vyvolává zvláštní pozornost hlavně od té doby, co byly popsány jejich vedlejší vlivy [5]:

- *syntetický mošus (acetyl ethyl tetramethyl tetralin)* – použita GC-MS (Wisneski a kol., 1982) [cit. 126],
- *mošus ambrett, mošus keton, mosken, mošus tibeten a mošus xylen* – stanoveny pomocí TLC a LC-UV/VIS (Bruze a kol., 1985) [cit. 127]; později pomocí GC v různých kosmetických produktech (Sommer, 1993) [cit. 128],
- *mošus ambrett, mošus keton a mošus xylen* – identifikovány v kolínské vodě, metoda pouze pro kvalitativní stanovení založená na TLC nebo GC-FID nebo také GC-MS (Goh a Kwok, 1986) [cit. 129]; stanovení stejných mošusů pomocí GC-ECD (Porcu a Spanneda, 1988) [cit. 130] a (Wisneski, 2001) [cit. 131],
- *makrocyklické mošusy* – GC-MS (Sommer a Juhl, 2004) [cit. 132].

Dále je možné nalézt práce zaměřující se na stanovení následujících látek [5]:

- *cinnamyl antranilát* – pomocí LC-FL (Demers a kol.,1987) [cit. 133] nebo TLC s fluorescenční denzitometrií (FD) (Sherma a Pilgrim, 1988) [cit. 134],
- *benzyliden aceton* – za využití LC-FL (Yates a Wenninger, 1988) [cit. 135] nebo TLC-UAD (Anderton a Sherma, 1996) [cit. 136],
- *α-jonon* – v zubních pastách, LC-UV/VIS (Trivedi, 1988) [cit. 137],
- *glukonolakton* – v zubních pastách, UV/VIS (Zhang a kol., 1996) [cit. 138],
- *D-mentol a L-mentol* – separace a kvantifikace v kosmetických produktech za použití GC-MS s chirálními kapilárními kolonami (Coleman a kol., 1998) [cit. 139].

2.4.3 Stanovení příbuzných látek v kosmetických produktech

Ftaláty představují skupinu analytů, které mají řadu nežádoucích vlivů asociovaných s jejich expozicí. Neexistuje oficiální analytická metoda zaměřující se na jejich stanovení v kosmetických produktech. Nicméně v literatuře lze nalézt různé metody používané pro jejich stanovení [5]:

- GC-FID, LC-UV/VIS a gravimetrie (Hancock a kol., 1966) [cit. 140],
- GC (Godly a Mortlock, 1973) [cit. 141],
- LC (Koo a Lee, 2004) [cit. 142],
- LC-DAD a GC-FID (Chen a kol., 2005) [cit. 143],
- LC-UV/VIS (Hubinger a Havery, 2006) [cit. 144].

2.5 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie (GC) je vhodná pro analýzu těkavých látek, které je možné převést do plynného stavu. Využívá k dělení směsi látek dynamického systému s plynnou mobilní fází. Složky vzorku se v takovém systému dělí po převedení do plynné fáze. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovaných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí. Používá se pro separaci, identifikaci a stanovení složitějších směsí plynů a těkavých látek a především organických sloučenin s bodem varu menším než cca 400 °C [145; 146; 147].

V GC jsou jednotlivé složky vzorku separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází a jsou postupně vymývány (eluovány) inertním plynem (mobilní fází). Nosný plyn slouží pouze k transportu složek kolonou, sám neinteraguje se separovanými složkami a stacionární fází (nerozpouští se v ní). Složky vycházející z kolony jsou postupně indikovány detektorem a signál odpovídající jejich obsahu, resp. koncentraci v nosném plynu je samočinně registrován jako funkce času nebo objemu [145].

Plynová chromatografie má velmi široké praktické uplatnění v řadě aplikačních oblastí, jsou to např.: analýza životního prostředí, klinická a toxikologická analýza, analýza potravin a kosmetických přípravků, analýza ropných produktů aj. [147].

2.5.1 Instrumentace plynové chromatografie

Zařízení pro plynovou chromatografii se skládá z následujících částí [145; 146]:

- zdroj nosného plynu (mobilní fáze),
- čisticí zařízení,
- regulační systém,
- dávkovač (injektor),
- kolona,
- detektor,
- vyhodnocovací zařízení,
- termostat.

Zdroj nosného plynu (mobilní fáze)

Jako mobilní fáze se používá inertní plyn, jehož úlohou je především transportovat složky vzorku kolonou. Plyn musí být inertní vůči jeho složkám, netoxický a nemá přímý vliv na separaci. Podle zvoleného způsobu detekce separovaných složek se používá vodík, dusík, helium nebo argon [145; 146].

Čisticí zařízení

Čisticí zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů [146].

Regulační systém

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu (mobilní fáze) [146].

Dávkovač (injektor)

Injektor slouží k dávkování analyzovaného vzorku na začátku kolony, převedení vzorku do plynného stavu a vnesení do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase [145; 146].

Dávkování vzorku lze provádět dvěma technikami [145]:

- nad ústí kolony umístěné na konci injektoru – využívá se především pro náplňové kolony,
- přímo na kolonu – využívá se v případě kapilárních kolon.

Dávkování vzorku přímo na kolonu se provádí různými způsoby, nejvíce užívané jsou [145; 146]:

- dávkování s děličem toku (*split injection*),
- dávkování bez děliče toku (*splitless injection*),
- dávkování přímo do kolony (*on column*),
- dávkování programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku.

Kolona

Kolona je část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze. Nastává v ní separace složek. Volba stacionární fáze je rozhodující pro výběr vhodné kolony pro daný vzorek. Důležitá je polarita separovaných složek [146].

Kolony pro plynovou chromatografii jsou [145]:

- náplňové – jedná se o kovové (Al, Cu, Ni, nerezová ocel) nebo skleněné trubice; plněny jsou adsorbenty na bázi silikagelu a aktivního uhlí, molekulovými síty aj.,
- kapilární – jedná se o skleněné, křemenné, plastové nebo kovové papiláry, jejichž vnitřní stěny jsou povlečené stacionární fází nebo kapiláry naplněné stacionární fází v celém svém objemu.

Detektor

Detektor dlouží k detekci látek v nosném plynu (signalizuje jejich přítomnost). Nosný plyn z kolony protéká detektorem, který reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál. Musí mít dostatečnou citlivost a vysokou selektivitu pro stanovované analyty, jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. Umožňuje identifikaci a kvantifikaci separovaných složek. Detektory používané v plynové chromatografii jsou univerzální (např. plamenově ionizační detektor, FID) nebo selektivní (např. detektor elektronového záchytu, ECD). Ve spojení s plynovou chromatografií se stále častěji používají spektrometrické detektory umožňující získat přímou informaci o struktuře separovaných látek. Komerčně dostupný je hmotnostní (MS) a infračervený spektrometrický detektor (IR) [145; 146; 147].

Nejpoužívanější typy detektorů jsou:

- *plamenově ionizační detektor* (*Flame Ionization Detector*, FID) – je univerzálním (nespecifickým) detektorem s hmotnostním průtokem, přímo závisí na rychlosti toku nosného plynu; je charakteristický vysokou citlivostí, s koeficientem linearity rovným jedné se širokým lineárním dynamickým rozahem; linearita závisí na experimentálních podmínkách, zejména na průtoku vodíku a nosného plynu, za příznivých podmínek se blíží jedné; lineární dynamický rozsah je v literatuře uváděn jako 10^7, ve skutečnosti bývá o jeden až dva řády nižší; závislost plochy píku na hmotnosti analyzované složky je tedy lineární v rozsahu asi 0,1 mg až 0,1 ng; má výhodnou mez postřehu pro organické sloučeniny (až 10^{-11} molu); FID měří změny ionizačního proudu vodíko-vzduchového plamene způsobené přítomností analytu; molekuly plynu jsou ionizovány v plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami;

nosný plyn se před vstupem do hořáku mísí s vodíkem, vzduch je přiváděn zvnějšku; přítomnost složky zvýší ionizaci a elektrický proud se zvětší; molekuly organických sloučenin poskytují v plameni radikály, které přechází na ionty, jež zvyšují vodivost plamene a detektorem probíhá proud úměrný koncentraci sloučeniny [14; 145; 146; 148; 149],

- *tepelně vodivostní detektor* (*Thermal Conductivity Detector*, TCD) – univerzální a nedestrukční detektor; nosný plyn proudí přes vlákno žhavené stálým elektrickýcm proudem a ochlazuje je na požadovanou teplotu; přítomnost složky změní tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna a tím jeho teplotu a elektrický odpor; detektor sleduje tepelnou vodivost nosného plynu vyvolanou přítomností separovaných složek analyzované směsi [145; 146],
- *detektor elektronového záchytu* (*Electron Capture Detector,* ECD) – detektor pracuje na principu proporcionálního čítače pro měření intenzity radioaktivního záření; radioaktivní zářič ^{63}Ni svým zářením β (proud rychlých elektronů) ionizuje molekuly dusíku jako nosného plynu a vyvolává ionizační proud; uvolňují se pomalé elektrony, které zachycují elektronegativní atomy složek, a tím snižují ionizační proud; detekovány jsou selektivně látky, které zachycují elektrony za vzniku stabilních iontů [145; 146],
- *hmotnostní spektrometr* (*Mass Spectrometer,* MS) – spojení GC-MS; ionty jsou v MS analyzovány kvadrupólovým analyzátorem, iontovou pastí aj. [145; 146].

Vyhodnocovací zařízení

Vyhodnocovací zařízení zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku (chromatogram) a provádí její vyhodnocení [146].

Termostat

Zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Termostat umožňuje udržovat konstantní teplotu kolony, injektoru a tvorbu teplotního programu pro gradientovou eluci. Vyžadována je teplotní stabilita ± 0,1 °C uvnitř termostatu a možnost změny teploty po 1,0 ± °C za zvolenou časovou jednotku, teplotní rozsah do 450 °C [145; 146].

2.6 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) byla vyvinuta v roce 1990 na Univerzitě Waterloo v kanadském Ontariu týmem profesora Januse Pawliszyna. Je to jednoduchá, rychlá, levná a účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analytu, která při odebírání vzorku nevyžaduje žádné rozpouštědlo ani komplikovanou aparaturu [150; 151].

SPME je metodou bez rozpouštědla sloužící k extrakci analytů ze široké škály matric jejich oddělením ze vzorku do imobilizované stacionární fáze. Prekoncentrační kroky jsou eliminovány extrakcí analytů na vlákno [152].

Principem této metody je expozice malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Analyty jsou sorbovány na SPME vlákně dokud není dosaženo rovnováhy [151].

Na rozdíl od klasických extrakčních metod není analyt extrahován ze vzorku v co nejvyšší koncentraci, ale pouze do dosažení rovnovážného stavu. Z hlediska fyzikálně-chemického je rovnovážný stav SPME techniky závislý na koncentraci analytu ve vzorku a také na typu a tloušťce polymeru, který pokrývá křemenné vlákno. Množství sorbovaného analytu závisí také na distribuční konstantě. Doba extrakce je určována analytem s nejvyšší distribuční konstantou. Distribuční konstanta obecně vzrůstá s rostoucí molekulovou hmotností a bodem varu analytu. Selektivitu extrakčního procesu lze ovlivnit typem polymeru pokrývajícím vlákno. Obecně platí, že těkavé látky vyžadují silnější vrstvu polymeru a slabší vrstva je účinnější pro sorpci středně těkavých analytů [151].

SPME je tedy revoluční postup přípravy vzorků k analýze. Metoda kompletně eliminuje použití organických rozpouštědel, nevyžaduje speciální instrumentaci a může být využita kdekoliv bez potřeby elektřiny či jihého energetického zdroje. Vlákno z taveného křemene pokryté zakotvenou fází je ponořeno do kapalného vzorku nebo umístěno nad kapalný vzorek do prostředí nasyceného těkavými analyty. Po určitou dobu se nechá probíhat sorpce na tuhou fázi. Následuje analytický stupeň, kterým je obvykle plynová chromatografie. Mikroextraktor je ihned umístěn do injektoru plynového chromatografu. Vlákno je ponecháno v dávkovacím zařízení k termické desorpci při teplotách kolem 300 °C a analyty vstupují do chromatografické kolony, kde je provedena separace [146; 153; 154].

Z důvodu mechanické ochrany bývá vlákno zasunuto v duté ocelové jehle a napojeno na ocelový píst. Vzorky pro chromatografii bývají běžně připraveny ve vialkách (zásobních lahvičkách) uzavřených zátkou se septem. Septum se propíchne ocelovou jehlou, z níž se vysune vlákno do roztoku nebo nad jeho hladinu, a nastává sorpce analytu do vrstvy pokrývající vlákno ***(Obr. 1)***. SPME jehla začala být prodávána v roce 1993 firmou SUPELCO (Bellefonte, USA) [146; 153].

Extrakční fáze je permanentně navázána na vláknech vyrobených z různých materiálů. Vlákna mohou být tvořena taveným křemenem, který je chemicky inertní. Extrakční fází je většinou sesítěný organický polymer. Polymerní vrstva je využívána k ochraně vlákna proti přelomení. Vlákna je možné pokrývat čistými kapalnými polymerními fázemi (např. polydimethylsiloxan, PDMS) nebo porézními tuhými fázemi (přesněji porézními tuhými látkami dispergovanými v kapalných polymerních matricích; např. Carboxen/PDMS). Dva nečastěji používané polymery jsou polydimethylsiloxan a polyakrylát. Polydimethylsiloxan se chová jako kapalina, polyakrylát je tuhý. Křemenná vlákna mají typicky průměr 100 až 200 μm a tloušťka filmu dosahuje 10 až 100 μm [155; 156].

Základním krokem u SPME metody je určení času (t_{rov}) potřebného k dosažení rovnováhy analytů mezi extrakční fází, vzorkem a headspace prostorem nad vzorkem. Rovnovážný čas závisí na několika faktorech: podmínky míchání vzorku (rychlejší promíchávání vzorku snižuje t_{rov}); tloušťka extrakční fáze (rovnováha je dosažena rychleji s tenší extrakční fází vlákna); teplota; afinita mezi analytem a extrakční fází vlákna (t_{rov} vzrůstá s afinitou analytu k extrakční fázi). Vývoj SPME analytických metod také zahrnuje určení několika dalších operačních podmínek, např.: pH vzorku a iontové síly, objemu vzorku, extrakční teploty, desorpčního času a teploty [156].

Existují obecně dva extrakční módy SPME a hlavní kritéria pro jeho výběr jsou povaha matrice vzorku, těkavost analytu a jeho afinita k matrici [150; 155; 157]:

- přímé vzorkování (DI extrakce) – při přímé extrakci je vlákno s extrakční vrstvou vloženo do vzorku a analyty jsou extrahovány přímo z matrice vzorku,
- headspace uspořádání (HS extrakce) – vzorkování při headspace chrání vlákno před poškozením matricí; problémem může být velmi vysoké či nízké pH, velké molekuly (např. proteiny) atd.; headspace vzorkování také umožňuje analýzu pevných vzorků; analyty jsou extrahovány z matrice nepřímo; těkavější sloučeniny ve vyšší koncentraci jsou extrahovány rychleji než méně těkavé látky; tento mód je preferován pro těkavé sloučeniny: těkavé organické sloučeniny (VOCs), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), benzen, toluen, ethylbenzen, xylen (BTEX) aj.; HS-SPME poskytuje čistější extrakty, větší selektivitu a delší životnost vlákna.

SPME se ukázala jako velice citlivá metoda pro headspace analýzu (HS) a byla doporučena pro kvantitativní analýzu chuťových a vonných sloučenin. Využití HS-SPME může redukovat vlivy matrice a vzájemné působení složek ve vzorku. HS-SPME je založena na dosažení rovnováhy analytů mezi třemi fázemi – extrakční vrstvou na vlákně, headspace prostorem nad vzorkem a samotným vzorkem. Navíc afinita analytů pro všechny tři fáze podmiňuje extrakční výtěžek.Ve většině případů je časově limitujícím krokem transfer analytů ze vzorku do headspace. Limitujícím krokem může být u SPME i difúze analytů v systému [152; 157].

SPME má oproti tradičním preseparačním technikám několik důležitých výhod [155]:

- absence rozpouštědla je v SPME důležitým rysem; separace je rychlejší a šetrnější k životnímu prostředí,
- další důležitou vlastností je malá velikost využívaného zařízení; je možné analyzovat i velmi malé objekty za použití miniaturních vláken, stejně jako jednotlivé rostliny nebo dokonce i jednotlivé buňky,
- citlivost a limit stanovení je srovnatelný s technikami, které spoléhají na kapalinovou extrakci; i když je z matrice vyextrahováno jen malé množství analytu, veškerý je přemístěn do analytického zařízení, to je rozdíl oproti kapalinové extrakci, kde se většina analytu dostane do organické fáze, ale jen malé množství je následně přeneseno do přístroje.

Významně jsou zkráceny časy potřebné pro analýzy vzorků. Kombinovány jsou totiž operace vzorkování, extrakce, zakoncentrování a dávkování do jednoho kroku. Volbou vhodného typu polymeru a jeho tloušťky je možné dosáhnout maximálního výtěžku a významného zlepšení sorpční selektivity. Další optimalizaci je možné provést přidáním elektrolytu do vzorku, úpravou pH nebo vzorkováním z prostoru headspace [151; 158].

Metoda SPME umožňuje při zachování konstantních podmínek vzorkování dosáhnout vysoké přesnosti a správnosti. Je třeba zajistit především shodnost v délce doby vzorkování, udržovat konstantní velikost vialek, velikost vzorku a při vzorkování s ponořením dodržovat stejnou hloubku ponoru vlákna do vzorku [151].

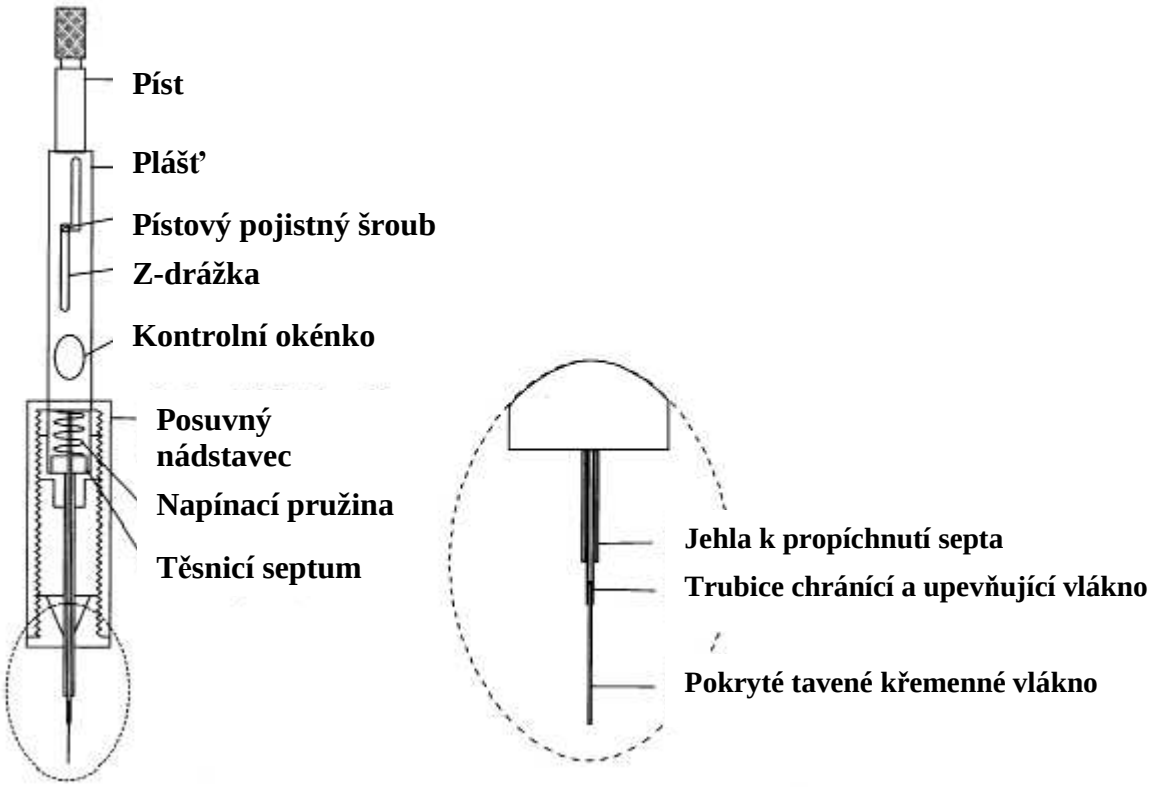
Mezi její výhody tedy především patří rychlost, kompatibilita s metodami koncového stanovení (plynová nebo kapalinová chromatografie), spektrum použitelných analytů a matric, selektivita, reprodukovatelnost, nízké náklady a díky kompaktním rozměrům také použití in-situ [159; 160; 161].

Techniku SPME lze používat jak pro orientační analytická stanovení, tak s interním standardem pro vysoce přesné a reprodukovatelné kvantitavní analýzy. Úspěšné použití SPME je v prvé řadě závislé na správné volbě vhodného vlákna. Účinná extrakce a následná desorpce z SPME vlákna závisí na následujících faktorech [151]:

- molekulová hmotnost,
- tvar molekuly,
- bod varu a tenze par analytu,
- polarita analytu a vlákna,
- funkční skupiny v molekule analytu,
- koncentrační rozsah pro stanovení analytu a typ detektoru.

Metoda je použitelná v kombinaci s náplňovými i kapilárními kolonami GC i s LC. Lze ji použít ve spojení s GC-MS. Poskytuje lineární výsledky v širokém koncentračním rozsahu. Volbou vhodného typu vlákna je možné dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů. V GC závisí desorpce analytu z SPME vlákna na bodu varu analytu, tloušťce polymeru a teplotě dávkovače [151].

SPME metoda byla primárně vyvinuta pro kvantitativní analýzu cílových analytů v relativně čistých vzorcích a pro environmentální analýzu se zaměřením na vodné matrice. Je ji možno využít k analýze všech typů vzorků (plynů, kapalin i tuhých látek). Analyty mohou být těkavé, semi-těkavé a dokonce i netěkavé organické i anorganické látky. SPME se ukázala jako překvapivě všestranná metoda. Výzkumníci v řadě odvětví, např. v životním prostředí, potravinářství, farmacii a analýze přírodních produktů, ji už využili k řadě složitých analýz. HS-SPME s GC separací může být využita i k extrakci a měření těkavých a polotěkavých analytů v biologických tekutinách a materiálech, jako je např. moč, krev, výkaly, mateřské mléko, vlasy, dech a sliny [155; 162; 163].



Obr. 1 *Schéma prvního komerčního SPME vlákna od firmy Supelco* [164]

2.7 Validace analytické metody

Validace je pojem, který se váže k analytickému systému. Analytický systém z hlediska metodologického zahrnuje analytickou techniku, charakterizaci metody a analytického postupu a podrobný popis postupu, návod. Do analytického systému patří nejenom metodika vzorkování, ale i postupy vyhodnocování analytických výsledků [165].

Validace je proces, při němž se určuje vhodnost použití daného analytického systému pro získání relevantních dat. Tedy proces ujištění, že analytická metoda nebo postup jsou vhodné pro zamýšlený účel. Validace metody pomocí laboratorní studie zjišťuje, že metoda splňuje požadavky pro zamýšlené analytické použití. Při validaci posuzujeme, zda jsou parametry metody (postupu) srovnatelné s požadavky na analytická data – výsledky. Hledán je tedy určitý vztah mezi požadavky na výsledek a vlastnostmi metody [165; 166].

Vlastnosti metody se vyjadřují v pojmech charakteristik analytického měřicího procesu (validační parametry) [166; 167; 168]:

- přesnost,
- správnost a pravdivost,
- měřicí rozsah,
- mez detekce,
- linearita,
- kritéria vnitřní kontroly kvality,
- mez stanovitelnosti,
- selektivita a specifičnost,
- citlivost,
- robustnost,
- návaznost a nejistota,
- diagnostická specifičnost a citlivost.

Výběr validačních parametrů je základním kritériem jak získat dostatek údajů, aby bylo možno posoudit, zda metoda či systém jsou vhodné pro zamýšlený účel [167].

2.7.1 Vybrané metrologické charakteristiky (validované parametry) analytické metody

Při validaci analytické metody je kladena tato otázka: Jaké jsou klíčové parametry zkušební metody a jsou tyto požadavky v souladu s požadavky na její použití? [165].

Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, podle téhož definovaného pracovního postupu, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Je vlastností metody, ne výsledku [145; 166; 169].

Mez detekce (Limit of Detection, LOD)

Mez detekce určitého analytického postupu je definována jako nejnižší koncentrace nebo množství analytu ve vzorku, které může být detekováno (které poskytuje analytický signál), nikoliv však nezbytně stanovena jako exaktní hodnota. Je obvykle stanovována opakovanou analýzou alikvotního podílu slepého pokusu [145; 165; 166; 170].

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U separačních metod je používána k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu [171].

Mez stanovitelnosti (Limit of Quantitation, LOQ)

Mez stanovitelnosti odpovídá nejnižší koncentraci nebo množství analytu, která může být kvantitativně stanovena s přijatelnou přesností a správností za uvedených podmínek zkoušky. Obvykle je to nejnižší bod kalibrační křivky (při vyloučení slepého pokusu) [165; 166; 170].

Obecně je mez stanovitelnosti rovna hodnotě y_1, tj. prvnímu bodu kalibračního modelu a její odpovídající hodnotě x_1. U separačních metod je používána k výpočtu meze stanovitelnosti velikost hodnoty signálu slepého pokusu [171].

Linearita

Linearita definuje schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné koncentraci (obsahu) analytu. Je výhodné, je-li metoda lineární v celém měřicím rozsahu [165; 166].

2.7.2 Vybrané statistické parametry pro vyhodnocení naměřených dat

Pro vyhodnocení naměřených dat byly vybrány tyto statistické parametry:

Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech hodnot vydělených jejich počtem [165; 172]:

$$\bar{x} = (1/n)(x_1 + x_2 + ... + x_n) = (1/n)\sum_{i=1}^{n} x_i \qquad (1).$$

Směrodatná odchylka

K výpočtu směrodatné odchylky lze využít následujícího vztahu [165; 172]:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (2),$$

kde n je počet nezávislých měření, x_i příslušná individuální hodnota a $\bar{x}$ je průměr souboru daného měření.

Uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřena veličina x, a charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i kolem aritmetického průměru. Směrodatná odchylka je mírou přesnosti série paralelních výsledků [165; 172].

Relativní směrodatná odchylka

Udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru. Uvádí se v procentech a je definována takto [172; 173]:

$$s_r = \frac{s}{x} 100 \ [\%] \qquad (3).$$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na metodiku pro stanovení vybraných zástupců alergenních vonných látek (SPME-GC-FID), na validaci metody a její ověření na spektru reálných vzorků kosmetických přípravků.

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

V rámci experimentální části bylo pracováno s následujícími chemikáliemi ***(Tab. 6)***:

Tab. 6 *Seznam použitých chemikálií*

Název chemikálie	**Čistota**	**Výrobce**
α-Amylcinnamaldehyd, směs cis a trans	97,0 %	Sigma-Aldrich
Anýzalkohol	98,0 %	Sigma-Aldrich
Benzylsalicylát	≥ 99,0 %	Fluka analytical
Cinnamaldehyd	≥ 93,0 %	SAFC Supply Solutions
Citral, směs cis a trans	95,0 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Citronellol	96,0 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Eugenol	99,0 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Geraniol	97,0 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
α-Hexylcinnamaldehyd	≥ 95,0 %	SAFC Supply Solutions
7-Hydroxycitronellal	≥ 95,0 %	Fluka analytical
Isoeugenol, směs cis a trans	98,0+ %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Limonen	97,0 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Linalool	97,0 %	Alfa Aesar GmbH & Co KG
Methyl-2-oktynoát	99,0 %	Sigma-Aldrich
Ethanol	96,0 %	Lach-Ner
Heptan	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich

3.1.2 Plyny

Pro GC analýzu byly použity následující plyny ***(Tab. 7)***:

Tab. 7 *Seznam použitých plynů*

Název plynu	**Popis**
Dusík	SIAD tlaková láhev typ FMD 302-14; 5,0 bar
Vodík	SIAD tlaková láhev typ FMD 500-14; 5,5 bar
Vzduch	SIAD tlaková láhev typ FMD 500-14; 5,0 bar

Pozn.: 1 bar = 100 000 Pa.

3.1.3 Přístroje a pracovní pomůcky

Pro experimentální část této diplomové práce bylo využito následující přístrojové vybavení a pracovní pomůcky ***(Tab. 8; Tab. 9)***:

Tab. 8 *Seznam použitých přístrojů*

Název přístroje	**Popis**
Plynový chromatograf TRACE GC 2000 (ThermoQuest Italia S.p.A.)	plamenově ionizační detektor (FID); *split/splitless* injektor; kapilární kolona DB-WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5 µm)
Vodní lázeň	MLW typ U2C; Julabo typ TW 12
Analytické digitální váhy	A&D Instruments LTD typ GR-202-EC, Helago
Chladnička – mraznička	Amica model AD 250
Počítač	Intel Celeron CPU, systém Microsoft Windows XP Professional verze 2002, program Chrom-Card

Tab. 9 *Seznam použitých pracovních pomůcek*

Název pracovní pomůcky	**Popis**
SPME vlákno SUPELCO	stacionární fáze CAR^{TM}/PDMS, tloušťka 85,0 µm
Automatické mikropipety a špičky	Labsystems Finnpipette 0,2–2,0 µl; Gilson Pipetman 2,0–20,0 µl; Biohit Proline Plus 0,1–3,0 µl; Biohit Proline 10,0–100,0 µl; Biohit Proline 100,0–1000,0 µl;
Vialky se šroubovacími uzávěry a septy	objem 4 ml
Ostatní pomůcky	držáky, stojan, kádinky, lžíce, nůžky, parafilm

3.2 Podmínky GC-FID

Podmínky plynového chromatografu s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) jsou uvedeny v ***Tab. 10***:

Tab. 10 *Popis podmínek GC-FID*

GC-FID	**Popis**
Kapilární kolona	DB-WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5 µm) s teplotními limity od 20 °C do 240 °C (250 °C)
Teplotní program	40 ºC (1 min) → 200 ºC (9 min), rychlost ohřevu 4 ºC·min^{-1}, celková doba analýzy 50 min
Průtok nosného plynu	dusík s konstantním průtokem 0,9 ml·min^{-1}
Injektor	pravý injektor, 250 ºC, mód CT *splitless* s konstantní teplotou v celém injektoru
Detektor	pravý plamenově ionizační detektor (FID), 220 ºC, průtok vzduchu 350 ml·min^{-1}, průtok vodíku 35 ml·min^{-1}, make-up dusíku 30 ml·min^{-1}

3.3 Optimalizované extrakční podmínky SPME metody

V předchozích diplomových pracích, na něž tato práce navazuje a které rozvíjí, byly stanoveny následující optimální extrakční podmínky SPME metody ***(Tab. 11)*** [174; 175]:

Tab. 11 *Optimalizované extrakční podmínky SPME metody*

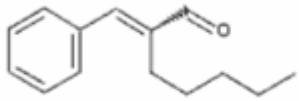
Doba dosažení rovnováhy	20 minut
Doba extrakce	30 minut
Extrakční teplota	35 ºC

Výše zmíněné stanovené optimální extrakční podmínky byly převzaty a aplikovány při experimentální části této diplomové práce.

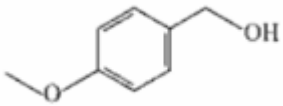
3.4 Přehled vlastností standardů vybraných alergenních vonných látek

V rámci této diplomové práce bylo proměřeno celkem čtrnáct vybraných standardů alergenních vonných látek, přičemž vlastní experimentální část byla zaměřena na sedm z nich ***(Tab. 12–18)***. Ostatních sedm ***(Příloha I: Tab. I–VII)*** bylo analyzováno pouze za účelem identifikace, tj. zjištění retenčních časů odpovídajících příslušným látkám; tyto látky byly předmětem předchozích diplomových prací [174; 175].

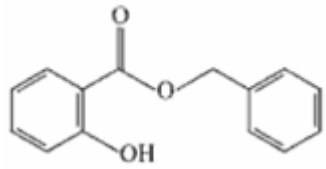
Tab. 12 *Vlastnosti α-Amylcinnamaldehydu* [31; 41; 61; 176; 177; 178; 179]

Název podle INCI	***Amyl cinnamal***	
Struktura		
Synonyma	α-Amylcinnamaldehyd; amylcinnamaldehyde; skořicový α-amylaldehyd; jasminal; jasmínový aldehyd; heptanal, 2-(phenylmethylene); α-pentyl skořicový aldehyd; α-n-amyl-β-phenyl-acrolein; α-amylzimtaldehyd; 2-(fenylmethylen)-heptanal; 2-n-amyl-3-phenyl-propen-2-al; 2-benzylidenheptanal; α-amylcinnamaldehyde.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{14}H_{18}O$
	CAS č.	122-40-7
	EC č.	204-541-5
	Mol. hmotnost	202,29 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	žlutá, čirá, viskózní kapalina; voní typicky jasmínově až liliově
	Bod varu	287–290 ºC
	Bod vzplanutí	113 °C
	Hustota (ρ)	0,970 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný v ethanolu a v olejích
	Rozpustnost v ethanolu (L_{80})	1:6
Výroba	kondenzací benzaldehydu s heptanalem; může být součástí řady syntetických esenciálních olejů, např. syntetického jasmínového oleje; syntetický, nelze jej nalézt v přírodě	
Výskyt a použití	α-Amylcinnamaldehyd (aldehyd) se vyskytuje v mnoha silicích květů, zvláště v silici z jasmínových květů. Poskytuje velmi přirozenou „jasmínovou“ vůni. Využívá se do jasmínových a mnoha dalších květinových kompozic a do některých aromat. Pro svou přirozenou jasmínovou vůni je používán k parfemaci různých výrobků chemického a potravinářského průmyslu, např: • v kosmetice, nejčastěji v mýdlech, • v potravinářství (ke zlepšení nebo zvýraznění chuti), • v čisticích prostředcích a dalších výrobcích chemického průmyslu.	

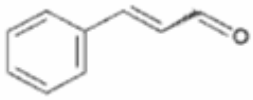
Tab. 13 *Vlastnosti Anýzalkoholu* [31; 41; 61; 176; 177]

Název podle INCI	***Anise alcohol***	
Struktura		
Synonyma	Anýzalkohol; methoxybenzyl alkohol; benzenemethanol, 4-methoxy(4-methoxyphenyl)methanol; 4-methoxybenzyl alcohol; p-methoxybenzyl alkohol; p-anisyl alcohol; anisyl alcohol; 4-methoxybenzene methanol.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_8H_{10}O_2$
	CAS č.	105-13-5
	EC č.	203-273-6
	Mol. hmotnost	138,16 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá až nažloutlá kapalná nebo tuhá látka, výjimečně pevná; květinová vůně
	Bod tání	22–25 °C
	Bod varu	259 °C
	Bod vzplanutí	113 °C
	Hustota (ρ_{25})	1,113 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný v benzylalkoholu, nerozpustný v parafínových olejích a ve vodě
	Rozpustnost v ethanolu (L_{50})	1:1
Výroba	redukcí anýzaldehydu; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Anýzalkohol (alkohol) se vyskytuje v přírodě např. v anýzových semínkách, v květech hyacintů, v medu, ve vanilkových luscích a v bourbonské whiskey. Je součástí vůní anýzu, květů jabloní, meruněk, banánů, karafiátů, černého rybízu, třešní, hroznů aj. Nachází se především v kosmetických výrobcích běžného použití, ale i jako součást drahých parfémů. Používá se do květinových kompozic, jako je šeřík, mimóza apod., také do aromat typu broskev, fíky, kakao, vanilka aj. Jedná se o často používanou přísadu vonných směsí, např. v: • krémech, pudrech aj., • detergentech, • vonných svíčkách, • šamponech, vlasových sprejích a tužidlech, • vodách po holení a parfémech aj.	

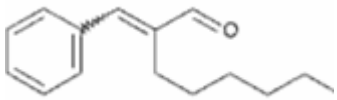
Tab. 14 *Vlastnosti Benzylsalicylátu* [31; 41; 61; 176; 177]

Název podle INCI	***Benzyl salicylate***	
Struktura		
Synonyma	Benzylsalicylát; benzyl-2-hydroxybenzoate; benzyl ester kyseliny salicylové; phenylmethyl ester 2-hydroxybenzoic acid; benzyl-2-hydroxybenzoát; salicyl acid benzyl ester; salicyläurebenzylester.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{14}H_{12}O_3$
	CAS č.	118-58-1
	EC č.	204-262-9
	Mol. hmotnost	228,24 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá, čirá, kapalná nebo tuhá látka; slabá balzamická vůně a ovocná chuť
	Bod varu	168–170 ºC při 7 hPa
	Bod vzplanutí	180 °C
	Hustota (ρ)	1,180 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	málo rozpustný ve vodě, mísitelný s ethanolem a s etherem
	Rozpustnost v ethanolu (L_{90})	1:9
Výroba	syntetická nebo přírodní vonná látka	
Výskyt a použití	Benzyl salicylát (ester) – organické rozpouštědlo příjemné vůně; slouží především jako fixátor pro různé vonné látky, tedy fixátor do parfémových kompozic a do některých aromat (např. rybízové aroma). Může být přítomen v parfémech, aromatizovaných kosmetických přípravcích, ale i v jiných parfémovaných roztocích. Hlavně se nachází v samoopalovacích krémech a mlécích; slouží jako hlavní rozpouštědlo pro vonné látky a silice. Organický filtr pro UV záření, proto se s ním lze setkat v levných, ochranných slunečních přípravcích nebo v prostředcích chránících předměty před UV zářením. Má antipyretický-analgetický účinek, a proto může být přítomen i v některých léčivech. Nachází se také v některých rostlinách (karafiáty, hvozdíky aj.).	

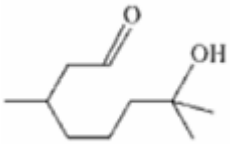
Tab. 15 *Vlastnosti Cinnamaldehydu* [31; 41; 61; 176; 177; 178; 179; 180]

Název podle INCI	***Cinnamal***	
Struktura		
Synonyma	Cinnamaldehyd; cinnamic aldehyde; skořicový aldehyd; trans-3-phenyl-2-propenal; β-phenylacrolein; 3-fenylprop-2-enal; 3-phenyl-2-propenal; fenyl-2-propenal.	
Identifikace látky	**Vzorec**	C_9H_8O
	CAS č.	104-55-2
	EC č.	203-213-9
	Mol. hmotnost	132,16 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	žlutá až nazelenalá kapalina; skořicová vůně i chuť
	Bod varu	248 ºC
	Bod vzplanutí	71 °C
	Hustota (ρ)	1,048 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný ve vodě a v ethanolu, mísitelný s etherem, s chloroformem a s olejem
	Rozpustnost v ethanolu (L_{60})	1:5
Výroba	syntetizován z benzaldehydu a acetaldehydu; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Cinnamaldehyd (aldehyd) je součásti mnoha éterických rostlinných olejů, např. levandulového, hyacintového a dalších. Je přítomen také v olejích z listů čajovníku a vinné révy. Ve velké míře je obsažen v kůře skořicovníku a v cassiovém oleji. V přírodě je složkou skořicových silic, ale je obsažen také v pačulové a myrhové silici. Používá se v potravinářském průmyslu a je přítomen i v mnoha kořenicích směsích. Nejvíce se používá do aromat. Může být přítomen v mnoha výrobcích, např.: • v kosmetice, • v zubních pastách a ústních vodách pro zlepšení nebo zvýraznění chuti, • v čisticích prostředcích a dalších výrobcích chemického průmyslu, např. v aviválžních prostředcích, • v potravinářství, např. v kořenicích směsích, žvýkačkách aj.	

Tab. 16 *Vlastnosti α-Hexylcinnamaldehydu* [31; 41; 61; 176; 177; 178]

Název podle INCI	***Hexyl cinnamal***	
Struktura		
Synonyma	α-Hexylcinnamaldehyd; hexyl cinnamic aldehyde; 2-benzylidenoktanal; α-n-hexyl-β-phenyl acrolein; caproaldehyde; α-hexylcinnamaldehyde; 2-hexyl-3-fenyl-2-propenal; octanal, 2-(phenylmethylene); HCA.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{15}H_{20}O$
	CAS č.	101-86-0
	EC č.	202-983-3
	Mol. hmotnost	216,33 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá, čirá až nažloutlá kapalina; aromatický nenasycený aldehyd chemicky blízký α-amyl skořicovému aldehydu, ale s jemnější, více květinovou jasmínovou vůní delikátnějšího charakteru
	Bod varu	174–176 ºC
	Bod vzplanutí	113 °C
	Hustota (ρ)	0,953 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný ve vodě a v ethanolu, mísitelný s etherem, s chloroformem a s olejem
	Rozpustnost v ethanolu (L_{90})	1:1
Výroba	kondenzací benzaldehydu s oktanalem; syntetický	
Výskyt a použití	α-Hexylcinnamaldehyd (aldehyd) je přírodní jasmínová aromatická látka, která se získává z rychle rostoucí liány domovem v Číně, Indii a na Srí Lance. Je pro svou příjemnou vůni, ale hlavně cenovou dostupnost, často používán do parfémovaných výrobků všeho druhu, hlavně v kosmetice. Tato vonná látka je široce používána v kosmetice a v mnoha parfémovaných výrobcích, jako jsou např.: • antiperspiranty, pěny do koupele, deodoranty, mýdla, šampony aj., • v čisticích prostředcích a dalších výrobcích chemického průmyslu, např. v avivážních prostředcích, • ke korekci vůně detergentů.	

Tab. 17 *Vlastnosti 7-Hydroxycitronellalu* [31; 41; 61; 176; 177; 178; 179]

Název podle INCI	***Hydroxycitronellal***	
Struktura		
Synonyma	7-Hydroxycitronellal; 3,7-dimethyl-7-hydroxyoktanal; 3,7-dimethyl-7-hydroxyoctanal; 7-hydroxy-3,7-dimethyloctan-1-al; laurine.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{20}O_2$
	CAS č.	107-75-5
	EC č.	203-518-7
	Mol. hmotnost	172,26 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá viskózní kapalina; jemná, sladká konvalinková až liliová vůně
	Bod varu	257 ºC při 1,1013 hPa
	Hustota (ρ)	0,920 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost v ethanolu (L_{50})	1:1
Výroba	hydratací citronellalu; syntetická květinová vůně, kterou nelze nalézt v přírodě	
Výskyt a použití	Hydroxycitronellal (aldehyd) je používán do mnoha květinových parfémových kompozic, zejména typu konvalinka, lípa, lilie, cyklámen a magnólie. Také je využíván do některých aromat (např. lípa, med a v řadě dalších). Pro své aromatické vlastnosti se používá ke korekci vůní např.: • v kosmetice (kolínské vody, parfémy, vody po holení, mýdla aj.), především denního použití, • jako zesilující součást již parfémovaných výrobků, • v čisticích prostředcích v domácnosti, • v insekticidech a v osvěžovačích vzduchu aj.	

Tab. 18 *Vlastnosti Methyl 2-oktynoátu* [31; 41; 61; 176; 177; 178]

Název podle INCI	***Methyl 2-octynoate***	
Struktura		
Synonyma	Methyl-2-oktynoát; methyl heptin karbonát; methyl heptine carbonate; methyl ester 2-octynoic acid; methyl pentyl acetylen ecarboxylate; 2-octynoic acid, methyl ester; methyl oct-2-yonate; methyl 2-octinate; methyl hept-1-yne-1-carboylate; methyl-okt-2-ynoát; methyl 2-oktinoát; folione.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_9H_{14}O_2$
	CAS č.	111-12-6
	EC č.	203-836-6
	Mol. hmotnost	154,21 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá nebo lehce nažloutlá, čirá kapalina; vůní připomíná fialkové listy
	Bod varu	217–220 ºC
	Bod vzplanutí	89 °C
	Hustota (ρ)	0,924 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný v alkoholu, dipropylen glykolu a v olejích, nerozpustný ve vodě a glycerinu
	Rozpustnost v ethanolu (L_{70})	1:5
Výroba	synteticky vyrobená vonná látka, v přírodě se nevyskytuje	
Výskyt a použití	Methyl-2-oktynoát (ester) je velmi dobře mísitelný s ostatními vonnými substancemi, proto se často používá jako součást vůně různých kosmetických výrobků (např. banán, jasmín až zemitý humus aj.). Vzhledem k tomu, že je častou složkou zcela rozdílných vůní, je obtížné specifikovat nějakou skupinu kosmetických výrobků, kde by se vyskytovala tato látka nejčastěji. Methyl-2-oktynoát může být přítomen v mnoha parfémovaných výrobcích. Využívá se do květinových a zelených fantazií a také do aromat (např. víno, jahoda aj.).	

3.5 Reálné vzorky kosmetických přípravků

Metodika stanovení (SPME-GC-FID) vybraných alergenních vonných látek byla ověřena na spektru náhodně vybraných reálných vzorků kosmetických přípravků zakoupených v běžné obchodní síti ***(Tab. 19)***.

Tab. 19 *Analyzované kosmetické přípravky*

Název kosmetického přípravku	**Popis kosmetického přípravku Výrobce**	**Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku**
Adidas Natural Vitality	deodorant body fragrance; COTY, vyrobeno ve Španělsku	Citronellol, Geraniol, Hexylcinnamal, Linalool
ALPA s hřebíčkem	bylinný gel; ALPA, s.r.o., Velké Meziříčí, ČR	Cinnamal, Citral, Eugenol, Limonen, Linalool
Aviril s azulenem	dětský olej; ALPA, a.s., Velké Meziříčí, ČR	Citronellol, Geraniol, Hydroxycitronellal, Limonen, Linalool
Davidoff Cool Water Woman	hydratující tělové mléko; Zino Davidoff S.A., vyrobeno v Monaku	Citral, Citronellol, Geraniol, Limonen, Linalool
Dixi březový šampón	šampón pro normální vlasy s přírodní březovou šťávou; de Miclén, a.s., Levice, SR	Amylcinnamal, Citral, Citronellol, Geraniol, Limonen, Linalool
Dove Beauty Care Shower Fresh Touch	sprchový gel Svěží dotek; Uniliver UK	Citronellol, Hexylcinnamal, Limonen, Linalool
Dove Original Deodorant	deodorant, 0 % alkoholu; Uniliver UK	Citronellol, Eugenol, Geraniol, Hexylcinnamal, Linalool
Gillette Shave Gel Satin Care Avocado Twist	dámský gel na holení; Procter & Gamble UK	Hexylcinnamal, Limonen, Linalool
LUNA kopřivová	vlasová voda bylinná; ALPA, a.s., Velké Meziříčí, ČR	Citral, Citronellol, Geraniol, Hexylcinnamal, Limonen, Linalool
Miris hand creme	krém na ruce s glycerinem a aloe; vyrobeno v Polsku pro Plus – Discount spol. s.r.o.	Citronellol, Hexylcinnamal, Limonen, Linalool

3.6 Pracovní postupy

3.6.1 Příprava vzorků standardů alergenních vonných látek

Jednotlivé standardy byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle v určitém poměru a vždy 1 ml roztoku byl převeden do vialky následně uzavřené šroubovacím uzávěrem s plynotěsným septem ***(Tab.20; Tab. 21)***.

Tab. 20 *Seznam standardů alergenních vonných látek I*

Název standardu alergenní vonné látky
α-Amylcinnamaldehyd, směs cis a trans
Anýzalkohol
Benzylsalicylát
Cinnamaldehyd
α-Hexylcinnamaldehyd
7-Hydroxycitronellal
Methyl-2-oktynoát

Tab. 21 *Seznam standardů alergenních vonných látek II*

Název standardu alergenní vonné látky
Citral, směs cis a trans
Citronellol
Eugenol
Geraniol
Isoeugenol, směs cis a trans
Limonen
Linalool

3.6.2 Sorpce a desorpce analytů

Uzavřená vialka s roztokem (standard rozpuštěný v příslušném rozpouštědle, popřípadě směs standardů) byla umístěna do vodní lázně vytemperované na teplotu 35 ºC (extrakční teplota). Doba dosažení rovnováhy mezi roztokem a headspace prostorem byla 20 min. Po uběhnutí této doby byla do vialky přes předpíchnuté plynotěsné septum umístěna jehla SPME extraktoru, jenž byl uchycen v držáku na stojanu. Následně bylo vysunuto vlákno s extrakční vrstvou do headspace prostoru tak, aby nebylo v kontaktu s roztokem a se stěnami vialky. Doba extrakce byla 30 min. Po jejím uplynutí bylo vlákno vtaženo zpět do ochranné jehly, SPME extraktor byl vyjmut z vialky s roztokem a ihned přemístěn do injektoru plynového chromatografu, v němž došlo k tepelné desorpci nasorbovaných látek z extrakční vrstvy vlákna vysunutého z ochranné jehly extraktoru. Doba desorpce byla 20 min při teplotě 250 ºC.

3.6.3 Identifikace standardů alergenních vonných látek

Pro identifikaci vybraných standardů alergenních vonných látek byla použita metoda plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Celková doba analýzy byla u všech stanovovaných analytů 50 min. Standardy byly identifikovány nejprve individuálně a poté i ve směsích A, B a C ***(Tab. 22–24)***.

Tab. 22 *Směs A*

Název standardu alergenní vonné látky
α-Amylcinnamaldehyd, směs cis a trans
α-Hexylcinnamaldehyd
7-Hydroxycitronellal

Tab. 23 *Směs B*

Název standardu alergenní vonné látky
Cinnamaldehyd
Methyl-2-oktynoát

Tab. 24 *Směs C*

Název standardu alergenní vonné látky
Citral, směs cis a trans
Citronellol
Eugenol
Geraniol
Isoeugenol, směs cis a trans
Limonen
Linalool

3.6.4 Stanovení opakovatelnosti

Za účelem stanovení opakovatelnosti byly vybrané standardy alergenních vonných látek namíchány do dvou směsí: Cinnamaldehyd, Methyl-2-oktynoát a 7-Hydroxycitronellal v jedné směsi; α-Amylcinnamaldehyd a α-Hexylcinnamaldehyd v druhé směsi. Samostatně byl analyzován pouze Anýzalkohol. Vzorky byly proměřovány pětkrát stejným způsobem, přičemž byl před každým měřením namíchán vzorek nový.

3.6.5 Stanovení linearity

Ke stanovení linearity bylo u jednotlivých vybraných standardů alergenních vonných látek proměřováno minimálně pět vzorků v různých koncentračních rozmezích.

3.6.6 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

S cílem zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti byly vybrané standardy alergenních vonných látek postupně zřeďovány a proměřovány pomocí GC-FID.

Z příslušného chromatogramu slepého pokusu, tj. standardu alergenní vonné látky, bylo určeno maximální kolísání základní linie (h_{max}) v oblasti dané dvaceti násobkem položířky píku stanovovaného analytu [171].

Pro odezvu meze detekce platí [171]:

$$y_D = 3h_{max} \tag{4}$$

Pro koncentraci na mezi detekce platí [171]:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} \tag{5}$$

Pro odezvu meze stanovitelnosti platí [171]:

$$y_S = 10h_{max} \tag{6}$$

Pro koncentraci na mezi stanovitelnosti platí [171]:

$$x_S = \frac{y_S}{b_1} \tag{7}$$

Směrnice kalibrační přímky b_1 byla zjištěna z koncentrační závislosti $y = b_1x$, kde y je výška chromatografického píku a x koncentrace využitá při stanovení linearity jednotlivých standardů alergenních vonných látek [171].

3.6.7 Příprava reálných vzorků kosmetických přípravků

Kapalné reálné vzorky, popřípadě suspenze, byly o objemu 1 ml bez rozpouštědla nadávkovány do vialky následně uzavřené šroubovacím uzávěrem s plynotěsným septem.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Identifikace standardů alergenních vonných látek

Vybrané standardy alergenních vonných látek byly identifikovány pomocí retenčních časů odpovídajících analytům individuálně i ve směsích ***(Tab. 25–28; Graf 1–4)***. Anýzalkohol byl identifikován pouze samostatně, neboť v heptanu vytvářel dvě fáze. Pro jeho analýzu bylo tedy nutné využít odlišné rozpouštědlo, a to ethanol. V případě α-Amylcinnamaldehydu, Citralu a Isoeugenolu byly zásobní roztoky těchto látek směsmi cis a trans izomerů. V jejich chromatogramech byly identifikovány vždy dva píky (značeno jako: α-Amylcinnamaldehyd I a II; Citral I a II; Isoeugenol I a II). Benzylsalicylát se nepodařilo identifikovat. V jeho chromatogramu se objevila řada píků zřejmě vlivem tepelného rozkladu. Nebylo tak možné určit konkrétní retenční čas této látky a využít jej k dalším analýzám.

Tab. 25 *Směs A*

Název standardu alergenní vonné látky	**Rozpouštědlo**	**Retenční čas t_R [min]**
α-Amylcinnamaldehyd I	Heptan	24,46
α-Amylcinnamaldehyd II		43,53
α-Hexylcinnamaldehyd		46,67
7-Hydroxycitronellal		36,02

Tab. 26 *Směs B*

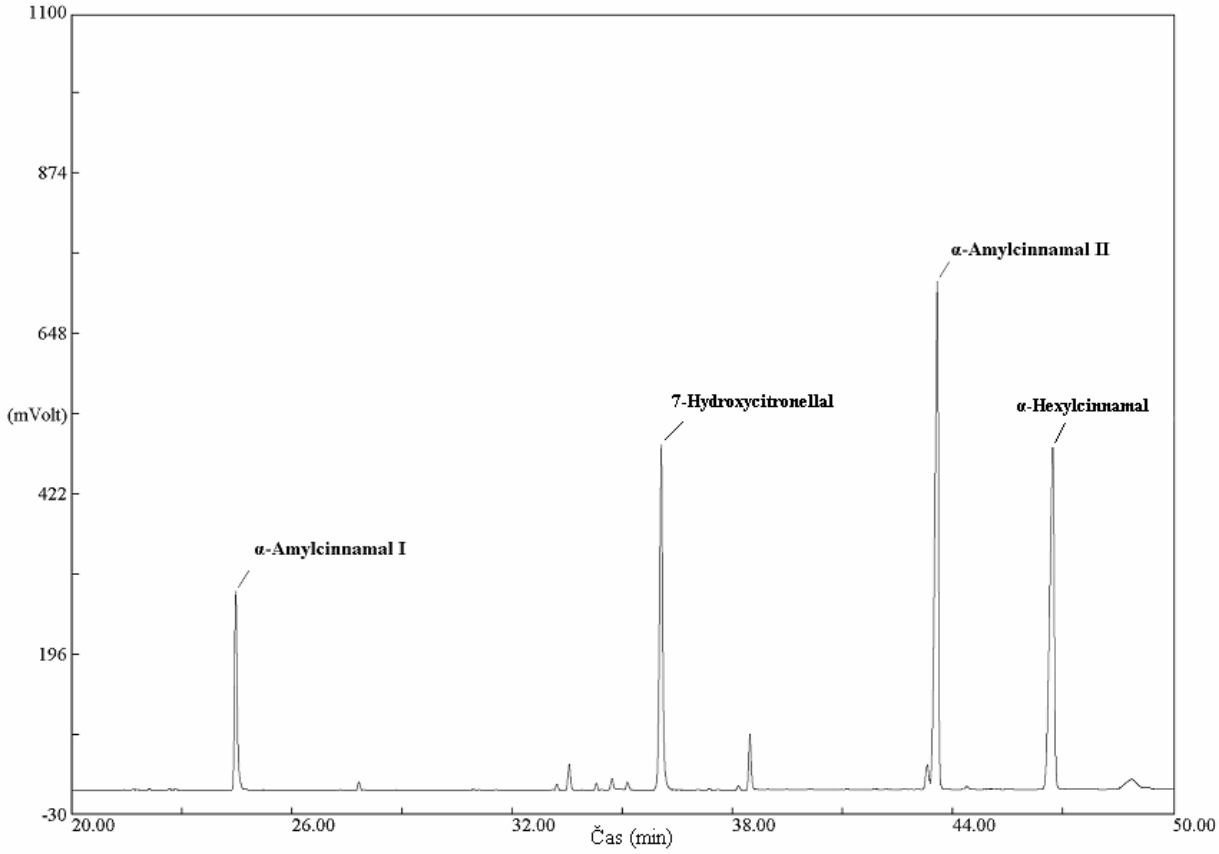
Název standardu alergenní vonné látky	**Rozpouštědlo**	**Retenční čas t_R [min]**
Cinnamaldehyd	Heptan	38,39
Methyl-2-oktynoát		27,76

Tab. 27 *Retenční čas Anýzalkoholu*

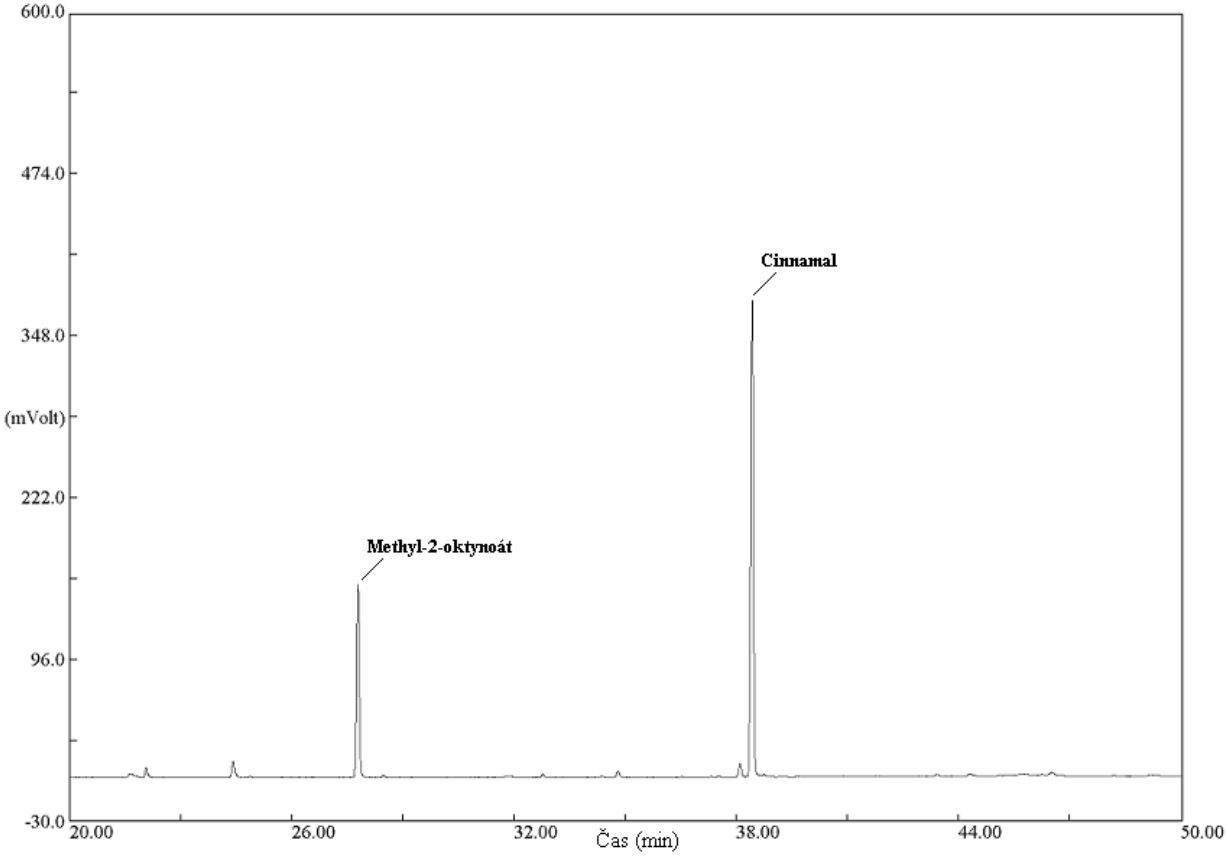
Název standardu alergenní vonné látky	**Rozpouštědlo**	**Retenční čas t_R [min]**
Anýzalkohol	Ethanol	44,41

Tab. 28 *Směs C*

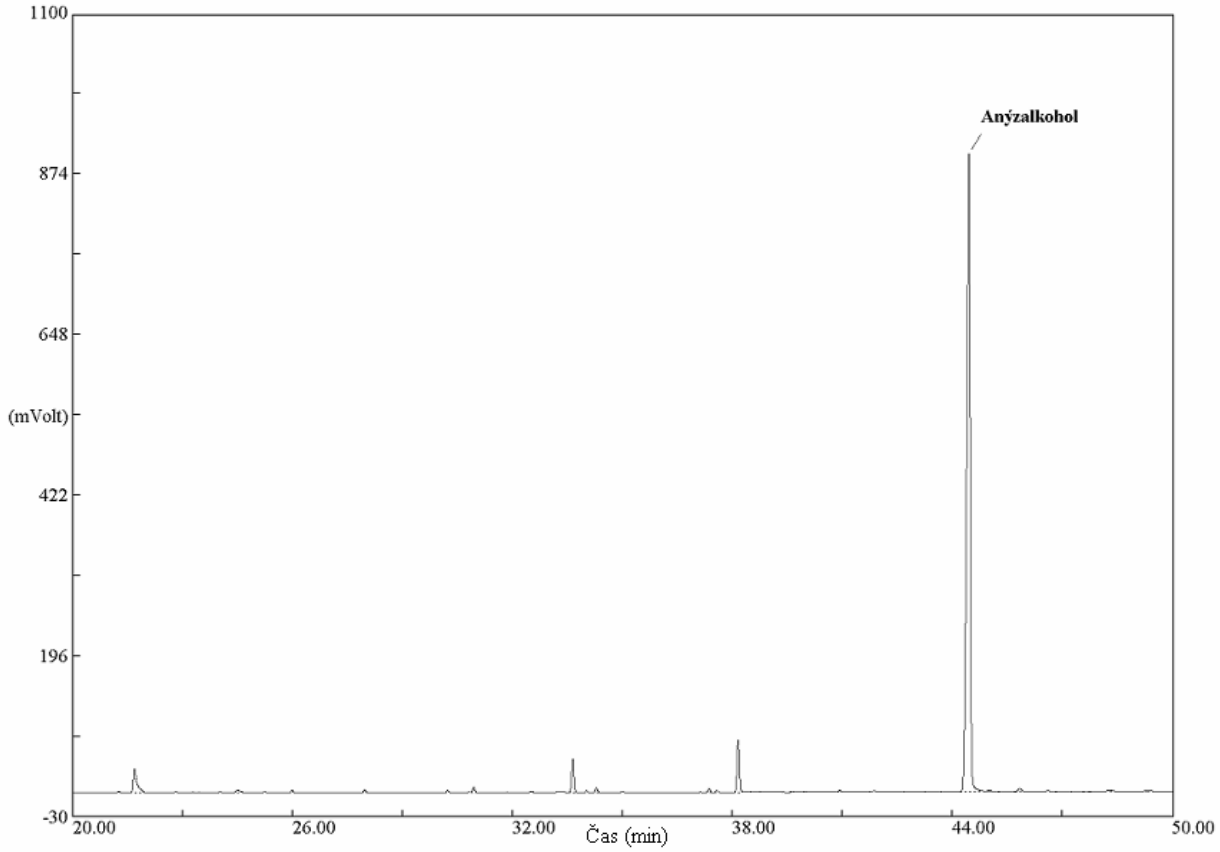
Název standardu alergenní vonné látky	**Rozpouštědlo**	**Retenční čas t_R [min]**
Citral I	Heptan	29,02
Citral II		30,39
Citronellol		31,10
Eugenol		41,14
Geraniol		33,28
Isoeugenol I		43,37
Isoeugenol II		46,23
Limonen		13,70
Linalool		24,82



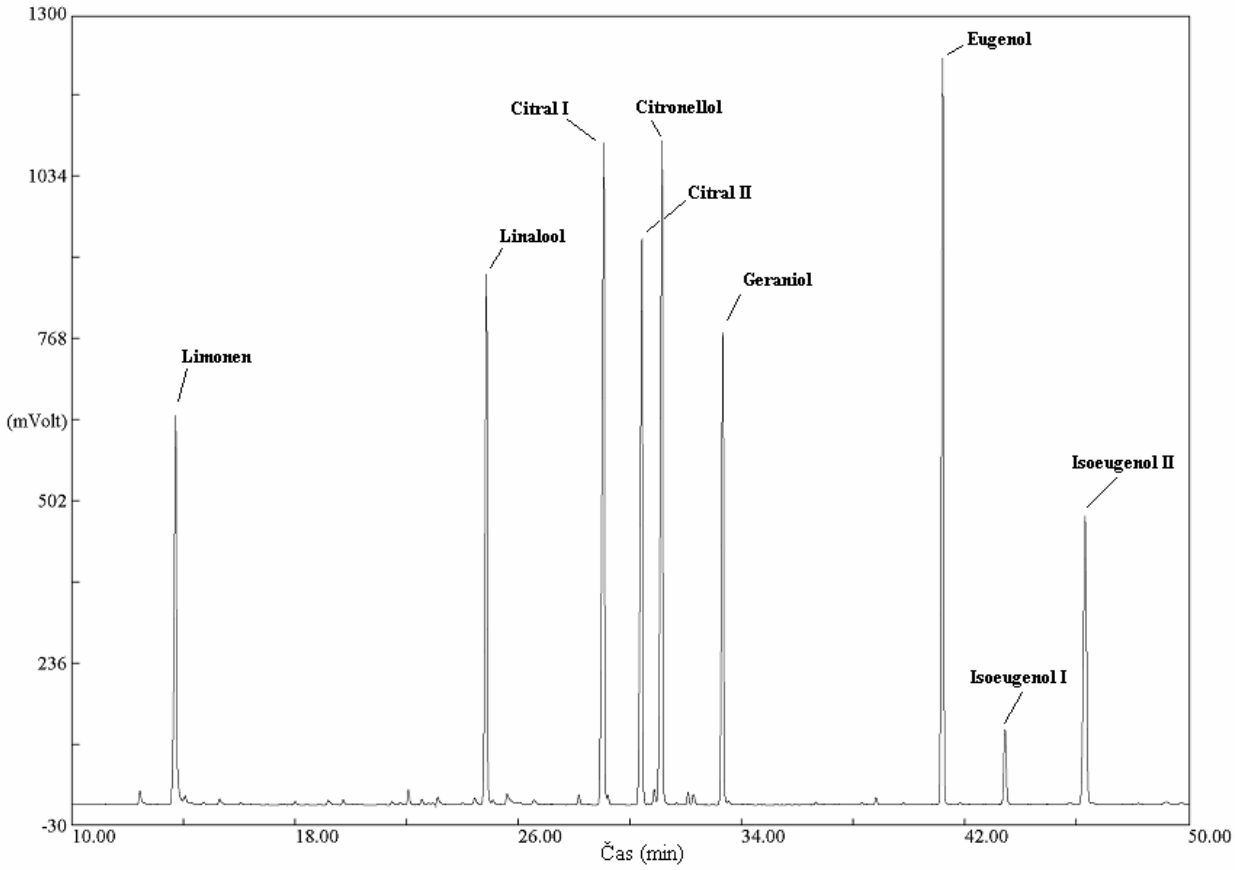
Graf 1 *Chromatogram alergenních vonných látek Směs A*



Graf 2 *Chromatogram alergenních vonných látek Směs B*



Graf 3 *Chromatogram Anýzalkoholu*



Graf 4 *Chromatogram alergenních vonných látek Směs C*

4.2 Stanovení opakovatelnosti

Opakovatelnost byla stanovena u šesti standardů alergenních vonných látek z pěti měření téhož vzorku stejným způsobem.

Naměřená data (plochy píků) byla statisticky zpracována, respektive pět ploch každého jednotlivého píku bylo zprůměrňováno, následně byla vypočtena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka (RSD) ***(Tab. 29)***. K výpočtům byly využity ***Vzorce 1–3***.

Hodnota RSD by neměla přesáhnout 10 %, což bylo splněno u všech proměřovaných standardů. Opakovatelnost je tedy v pořádku, zjištěné hodnoty jsou dostatečně uspokojivé proto, aby bylo možné metodu SPME-GC-FID použít pro stanovení daných látek v kosmetických přípravcích.

Tab. 29 *Stanovení opakovatelnosti*

Název standardu alergenní vonné látky	**Plocha píku [mV·s]**	**Průměrná plocha píku [mV·s]**	**Směrodatná odchylka *s* [mV·s]**	**RSD [%]**
α-Amylcinnamaldehyd I	15 957 390	15 577 464	356 212,21	2,29
	15 735 820			
	15 645 510			
	15 547 870			
	15 000 730			
α-Amylcinnamaldehyd II	134 165 000	135 262 840	716 403,43	0,53
	135 711 500			
	135 820 100			
	134 901 600			
	135 716 000			
Anýzalkohol	276 836 200	289 415 740	7 984 779,18	2,76
	286 282 100			
	294 907 500			
	296 037 100			
	293 015 800			
Cinnamaldehyd	234 359 400	234 207 740	11 691 201,33	4,99
	252 415 500			
	223 296 000			
	236 331 600			
	224 636 200			
α-Hexylcinnamaldehyd	44 309 890	44 691 804	745 207,02	1,67
	45 928 420			
	44 829 880			
	44 064 290			
	44 326 540			

Tab. 29 *Stanovení opakovatelnosti (pokračování)*

7-Hydroxycitronellal	90 374 450	98 432 438	6 054 465,97	6,15
	99 744 490			
	99 552 870			
	95 637 380			
	106 853 000			
Methyl-2-oktynoát	213 844 600	201 270 480	8 746 014,89	4,35
	203 335 100			
	202 025 900			
	190 070 600			
	197 076 200			

4.3 Stanovení linearity

Linearita byla proměřena u šesti standardů alergenních vonných látek pro minimálně pět různých koncentrací s ekvidistantními rozdíly ***(Tab. 30)***.

S využitím příslušných koncentrací a jim odpovídajících ploch jednotlivých píků daných látek byly sestrojeny grafy s kalibračními přímkami, které byly proloženy spojnicemi trendu ***(Graf 5–11)***. Díky tomu byly zjištěny rovnice regrese a korelační koeficienty R^2 ***(Tab. 31)***.

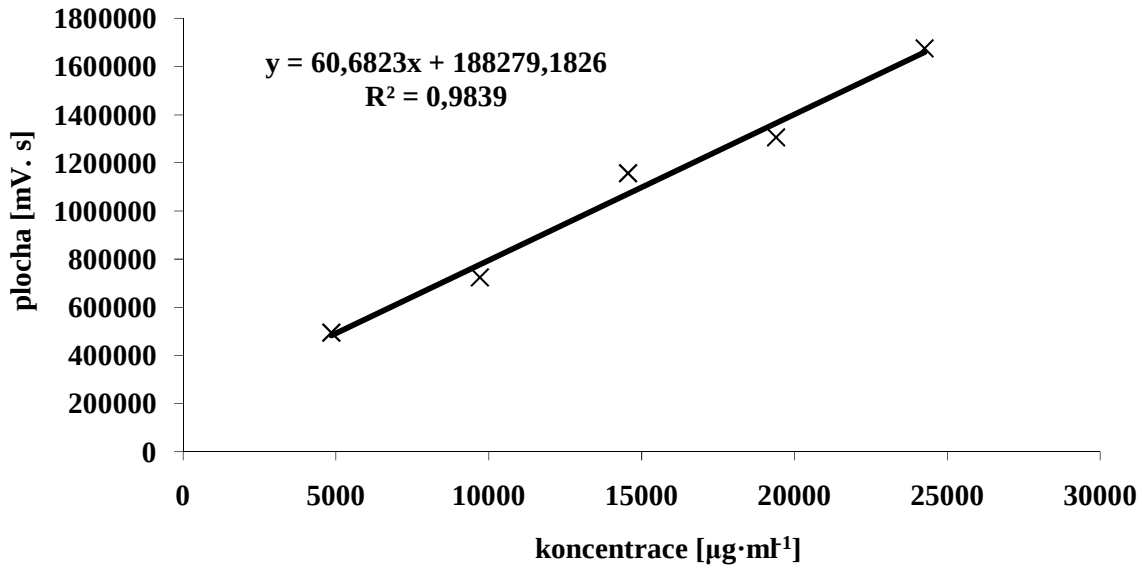
Hodnota korelačního koeficientu nemá být nižší než 0,9800, což bylo splněno u všech proměřovaných standardů. Tím byla ověřena linearita využité metody, tj. linearita daného detektoru FID, který je řazen mezi detektory lineární [145; 148; 149].

Tab. 30 *Stanovení linearity*

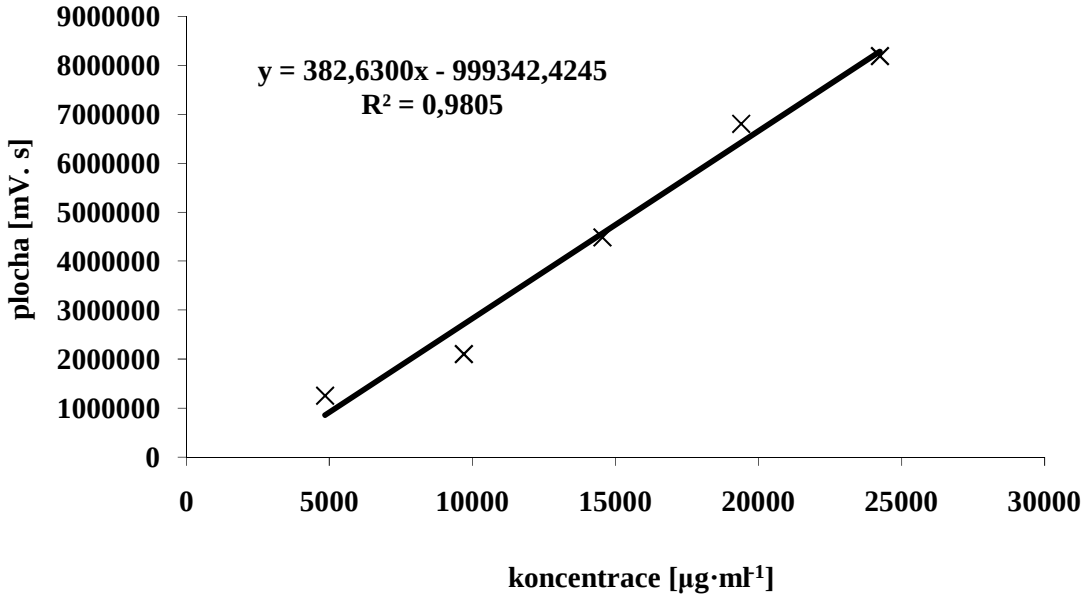
Název standardu alergenní vonné látky	**Koncentrace *c* [μg·ml^{-1}]**	**Plocha píku [mV·s]**
α-Amylcinnamaldehyd I	$4{,}85 \cdot 10^3$	494 574
	$9{,}70 \cdot 10^3$	724 006
	$14{,}55 \cdot 10^3$	1 156 676
	$19{,}40 \cdot 10^3$	1 305 016
	$24{,}25 \cdot 10^3$	1 675 524
α-Amylcinnamaldehyd II	$4{,}85 \cdot 10^3$	1 255 395
	$9{,}70 \cdot 10^3$	2 106 877
	$14{,}55 \cdot 10^3$	4 486 553
	$19{,}40 \cdot 10^3$	6 804 529
	$24{,}25 \cdot 10^3$	8 184 780
Anýzalkohol	4,18	178 536
	7,60	329 612
	41,80	1 963 680
	76,00	3 349 813
	418,00	13 569 610

Tab. 30 *Stanovení linearity (pokračování)*

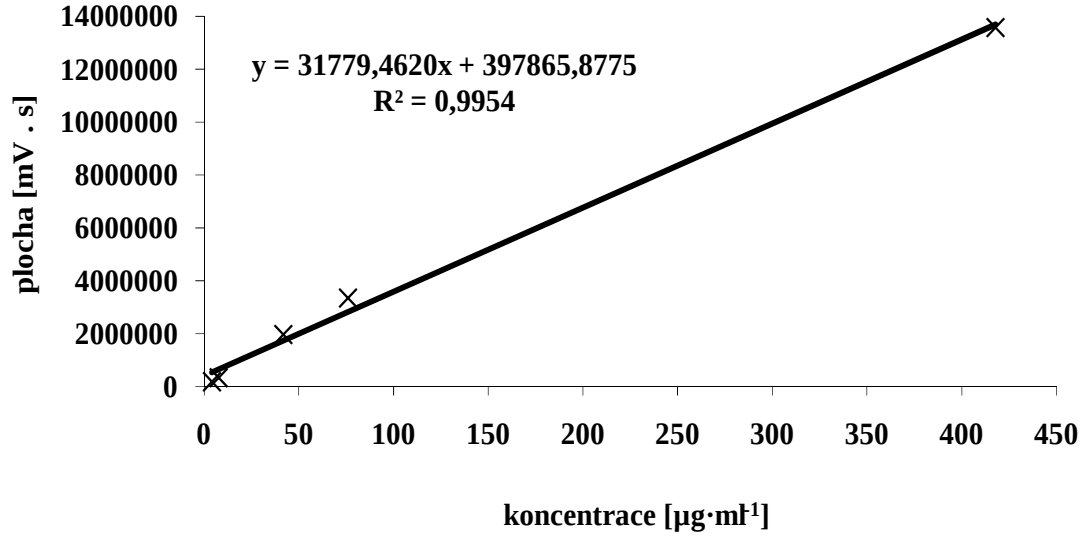
Cinnamaldehyd	0,12	20 800
	0,21	30 299
	1,15	181 825
	2,10	309 641
	11,53	2 022 571
	20,96	3 955 088
α-Hexylcinnamaldehyd	4,77	461 050
	21,44	1 752 624
	47,65	3 056 739
	214,42	15 459 180
	476,51	28 813 590
7-Hydroxycitronellal	2,53	109 882
	4,60	244 791
	25,30	527 027
	46,00	1 186 509
	253,00	8 314 005
Methyl-2-oktynoát	0,18	83 571
	1,02	293 582
	1,85	492 780
	10,16	614 616
	18,48	801 849
	101,64	3 286 580



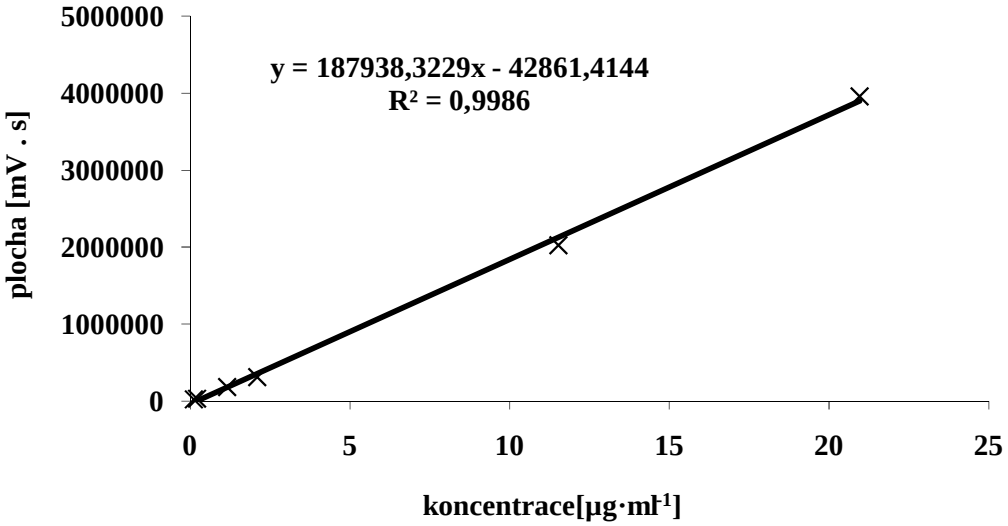
Graf 5 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci α-Amylcinnamaldehydu I*



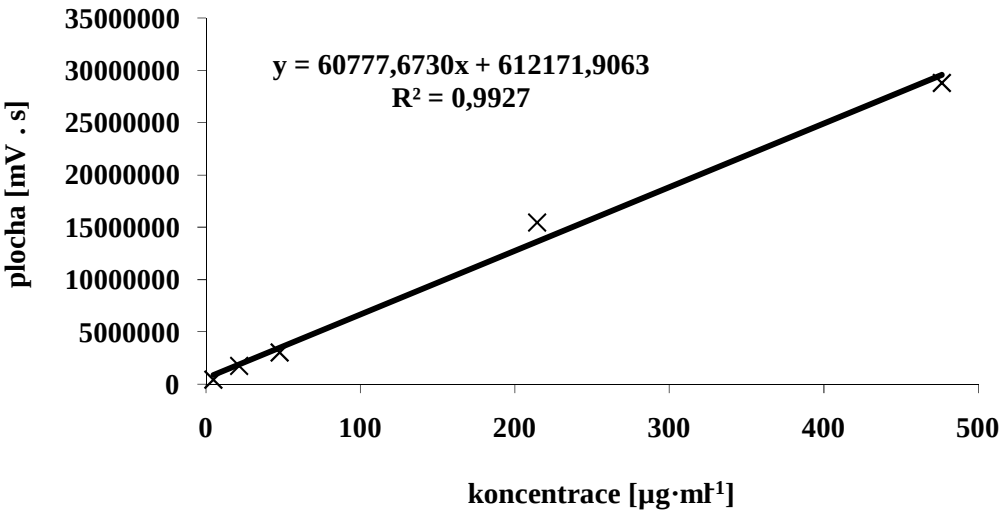
Graf 6 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci α-Amylcinnamaldehydu II*



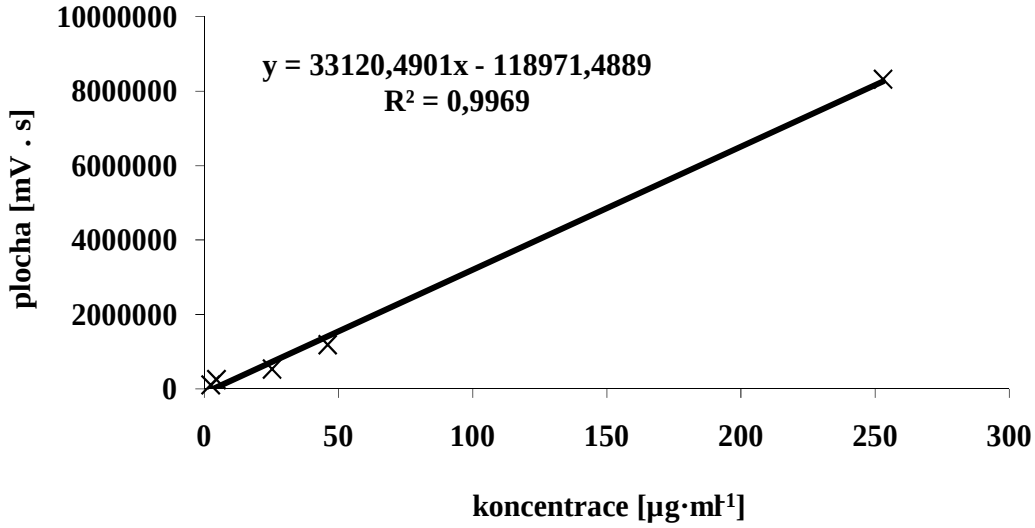
Graf 7 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci Anýzalkoholu*



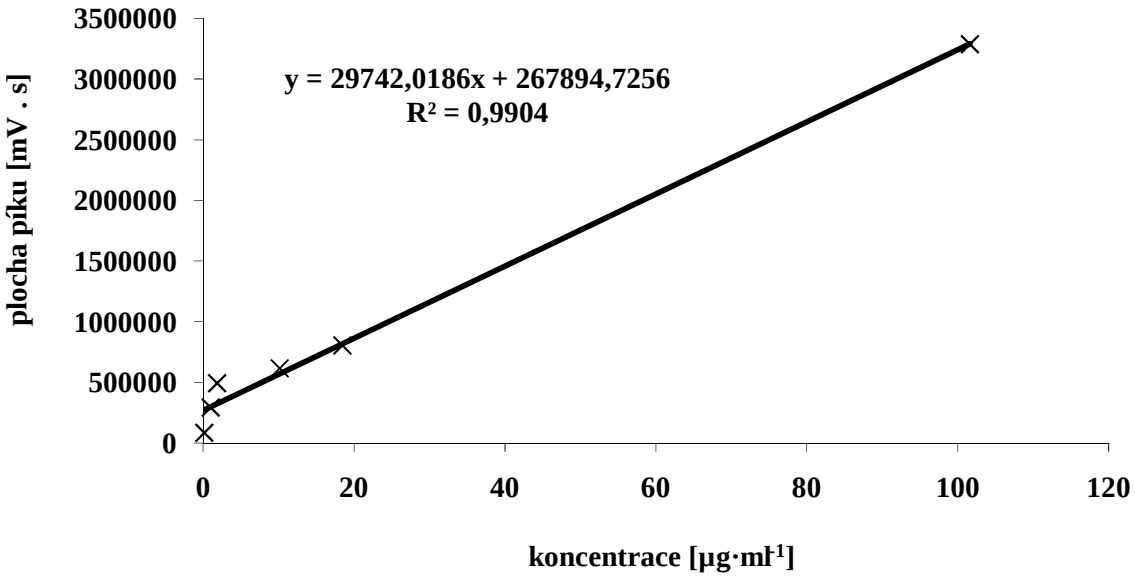
Graf 8 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci Cinnamaldehydu*



Graf 9 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci α-Hexylcinnamaldehydu*



Graf 10 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci 7-Hydroxycitronellalu*



Graf 11 *Lineární závislost plochy píku na koncentraci Methyl-2-oktynoátu*

Tab. 31 *Stanovení linearity (korelační koeficienty)*

Standard	**Korelační koeficient R^2**
α-Amylcinnamaldehyd I	0,9839
α-Amylcinnamaldehyd II	0,9805
Anýzalkohol	0,9954
Cinnamaldehyd	0,9986
α-Hexylcinnamaldehyd	0,9927
7-Hydroxycitronellal	0,9969
Methyl-2-oktynoát	0,9904

4.4 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly proměřovány u šesti standardů alergenních vonných látek pro minimálně pět různých postupně se snižujících koncentrací s ekvidistantními rozdíly ***(Tab. 32)***. Pomocí příslušných koncentrací a jim odpovídajících výšek píků daných látek byly sestrojeny grafy s kalibračními přímkami, které byly proloženy spojnicemi trendu ***(Graf 12–18)***. Díky tomu byly zjištěny rovnice regrese a jejich směrnice b_1.

Z příslušného chromatogramu slepého pokusu, tj. standardu alergenní vonné látky, bylo určeno maximální kolísání základní linie (h_{max}) v oblasti dané dvaceti násobkem položířky píku stanovovaného analytu. Po dosazení hodnot h_{max}, b_1, y_D a y_S, odpovídajících konkrétním látkám ***(Vzorce 4–7)***, byly vypočteny příslušné hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro každou jednotlivou látku ***(Tab. 33; Tab 34)***.

Obecně by měla mez stanovitelnosti odpovídat hodnotě y_1, tj. prvnímu bodu kalibračního modelu, a příslušející hodnotě x_1 [171], což bylo u všech proměřovaných standardů dodrženo.

Hodnoty meze detekce se u pěti ze šesti proměřovaných standardů pohybovaly v rozsahu 0,04–1,36 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a meze stanovitelnosti v rozsahu 0,13–4,54 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

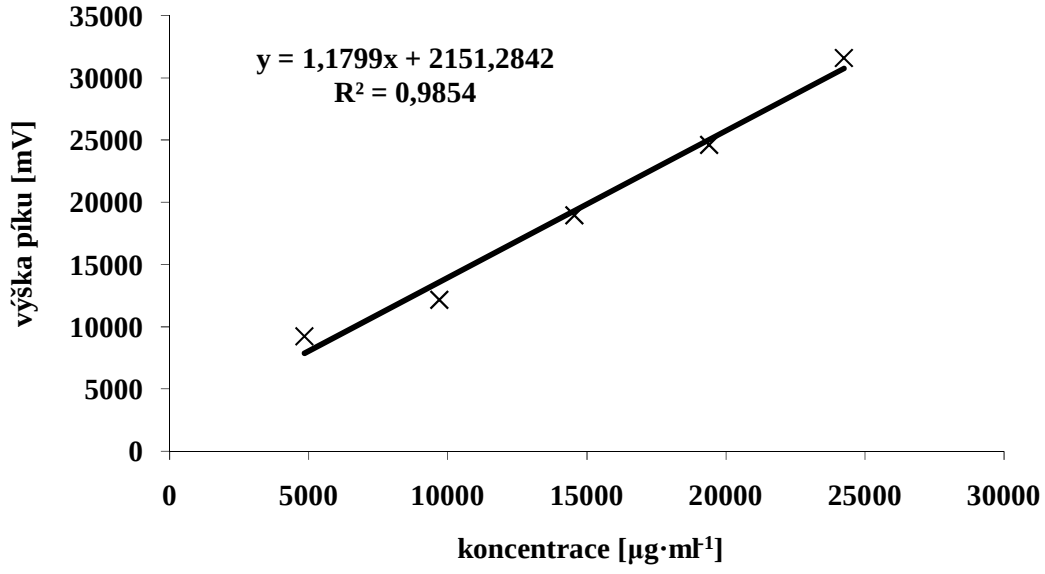
α-Amylcinnamaldehyd vykazoval oproti ostatním standardům alergenních vonných látek vysokou mez detekce i mez stanovitelnosi. Jeho odezva byla slabá, tudíž citlivost použité metody SPME-GC-FID byla u tohoto analytu na rozdíl od ostatních proměřovaných látek poměrně nízká.

Tab. 32 *Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti*

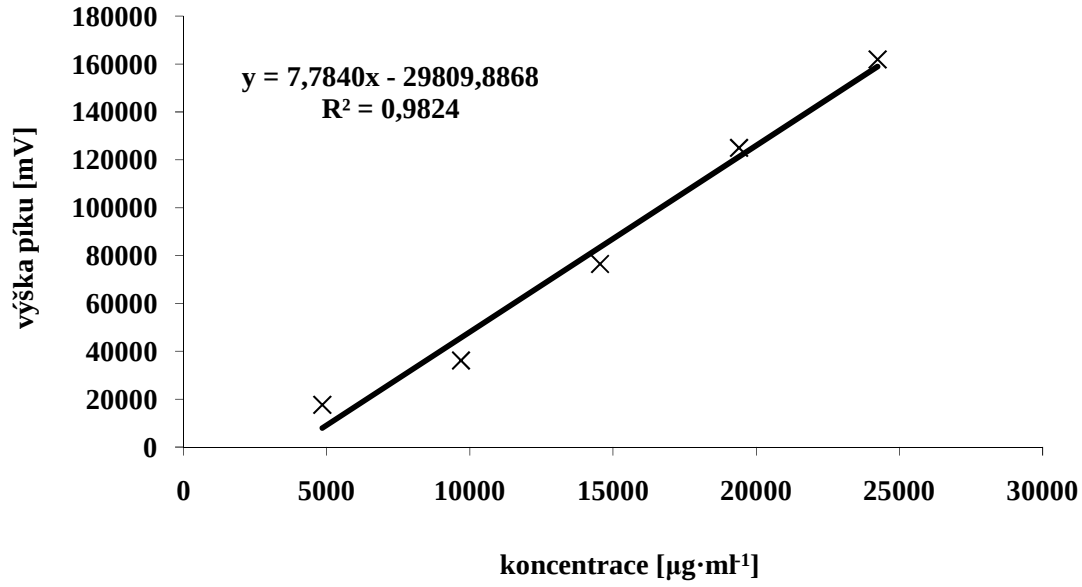
Název standardu alergenní vonné látky	**Koncentrace c [$\mu g \cdot ml^{-1}$]**	**Výška píku [mV]**
α-Amylcinnamaldehyd I	$4{,}85 \cdot 10^3$	9 220
	$9{,}70 \cdot 10^3$	12 174
	$14{,}55 \cdot 10^3$	18 967
	$19{,}40 \cdot 10^3$	24 622
	$24{,}25 \cdot 10^3$	31 607
α-Amylcinnamaldehyd II	$4{,}85 \cdot 10^3$	17 593
	$9{,}70 \cdot 10^3$	36 161
	$14{,}55 \cdot 10^3$	76 522
	$19{,}40 \cdot 10^3$	125 016
	$24{,}25 \cdot 10^3$	161 917

Tab. 32 *Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti (pokračování)*

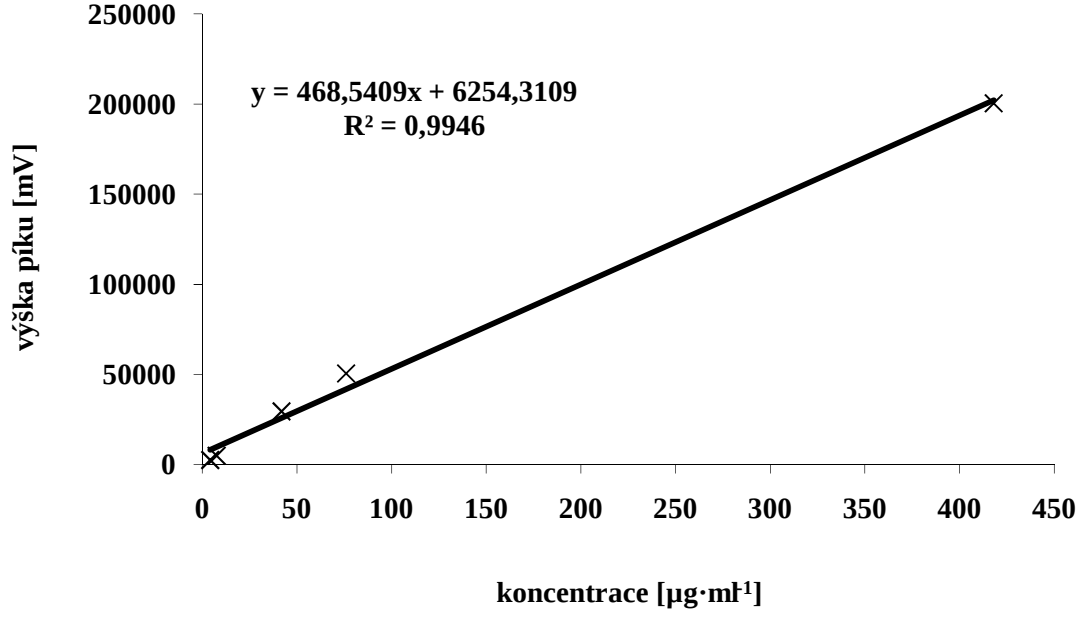
Anýzalkohol	4,18	2 664
	7,60	4 921
	41,80	29 452
	76,00	50 477
	418,00	200 323
Cinnamaldehyd	0,12	386
	0,21	586
	1,15	3 444
	2,10	5 885
	11,53	37 823
	20,96	74 621
α-Hexylcinnamaldehyd	4,77	5 160
	21,44	19 422
	47,65	34 145
	214,42	170 478
	476,51	308 965
7-Hydroxycitronellal	2,53	1 609
	4,60	3 660
	25,30	7 493
	46,00	17 556
	253,00	121 655
Methyl-2-oktynoát	0,18	1 472
	1,02	4 510
	1,85	8 102
	10,16	10 794
	18,48	14 187
	101,64	52 369



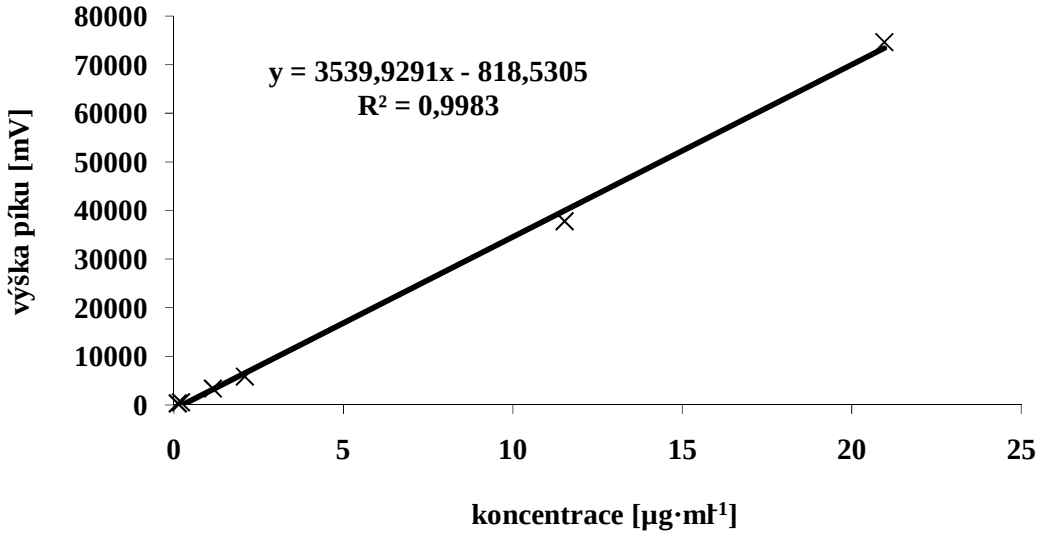
Graf 12 *Závislost výšky píku na koncentraci α-Amylcinnamaldehydu I*



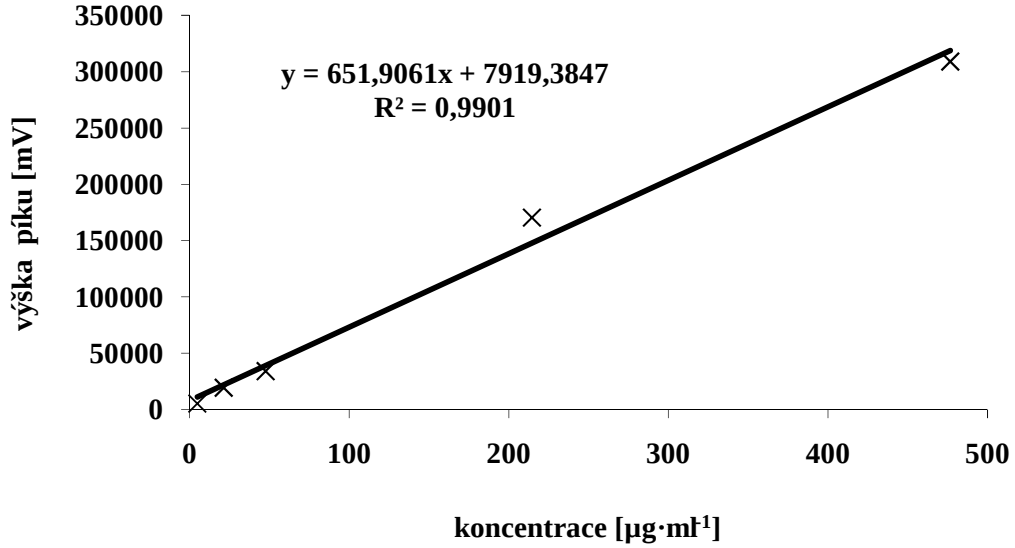
Graf 13 *Závislost výšky píku na koncentraci α-Amylcinnamaldehydu II*



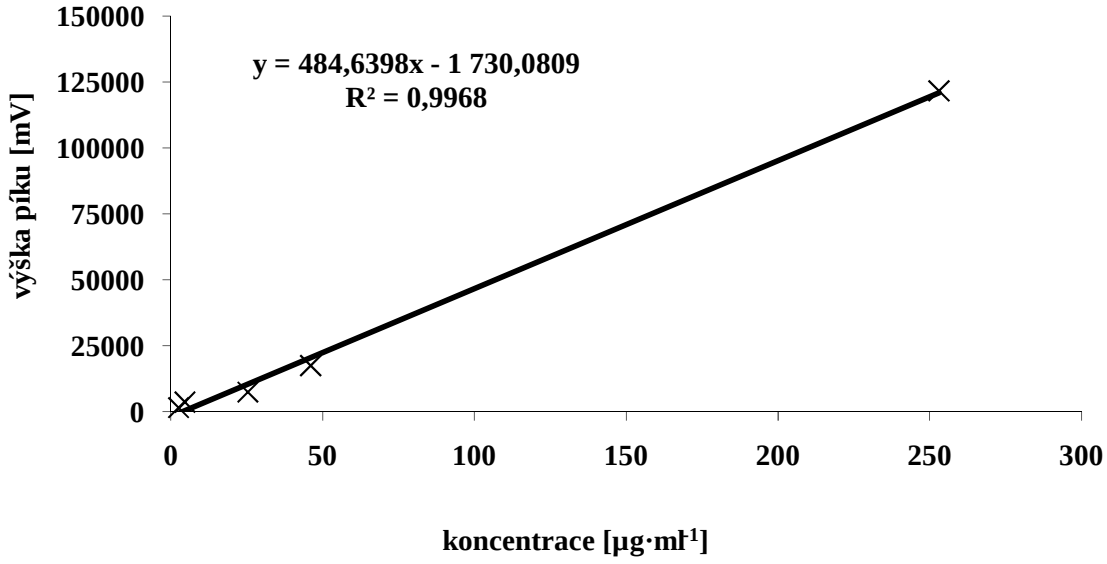
Graf 14 *Závislost výšky píku na koncentraci Anýzalkoholu*



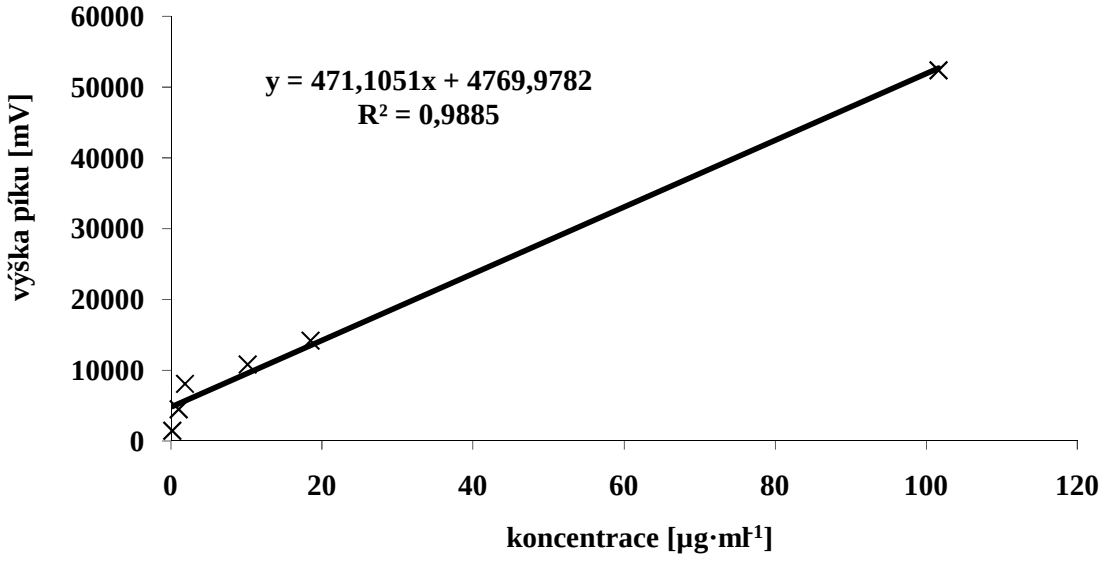
Graf 15 *Závislost výšky píku na koncentraci Cinnamaldehydu*



Graf 16 *Závislost výšky píku na koncentraci α-Hexylcinnamaldehydu*



Graf 17 *Závislost výšky píku na koncentraci 7-Hydroxycitronellalu*



Graf 18 *Závislost výšky píku na koncentraci Methyl-2-oktynoátu*

Tab. 33 *Stanovení meze detekce*

Název standardu alergenní vonné látky	***Výška*** h_{max} **[mV]**	**Odezva meze detekce** y_D **[mV]**	**Směrnice** b_1	**Koncentrace na mezi detekce** x_D **[µg·ml^{-1}]**
α-Amylcinnamaldehyd I	563	1 689	1,18	$1{,}43 \cdot 10^3$
α-Amylcinnamaldehyd II	3 889	11 667	7,78	$1{,}50 \cdot 10^3$
Anýzalkohol	205	615	468,54	1,31
Cinnamaldehyd	45	135	3 539,93	0,04
α-Hexylcinnamaldehyd	296	888	651,91	1,36
7-Hydroxycitronellal	121	363	484,64	0,75
Methyl-2-oktynoát	10	30	471,11	0,06

Tab. 34 *Stanovení meze stanovitelnosti*

Název standardu alergenní vonné látky	***Výška*** h_{max} **[mV]**	**Odezva meze stanovitelnosti** y_S **[mV]**	**Směrnice** b_1	**Koncentrace na mezi stanovitelnosti** x_S **[µg·ml^{-1}]**
α-Amylcinnamaldehyd I	563	5 630	1,18	$4{,}77 \cdot 10^3$
α-Amylcinnamaldehyd II	3 889	38 890	7,78	$4{,}99 \cdot 10^3$
Anýzalkohol	205	2 050	468,54	4,38
Cinnamaldehyd	45	450	3539,93	0,13
α-Hexylcinnamaldehyd	296	2 960	651,91	4,54
7-Hydroxycitronellal	121	1 210	484,64	2,50
Methyl-2-oktynoát	10	100	471,11	0,21

4.5 Analýza reálných vzorků kosmetických přípravků

Pomocí SPME-GC-FID byla prověřena přítomnost vybraných alergenních vonných látek uvedených na etiketách zvolených reálných vzorků kosmetických přípravků.

Dle příslušných retenčních časů byly dané alergenní vonné látky, které byly předmětem této diplomové práce ***(Tab. 20)***, identifikovány a pomocí ploch odpovídajících píků bylo vypočteno jejich koncentrační zastoupení ve vzorcích ***(Tab. 35–44)***.

Alergenní vonné látky, jimiž se zabývaly předchozí diplomové práce ***(Tab. 21)*** [174; 175], byly v reálných vzorcích v rámci této práce pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Chromatogramy k analyzovaným reálným vzorkům jsou uvedeny v ***Příloze II: Graf I–X***.

Pro splnění požadavků legislativy je nutné uvedení alergenní vonné látky na etiketě kosmetického přípravku při překročí následujících limitů [48; 49; 50]:

- 0,001 % (10 mg·kg^{-1}; ppm; µg·ml^{-1}) *leave on* v konečném výrobku (po nanesení se kosmetický prostředek nesmývá),
- 0,01 % (100 mg·kg^{-1}; ppm; µg·ml^{-1}) *rinse off* v konečném výrobku (po nanesení se kosmetický prostředek smývá max. do 20 minut).

Deodorant *Adidas Natural Vitality* je kosmetickým přípravkem, který se po nanesení na pokožku nesmývá. Řadí se tak k *leave on* výrobkům, u nichž musí být alergenní vonná látka součastí složení výrobku na etiketě při překročení legislativní hranice 10 µg·mľ^{1} v konečném výrobku.

V tomto výrobku byla potvrzena přítomnost čtyř alergenních vonných látek uvedených na obalu: Citronellol, Geraniol, Hexylcinnamal a Linalool ***(Tab. 35)***; ***(Příloha II: Graf I)***. U Hexylcinnamalu byla provedena kromě identifikace také kvantifikace. Látka byla správně jmenovitě uvedena jako součást ingrediencí na etiketě, neboť její obsah v deodorantu překročil stanovenou legislativní hodnotu.

Tab. 35 *Adidas Natural Vitality*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·mľ$^{-1}$]**
Citronellol	Citronellol	×	×
Geraniol	Geraniol	×	×
Hexylcinnamal	Hexylcinnamal	4 977 418	71,82
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Bylinný gel *Alpa s hřebíčkem* je kosmetickým přípravkem, který se po nanesení na pokožku nesmývá. Vztahuje se na něj tedy legislativní koncentrační limit pro *leave on* výrobky, tj. 10 µg·mľ^{1}.

V tomto výrobku bylo identifikováno pět alergenních vonných látek uvedených na jeho obalu, a to Citral I, Cinnamal, Eugenol, Limonen a Linalool ***(Tab. 36)***; ***(Příloha II: Graf II)***. Legislatitvní požadavek byl dodržen. Kvantifikovaný Cinnamal překročil hranici 10 µg·mľ^{1} a byl tedy uveden na obalu přípravku.

V chromatogramu je možné vidět vysoké zastoupení Eugenolu v daném přípravku. Tento alergen se vyznačuje až 90 % obsahem v hřebíčkové silici.

Tab. 36 *ALPA s hřebíčkem*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·mľ$^{-1}$]**
Citral	Citral I	×	×
Cinnamal	Cinnamal	8 398 116	44,91
Eugenol	Eugenol	×	×
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Dětský olej *Aviril s azulenem* je také kosmetickým přípravkem, který se po nanesení nesmývá (10 µg·mľ^{1}).

Identifikováno bylo pět alergenních vonných látek uvedených na obalu přípravku: Citronellol, Geraniol, Hydroxycitronellal, Limonen a Linalool ***(Tab. 37)***; ***(Příloha II: Graf III)***. Hydroxycitronellal byl ve výrobku přítomen v koncentraci vyšší než 10 µg·mľ^{1}. Je tedy součástí ingrediencí na etiketě výrobku. Přítomnost tolika alergenů v kosmetice určené pro děti je přinejmenším zarážející.

Tab. 37 *Aviril s azulenem*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·mľ^{1}]**
Citronellol	Citronellol	×	×
Geraniol	Geraniol	×	×
Hydroxycitronellal	Hydroxycitronellal	3 515 364	109,73
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Hydratující tělové mléko *Davidoff Cool Water Woman* je taktéž *leave on* kosmetickým přípravkem (10 µg·mľ^{1}).

Identifikované byly všechny na obalu uvedené alergenní vonné látky, tj. Citral (Citral I a Citral II), Citronellol, Geraniol, Limonen a Linalool ***(Tab. 38)***; ***(Příloha II: Graf IV)***.

Už samotná silná, osvěžující citrusová vůně svědčí o zastoupení takových alergenů, jako jsou Limonen či Linalool, jejichž přítomnost je viditelná na příslušném chromatogramu. Limonen tvoří až 98 % pomerančové silice a Linalool až 70 % citrónové silice.

Tab. 38 *Davidoff Cool Water Woman*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·mľ^{1}]**
Citral	Citral I	×	×
	Citral II	×	×
Citronellol	Citronellol	×	×
Geraniol	Geraniol	×	×
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Dixi březový šampón s přírodní březovou šťávou je řazen mezi tzv. *rinse off* výrobky, tj. po nanesení se kosmetický prostředek smývá max. do 20 minut (100 µg·mľ^{1}).

Analýza tohoto kosmetického výrobku poskytla pět identifikovaných alergenních vonných látek, které se shodovaly s alergeny uvedenými na obalu, a to Citral (Citral I a Citral II), Citronellol, Geraniol, Limonen a Linalool ***(Tab. 39)***; ***(Příloha II: Graf V)***. Šestý alergen, Amylcinnamal, který byl uveden na etiketě, se nepodařilo identifikovat, tím pádem nemohlo dojít ani ke kvantifikaci této látky.

Vzhledem k tomu, že je Amylcinnamal jmenovitě uveden na obalu výrobku, mělo by být jeho koncentrační zastoupení v *rinse off* výrobku vyšší než 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Pravděpodobným vysvětlením toho, že se nepodařilo tuto látku identifikovat, je, že u analytu s vyšší molekulovou hmotností je jeho koncentrace v headspace prostoru relativně nízká následkem nižší těkavosti. Může se tak stát, že při přítomnosti více analytů ve vzorku nedojde k naadsorbování dostatečného množství všech příslušných látek na SPME vlákno. Látky ve směsi se také mohou navzájem z vlákna vytěsňovat. Citlivost použité metody SPME-GC-FID byla u Amylcinnamalu na rozdíl od ostatních proměřovaných látek poměrně nízká, neboť jeho odezva byla zřejmě příliš slabá. Ve velké míře jsou dle příslušného chromatogramu zastoupeny v tomto výrobku zejména Limonen a Linalool.

Tab. 39 *Dixi březový šampón*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [$\mu g \cdot ml^{-1}$]**
Amylcinnamal	Neidentifikováno	–	–
Citral	Citral I	×	×
	Citral II	×	×
Citronellol	Citronellol	×	×
Geraniol	Geraniol	×	×
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: – …… *látka, kterou se nepodařilo v přípravku identifikovat.*
× …… *látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.*

Sprchový gel *Dove Beauty Care Shower Fresh Touch* s vůní okurky a zeleného čaje je výrobkem, který se po nanesení smývá (100 $\mu g \cdot ml^{-1}$).

Byly v něm stanoveny tyto alergenní vonné látky ve shodě s etiketou přípravku: Citronellol, Hexylcinnamal, Limonen a Linalool ***(Tab. 40)***; ***(Příloha II: Graf VI)***.

Hexylcinnamal by měl být ve výrobku zastoupen v koncentraci vyšší než 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Vzhledem k jeho velmi nízké zjištěné koncentraci zřejmě došlo k vytěsnění většího množství této látky z vlákna majoritně zastoupenými složkami vzorku, tj. těkavějšími alergeny Limonenem a Linaloolem. Svěží, silná vůně tohoto výrobku svědčí o jeho značné parfemaci a tím atraktivnosti pro konečného zákazníka.

Tab.40 *Dove Beauty Care Shower Fresh Touch*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [$\mu g \cdot ml^{-1}$]**
Citronellol	Citronellol	×	×
Hexylcinnamal	Hexylcinnamal	790 271	2,93
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… *látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.*

Deodorant *Dove Original* je jedním z kosmetických přípravků, které se po nanesení na pokožku nesmývají (10 µg·ml^{-1}).

V deodorantu bylo identifikováno pět alergenů: Citronellol, Eugenol, Geraniol, Hexylcinnamal a Linalool ***(Tab. 41)***; ***(Příloha II: Graf VII)***.

Vůně je jemná a ne příliš výrazná. Koncentrace alergenních vonných látek nejsou zjevně příliš vysoké, což potvrzuje i poměrně nízké koncentrační zastoupení kvantifikovaného Hexylcinnamalu.

Tab. 41 *Dove Original Deodorant*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·ml^{-1}]**
Citronellol	Citronellol	×	×
Eugenol	Eugenol	×	×
Geraniol	Geraniol	×	×
Hexylcinnamal	Hexylcinnamal	1 642 348	16,95
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Dámský gel na holení *Gillette Shave Gel Satin Care Avocado Twist* je kosmetickým přípravkem typu *rinse off* (100 µg·ml^{-1}).

Na obalu výrobku byly uvedeny tři alergeny, které byly také následně identifikovány: Hexylcinnamal, Limonen a Linalool ***(Tab. 42)***; ***(Příloha II: Graf VIII)***.

Ze samotného chromatogramu je zřejmé, že převažujícími alergenními vonnými látkami jsou v tomto výrobku Limonen a Linalool. O jejich přítomnosti svědčí taktéž pronikavá, citrusová vůně. Hexyl cinnamal byl při adsorpci na vlákno pravděpodobně potlačen ostatními dvěma alergeny. To je zřejmě důvod, proč je jeho koncentrace nižší než 100 µg·ml^{-1} i přes to, že je uveden na etiketě produktu.

Tab. 42 *Gillette Shave Gel Satin Care Avocado Twist*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·ml^{-1}]**
Hexylcinnamal	Hexylcinnamal	2 248 982	26,93
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Bylinná vlasová voda *LUNA kopřivová* je považována za kosmetický přípravek, který se po nanesení nesmývá (10 µg·ml^{-1}).

Stanoveno bylo šest alergenů uvedených na obalu: Citral (Citral I a Citral II), Citronellol, Hexylcinnamal, Geraniol, Limonen a Linalool ***(Tab. 43)***; ***(Příloha II: Graf IX)***. Koncentrace Hexylcinnamalu uvedeného na etiketě skutečně překročila legislativní limit.

Tab. 43 *LUNA kopřivová*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·ml^{-1}]**
Citral	Citral I	×	×
	Citral II	×	×
Citronellol	Citronellol	×	×
Hexylcinnamal	Hexylcinnamal	3 923 381	54,48
Geraniol	Geraniol	×	×
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

Krém na ruce *Miris hand creme* s glycerinem a aloe je *leave on* výrobkem, který se po nanesení na pokožku nesmývá. Legislativní hranice uvedení alergenní vonné látky na obalu výrobku je tudíž 10 µg·ml^{-1}.

Na obalu přípravku byly uvedeny tyto alergeny: Citronellol, Hexylcinnamal, Limonen a Linalool ***(Tab. 44)***; ***(Příloha II: Graf X)***. Všechny čtyři byly také identifikovány.

Koncentrační zastoupení Hexylcinnamalu přesahuje příslušný legislativní limit a je tak správně výrobcem uveden jmenovitě na obalu zmíněného kosmetického přípavku.

Alergeny jsou zjevně zastoupeny v menších množstvích, čemuž odpovídá jemná, ne příliš výrazná vůně tohoto krému.

Tab. 44 *Miris hand creme*

Vybrané alergenní vonné látky uvedené na etiketě přípravku	**Identifikované vybrané alergenní vonné látky**	**Plocha píku [mV·s]**	**Koncentrace [µg·ml^{-1}]**
Citronellol	Citronellol	×	×
Hexylcinnamal	Hexylcinnamal	1 523 163	14,99
Limonen	Limonen	×	×
Linalool	Linalool	×	×

Pozn.: × …… látky, které byly pouze identifikovány, nikoliv kvantifikovány.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zpracování literární rešerše (týkající se vonných látek) se zaměřením na alergenní vonné látky v kosmetických přípravcích. Experimentální část práce se zabývá metodikou stanovení vybraných zástupců alergenních vonných látek. Tou je headspace mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem (HS-SPME-GC-FID). Daná metoda byla validována a aplikována na spektrum reálných vzorků kosmetických výrobků.

Vonné látky jsou dnes nepostradatelnou součástí našeho života. Jsou to směsi přírodního nebo syntetického charakteru, které dodávají vůni výrobkům nebo zakrývají jejich zápach. Stovky až tisíce vonných chemikálií je průmyslově využíváno, avšak tyto materiály často nepřinášejí jen příjemné pocity, zvlášť u senzitivních jedinců. Velkým problémem jsou alergenní složky parfémových kompozic, které kromě celé řady dalších zdravotních obtíží způsobují v největší míře alergickou kontaktní dermatitidu. Již více než 100 vonných látek bylo identifikováno jako alergenní, přičemž 26 z nich bylo deklarováno Evropskou kosmetickou direktivou jako potenciálně alergenní vonné substance (PASs).

Nejčastější analytickou metodou aplikovanou na vonné látky v kosmetických přípravcích je plynová chromatografie (GC), která je také nejčastěji využívanou technikou pro analýzu potenciálně alergenních vonných substancí.

Pro extrakci (izolaci) příslušných analytů byla využita mikroextrakce tuhou fází (SPME). Tato mikroextrakční technika, založená na využití tuhých sorbetů, je jednoduchou, rychlou, citlivou a selektivní metodou, která je kompatibilní s metodami koncového zakončení. Je využitelná pro široké spektrum analytů a matric. Zejména díky absenci rozpouštědla při vzorkování je také šetrná k životnímu prostředí.

Analyty extrahované na sorpční vrstvě SPME vlákna byly následně tepelně desorbovány a analyzovány pomocí plynového chromatografu s lineárním plamenově ionizačním detektorem (GC-FID).

Z 26 potenciálně alergenních substancí bylo předmětem této diplomové práce sedm z nich: α-Amylcinnamaldehyd (směs cis a trans), Anýzalkohol, Benzylsalicylát, Cinnamaldehyd, α-Hexylcinnamaldehyd, 7-Hydroxycitronellal a Methyl-2-oktynoát. Z uvedených látek nebyl identifikován pouze Benzylsalicylát, neboť v jeho chromatogramu se patrně díky tepelnému rozkladu objevilo vícero píků. Tím pádem nebylo možné určit jeden konkrétní pík patřící právě této látce a nadále s ním tedy již nebylo pracováno. K jeho identifikaci mohu doporučit plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí (GC-MS). Identifikováno bylo také sedm alergenních vonných látek, kterými se zabývaly již předchozí diplomové práce: Citral (směs cis a trans), Citronellol, Eugenol, Geraniol, Isoeugenol (směs cis a trans), Limonen a Linalool. Standardy alergenních vonných látek byly identifikovány pomocí příslušných retenčních časů jednotlivých analytů individuálně i ve směsích.

Dále byla metoda SPME-GC-FID validována. Byly stanoveny následující validační parametry: opakovatelnost, linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Opakovatelnost byla vyhodnocena jako dobrá, neboť u všech vonných alergenů, které byly předmětem této diplomové práce, nepřesáhla relativní směrodatná odchylka (RSD) hranici 10 %. Hodnoty RSD se u jednotlivých analytů pohybovaly v rozmezí 0,53–6,15 %.

Metoda vykazovala uspokojivou linearitu, neboť korelační koeficienty příslušných alergenních vonných látek byly vyšší než 0,9800; v rozpětí 0,9805–0,9986.

Hodnoty meze detekce se u pěti ze šesti proměřovaných standardů pohybovaly v rozsahu 0,04–1,36 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a meze stanovitelnosti v rozsahu 0,13–4,54 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

Pouze α-Amylcinnamaldehyd vykazoval oproti ostatním standardům alergenních vonných látek vysokou mez detekce i mez stanovitelnosti. Jeho odezva byla slabá, tudíž citlivost použité metody SPME-GC-FID byla u tohoto analytu na rozdíl od ostatních proměřovaných látek poměrně nízká.

Nejnižší hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti byly tedy stanoveny u Cinnamaldehydu, nejvyšší pak u již zmíněného α-Amylcinnamaldehydu.

Na závěr byla pomocí SPME-GC-FID prověřena přítomnost vybraných alergenních vonných látek uvedených na etiketách zvolených reálných vzorků kosmetických přípravků. Dle příslušných retenčních časů byly dané alergenní vonné látky, které byly předmětem této diplomové práce, identifikovány a pomocí ploch odpovídajících píků také kvantifikovány. Alergenní vonné látky, jimiž se zabývaly předchozí diplomové práce, byly v reálných vzorcích pouze identifikovány. Nejčastěji vyskytující se alergenní vonné látky v deseti analyzovaných reálných vzorcích kosmetických přípravků byly následující: Citronellol, Hexylcinnamal, Limonen a Linalool.

Kromě metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) navržené IFRA k určování 24 PASs, neexistují oficiální analytické metody na stanovování vonných ingrediencí v kosmetických výrobcích. Tato práce tak nabízí jeden z přístupů, jak je možné identifikovat a kvantifikovat alergenní vonné látky v parfémovaných kosmetických výrobcích. Mikroextrakce tuhou fází ve spojení s plynovou chromatografií s různými typy detektorů má velký význam právě při stanovování senzoricky aktivních vonných látek, respektive potenciálně alergenních vonných substancí.

S ohledem na množství alergenních vonných látek, které se nacházejí v kosmetických produktech, je nezbytné důsledně regulovat a legislativně sledovat přítomnost těchto substancí v kosmetických i jiných výrobcích, s nimiž jsme v bezprostředním, každodenním kontaktu. Je nutné vyvíjet stále sofistikovanější metody k jejich kontrole a analýze, neboť alergie na různé parfémované výrobky jsou velmi časté a počet alergiků stále roste.

Jako další možnost navázání na tuto práci doporučuji analyzovat ostatní z 26 deklarovaných potenciálně alergenních vonných substancí, které nebyly předmětem této, ani předchozích diplomových prací.

Dále doporučuji propojení techniky SPME s metodou GC-MS. MS se uplatňuje jako analytická koncovka pro identifikaci látek rozdělených separační metodou. Hmotnostní spektrometrie ve spojení GC-MS slouží především ke kvalitativní analýze. Ke kvantitativní analýze se využívá chromatografických záznamů (např. GC-FID). Na rozdíl od GC-FID není u GC-MS pro identifikaci neznámých látek nutné použití standardů. Na druhou stranu však GC-MS oproti GC-FID vyžaduje mnohem vyšší náklady vynaložené na pořízení přístrojového vybavení i na samotný provoz.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] de Nicolaï, P.: A Smelling Trip into the Past: The Influence of Synthetic materials on the History of Perfumery. *Chemistry and Biodiversity*, 2008, vol. 5, no. 6, pp. 1137–1146. ISSN 1612-1872.

[2] Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H.: *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, Fourth Completely Revised Edition*. Weinheim (Germany): WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001. 282 p. ISBN 3-527-30364-2.

[3] Trepková, E., Vonášek, F.: *Vůně a parfémy. Tajemství přitažlivosti*. Praha: Maxdorf, 1997. 173 s. ISBN 80-85500-48-9.

[4] Bílek, J.: *Čich a pachové látky* [online]. Lednice: Seminář, 2005 [cit. 10. 2. 2010]. Dostupné z: <http://www.zuova.cz/informace/obecne/info001_bilek_jiri-cich_a_pachove_latky.pdf>.

[5] Salvador, A., Chisvert, A.: Perfumes in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods for Fragrance Ingredients and other Related Chemicals in Cosmetics. In Salvador, A., Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2007. 506 p. ISBN 978-0-444-52260-3.

[6] Popelková, M.: *Přednášky z bytové chemie*. Brno: Fakulta chemická VUT, 2007. Nepublikované.

[7] Schueller, R., Romanowski, P.: Common "Scents" Fragrance in Personal-Care Products. In Schueller, R., Romanowski, P.: *Beginning Cosmetic Chemistry*. Carol Stream (USA): Allured Publishing Corporation, 1999. pp. 53–60. ISBN 0-931710-68-5.

[8] Valíček, P: *Technické a siličnaté rostliny*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. 96 s.. ISBN 80-7157-936-X.

[9] Pourmortazavi, S. M., Hajimirsadeghi, S. S.: Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1163, no. 1–2, pp. 2–24. ISSN 0021-9673.

[10] Merfort, I.: Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 967, no. 1, pp. 115–130. ISSN 0021-9673.

[11] Lockwood, G. B.: Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrice. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 936, no. 1–2, pp. 23–31. ISSN 0021-9673.

[12] Kuo, S. Ch., Chuang, S. K., Wang, L. H.: Study of the aerosol fragrances of eugenol derivatives in Cananga odorata using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2009, vol. 653, no. 1, pp. 91–96. ISSN 0003-2670.

[13] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.: Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 2, pp. 446–475. ISSN 0278-6915.

[14] van Ruth, S. M.: Aroma measurement: Recent developments in isolation and characterisation. In de Cuyper, M., Bulte, J. W. M.: *Physics and Chemistry Basis of Biotechnology*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2001. pp. 305–328. ISBN 0-7923-7091-0.

[15] Červený, L.: Syntetické vonné a chuťové látky. *Chemické listy*, 1999, roč. 93, s. 412–420. ISSN 0009-2770.

[16] Mitsui, T.: Cosmetics and fragrances. In Mitsui, T.: *New cosmetic science*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1997. pp. 99–120. ISBN 0-444-82654-8.
[17] Hlava, B., Starý, F., Pospíšil, F.: *Rastliny v kozmetike*. Bratislava: Príroda, 1983, 237 s.
[18] de Groot, A. C., Frosch, P. J.: Adverse reactions to fragrances. A clinical review. *Contact Dermatitis*, 1997, vol. 36, no. 2, pp. 57–86. ISSN 0105-1873.
[19] Goossens, A., Lepoittevin, J. P.: Allergie de contact aux cosmétiques et aux composants de parfums : aspects cliniques, chimiques et diagnostiques nouveaux. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2003, vol. 43, no. 5, pp. 294–300. ISSN 0335-7457.
[20] Machovcová, A.: Skryté a neočekávané alergeny v kosmetických přípravcích. *Dermatologie pro praxi*, 2007, č. 1,. s. 7–9. ISSN 1802-2960.
[21] Barel, A. O., Paye, M., Maibach, H. I.: *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. 886 p. ISBN 0-8247-0292-1.
[22] Paye, M., Barel, A. O., Maibach, H. I.: *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. New York: Tailor & Francis Group LLC, 2006. 1003 p. ISBN 1-57444-824-2.
[23] Kubelová, J.: *Parfémové kompozice a současná diskuze kolem nich*. Kosmetologický seminář, České Budějovice, 4.–6. dubna 2005.
[24] Meynadier, J. M., Raison-Peyron, N., Meunier, L., Meynadier, J.: Allergie aux parfums. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 1997, vol. 37, no. 5, pp. 641–650. ISSN 0335-7457.
[25] Pons-Guiraud, A.: *Alergie a kosmetika* [online]. Paříž: The UCB Institute of Allergy, 2005 [cit. 10. únor 2010]. Dostupné z: <http://www.alergie.cz/getattachment/9167fbeb-15c6-4d31-948e-a304c1655744/Alergie-a-kosmetika.aspx>.
[26] Mowad, Ch. M.: Allergens of New and Emerging Significance. *Dermatology Nursing*, 2006, vol. 18, no. 6, pp. 545–548. ISSN 1060-3441.
[27] Benáková, N.: *Ekzémy a dermatitidy v lékařské praxi*. Praha: Maxdorf, 2006. 125 s. ISBN 80-7345-078-X.
[28] Elahi, E. I., Wright, Z., Hinselwood, D., Hotchkiss, S. A. M., Basketter, D. A., Smith Pease, C. K.: Protein Binding and Metabolism Influence the Relative Skin Sensitization Potential of Cinnamic Compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 2004, vol. 17, no. 3, pp. 301–310. ISSN 0893-228X.
[29] Karlberg, A. T., Bergstörm, M. A., Börje, A., Luthman, K., Nilsson, J. L. G.: Allergic Contact Dermatitis – Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, vol. 21, no. 1, pp. 53–69. ISSN 0893-228X.
[30] Rowan, M. G.: Plant Allergens: A Chemical Perspective. *Seminars in Dermatology*, 1996, vol. 15, no. 2, pp. 103–112. ISSN 0278-145X.
[31] Mathelier-Fusade, P.: Alergie aux parfums: quels tests pour quels conseils?. *Revue Française d'Allergologie*, 2009, vol. 49, no. 4, pp. 366–370. ISSN 0335-7457.
[32] Storrs, F. J.: Alergen of the Year: Fragrance. *Dermatitis*, 2007, vol. 18, no. 1, pp. 3–7. ISSN 1710-3568.
[33] Machovcová, A.: Epikutánní testy. *Dermatologie pro praxi*, 2007, č. 2, s. 64–66. ISSN 1802-2960.
[34] Novotný, F. a kol.: *Ekzémová onemocnění v praxi*. Praha: Grada Avicenum, 1993. 276 s. ISBN 80-7169-067-8.

[35] Bridges, B.: Fragrance: emerging health and environmental concerns. *Flavour and Fragrance Journal*, 2002, vol. 17, no. 5, pp. 361–371. ISSN 0882-5734.
[36] Zeliger, H. I.: Cosmetics: Toxicity and Regulatory Requirements in the US. In Betton, C. I.: *Global Regulatory Issues for the Cosmetics Industry*. William Andrew, 2007, vol. 1, pp. 63–70. ISBN 978-0-8155-1567-8.
[37] The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA): *The 7th Amendment to the EU Cosmetics Directive: Technical Guidance Document on its Implementation* [online]. [cit. 30. 1. 2010]. Dostupné z: <http://www.colipa.eu>.
[38] Pons-Guiraud, A.: Les allergies aux parfums en 2007. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2007, vol. 47, no. 3, pp. 232–236. ISSN 0335-7457.
[39] Chaintreau, A.: Analytical Methods to Determine Potentially Allergenic Fragrance-Related Substance in Cosmetics. In Salvador, A., Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2007. 487 p. ISBN 978-0-444-52260-3.
[40] Vigan, M.: Réglementation européenne des cosmétiques. *EMC – Dermatologie-Cosmétologie*, 2004, vol. 1, no. 3, pp. 154–163. ISSN 1762-5696.
[41] Giménez-Arnau, E.: Qu'est-ce qu'un parfum? Diversité des allergènes et législation européenne. *Revue Française d'Allergologie*, 2009, vol. 49, no. 3, pp. 279–285. ISSN 0335-7457.
[42] Schlede, E., Aberer, W., Fuchs, T., Gerner, I., Lessmann, H., Maurer, T., Rossbacher, R., Stropp, G., Wagner, E., Kayser, D.: Chemical substances and contact allergy – 244 substances ranked according to allergenic potency. *Toxicology*, 2003, vol. 193, no. 3, pp. 219–259. ISSN 0300-483X.
[43] Winter Blaschke, J.: Regulatory Developmenrs in Canada, Japan, Australia, China, and India. In Betton, C. I.: *Global Regulatory Issues for the Cosmetics Industry*. William Andrew, 2007, vol. 1, pp. 21–33. ISBN 978-0-8155-1567-8.
[44] Api, A. M., Vey, M.: Implementation of the dermal sensitization Quantitative Risk Assessment (QRA) for fragrance ingredients. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 53-61. ISSN 0273-2300.
[45] Api, A. M., Basketter, D. A., Cadby, P. A., Cano, M. F., Ellis, G., Gerberick, G. F., Griem, P., McNamee, P. M., Ryan, C. A., Safford, R.: Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 3–23. ISSN 0273-2300.
[46] Salvito, D. T., Vey, M. G. H., Senna, R. J.: Fragrance materials and their environmental impact. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, vol. 19, no. 2, pp. 105–108. ISSN 0882-5734.
[47] Jirousková, J.: *Parfémové kompozice – limitující faktory při jejich tvorbě*. Kosmetologický seminář, České Budějovice, 11.–12. dubna 2006.
[48] Niederer, M., Bollhalder, R., Hohl, Ch.: Determination of fragrance allergens in cosmetics by size-exclusion chromatography followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1132, no. 1–2, pp. 109–116. ISSN 0021-9673.
[49] Leijs, H., Broekhans, J., van Pelt, L., Mussinan, C.: Quantitative Analysis of the 26 Allergens for Cosmetic Labelling in Fragrance Raw Materials and Perfume Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 14, pp. 5487–5491. ISSN 0021-8561.

[50] Dunn, M. S., Vulic, N., Shellie, R. A., Whitehead, S., Morrison, P., Marriott, P. J.: Targeted multidimensional gas chromatography for the quantitative analysis of suspected allergens in fragrance products. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1130, no. 1, pp. 122–129. ISSN 0021-9673.

[51] ISAP (Informační systém pro aproximaci práva): *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 648/2004 ze dne 31. března 2004 o detergentech (Text s významem pro EHP)* [on-line]. [cit. 10. 2. 2010]. Dostupné z: <http://isap.vlada.cz/Kopie/revize.nsf/adaa6414bc304117c1256dc7002e1b61/4971600ee795e374c1257276003610a6/$FILE/32004r0648.pdf>.

[52] Štěpánek, M.: *Legislativní novinky v oblasti parfémových kompozic*. Setkání s obchodními partnery, Piešťany, 11. října 2006.

[53] Kosmetologická společnost ČR Legislativa: *Vyhláška č. 26/2001 Sb.* [online]. [cit. 14. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.kosmetologie.cz>.

[54] Jírová, D.: *Hodnocení bezpečnosti kosmetických prostředků v současnosti a dle nových požadavků bez testů na zvířatech*. Seminář Prokos, Praha, 2007.

[55] Kosmetologická společnost ČR Legislativa: *Vyhláška č. 268/2001 Sb*. [online]. [cit. 14. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.kosmetologie.cz>.

[56] Kosmetologická společnost ČR Legislativa: *Vyhláška č. 444/2004 Sb*. [online]. [cit. 14. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.kosmetologie.cz>.

[57] Kosmetologická společnost ČR Legislativa: *Vyhláška č. 126/2005 Sb*. [online]. [cit. 14. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.kosmetologie.cz>.

[58] Kosmetologická společnost ČR Legislativa: *Vyhláška č. 104/2006 Sb*. [online]. [cit. 14. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.kosmetologie.cz>.

[59] Jírová, D.: *Kosmetické prostředky: Novinky v legislativě ČR a EU*. NRC pro kosmetiku a Státní zdravotní ústav Praha, 8. odborný seminář Prokos, 2006.

[60] Surburg, H., Panten, J.: *Common Fragrances and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, Fifth Completely Revised and Enlarged Edition.* Weinheim (Germany): WILEY-VCH Verlag GmbH, 2006. 330 p. ISBN 3-527-31315-X.

[61] Vonášek, F., Trepková, E., Novotný, L.: *Látky vonné a chuťové*. Praha: SNTL – Státní nakladatelství technické literatury, 1987. 437 s.

[62] Mondello, L., Casilli, A., Quinto Tranchida, P., Dugo, G., Dugo,P.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with rapid scanning quadrupole mass spectrometry in perfume analysis. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1067, no.s 1–2, pp. 235–243. ISSN 0021-9673.

[63] Kosmetologická společnost ČR Legislativa: *Vyhláška č. 494/2005 Sb*. [online]. [cit. 14. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.kosmetologie.cz>.

[64] Wisneski, H. H., Yates, R. L., Davis, H. M.: High-peformance liquid chromatographic-fluorometric determination on cinnamaldehyde in perfume, cologne and toilet water. *Journal of Chromatography A*, 1984, vol. 317, pp. 421–426. ISSN 0021-9673.

[65] Wisneski, H. H., Yates, R. L., Davis, H. M.: *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1988, vol. 71, no. 4, start page 821. ISSN 1060-3271.

[66] Sherma, J., Brubaker, K.: *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC,* 1989, vol. 2, star page 392. ISSN 0933-4173.

[67] Hagvall, L., Bcktorp, C., Svensson, S., Nyman, G., Brje, A., Karlberg, A. T.: Fragrance Compounds Geraniol Forms Contact Allergens on Air Exposure. Identification and Quantification of Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization. *Chemical Research in Toxicology*, 2007, vol. 20, no. 5, pp. 807–814. ISSN 0893-228X.

[68] Wisneski, H. H., Yates, R. L., Wenninger, J. A.: Liquid chromatographic separation and fluorometric determination of cis- and trans-isoeugenol in perfumes, colognes, and toilet waters. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1988, vol. 71, no. 4, pp. 818-820. ISSN 1060-3271.

[69] Bettero, A., Benassi, C.A.: Determination of coumarin and 6-methylcoumarin in cosmetics by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1983, vol. 1, no. 2, pp. 229–233. ISSN 0731-7085.

[70] Wisneski, H. H.: Determination of coumarin in fragrance products by capillary gas chromatography with electron capture detection. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 2001, vol. 84, no. 3, pp. 689–692. ISSN 1060-3271.

[71] Nie, J. F., Wu, H. L., Zhu, S. H., Han, Q. J., Fu, H. Y., Li, S. F., Yu, R. Q.: Simultaneous determination of 6-methylcoumarin and 7-methoxycoumarin in cosmetics using three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration methods. *Talanta*, 2008, vol. 75, no. 5, pp. 1260–1269. ISSN 0039-9140.

[72] de Jager, L. S., Perfetti, G. A., Diachenko, G. W.: Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1145, no. 1–2, pp. 83–88. ISSN 0021-9673.

[73] de Jager, L. S., Perfetti, G. A., Diachenko, G. W.: Comparison of headspace-SPME-GC–MS and LC–MS for the detection and quantification of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products. *Food Chemistry*, 2008, vol. 107, no. 4, pp. 1701–1709. ISSN 0308-8146.

[74] Tavss, E. A., Wiet, S.G., Robinson, R. S., Santalucia, J., Carroll, D. L.: Flavor characterization of dentifrices using kinetic headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1988, vol. 438, pp. 273–280. ISSN 0021-9673.

[75] Sköld, M., Brje, A., Harambasic, E., Karlberg, A. T.: Contact Allergens Formel on Air Exposuer of Linalool. Identification and Quantification of Primary and Secondary Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization. *Chemical Research in Toxicology*, 2004, vol. 27, no. 12, pp. 1697–1705. ISSN 0893-228X.

[76] Chen, Y., Begnaud, F., Chaintreau, A., Pawliszyn, J.. Quantification of perfume compounds in shampoo using solid phase microextraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, vol. 21, no. 5, pp. 822–532. ISSN 0882-5734.

[77] Hiserodt, R. D., Swijter, D. F. H., Mussinan, C. J.: Identification of atranorin and related potential allergens in oakmoss absolute by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 888, no. 1–2, pp. 103–111. ISSN 0021-9673.

[78] Rastogi, S. C.: Analysis of fragrances in cosmetics by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1995, vol. 18, no. 10, pp. 653–658. ISSN 0935-6304.

[79] Rastogi, S. C., Johansen, J. D., Frosch, P., Menné, T., Bruze, M., Lepoittevin, J. P., Dreier, B., Andersen, K. E., White, I. R.: Deodorants on the European market: quantitative chemical analysis of 21 fragrances. *Contact Dermatitis*, 1998, vol. 38, no. 1, pp. 29–35. ISSN 0105-1873.

[80] Rastogi, S. C., Lepoittevin, J. P., Johansen, J. D., Frosch, P. J., Menne, T., Bruze, M., Dreier, B., Andersen, K. E., White, I. R.: Fragrances and other materials in deodorants: search for potentially sensitizing molecules using combined GC-MS and structure activity relationship (SAR) analysis. *Contact Dermatitis*, 1998, vol. 39, no. 6, pp. 293–303. ISSN 0105-1873.

[81] Rastogi, S. C.: Allergens in perfumes: gas chromatography-mass spectrometry. *Academic Press* [online]. 2000, pp. 1974–1981. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.thevespiary.org/sedit/Crystalization,%20Purification,%20Separation/Encyclopedia%20of%20Separation%20Science/Level%20III%20-%20Practical%20Applications/ALLERGENS%20IN%20PERFUMES%20-%20GAS%20CHROMATOGRAPHY-MASS%20SPECTROMETRY.pdf>.

[82] Marriott, P. J., Shellie, R., Cornwell, C.: Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 936, no. 1–2, pp. 1–22. ISSN 0021-9673.

[83] Rastogi, S. C., Heydorn, S., Johansen, J. D., Basketter, D. A.: Fragrance chemicals in domestic and occupational products. *Contact Dermatitis*, 2001, vol. 45, no. 4, pp. 221–225.

[84] Rastogi, S. C.: Survey of chemical compounds in consumer products. *Survey* [online]. 2002, no. 8. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.mst.dk/NR/rdonlyres/33DCEF27-F0ED-4FE1-AF0A-1E8B4DF52BF3/0/8.pdf>.

[85] Högnadóttir, Á., Rouseff, R. L.: Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 998, no. 1–2, pp. 201–211. ISSN 0021-9673.

[86] Chaintreau, A., Joulain,D., Marin, C., Schmidt, C. O., Vey, M.: *GC-MS quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. 1. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 22, pp. 6398–6403. ISSN 0021-8561.

[87] Gross, J. H.: *Mass Spectrometry. A Textbook*. Berlin: Springer, 2004. 518 p. ISBN 3-540-40739-1.

[88] Baier, H. U.: The Determination of Allergens in Fragrance Products Fast GC-MS with narrow bore Columns. *LC-GC Europe*, 2005, vol. 49, start page 2. ISSN 1471-6577.

[89] Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K. H. C., Bedir, E., Khan, I. A., Wedge, D. E.: Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from Pimpinella species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1117, no. 2, pp. 194–205. ISSN 0021-9673.

[90] David. F., Devos, C., Sandra, P.: Method Selection for the Determination of Suspected Allergens in Essentials Oils, Flavour, Fragrances and Cosmetics. *LC-GC Europe* [online]. November no., 2006. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://gerstelus.com/data/Allergens.pdf>.

[91] Kinani, S., Bouchonnet, S., Magne, A.: Détection et dosage de composés allergènes dans des compositions de parfumerie par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Spectra Analyse*, 2006, vol. 35, no. 248, pp. 28–38. ISSN 1635-947X.

[92] LECO Corporation: *Determination of Volatile Components in Consumer Products Using Automated SPME and High-Speed GC-TOFMS* [online]. 2008, Form no. 203-821-282, 4/08 – REV1. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.leco.com/index4.htm>.

[93] Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. B., Geissler, M.: Aroma compound analysis of Piper nigrum and Piper guineense essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 976, no. 1–2, pp. 265–275. ISSN 0021-9673.

[94] Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D., Rossi, M. C.: Headspace solid–phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry analysis of the volatile compounds of Evodia species fruits. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1087, no. 1–2, pp. 265–273. ISSN 0021-9673.

[95] Song, G., Xiao, J., Deng, C., Zhang, X., Hu, Y.: Use of Solid-Phase Microextraction as a Sampling Technique for the Characterization of Volatile Compounds Emitted from Chinese Daffodil Flowers. *Journal of Analytical Chemistry*, 2007, vol. 62, no. 7, pp. 674–679. ISSN 1061-9348.

[96] Mondello, L., Sciarrone, D., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P., Dugo, G.: Fast gas chromatography-full scan quadrupole mass spectrometry for the determination of allergens in fragrances. *Journal of Separation Science*, 2007, vol. 30, no. 12, pp. 1905–1911. ISSN 1615-9306.

[97] Kim, H. J., Kim, K., Kim, N. S., Lee, D. S.: Determination of floral fragrances of Rosa hybrida using solid-phase trapping-solvent extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 902, no. 2, pp. 389–404. ISSN 0021-9673.

[98] Heravi, M. J., Sereshti, H.: Determination of essential oil components of Artemisia haussknechtii Boiss. using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1160, no. 1–2, pp. 81–89. ISSN 0021-9673.

[99] Isidorov, V. A., Zenkevich, I. G., Dubis, E. N., Slowikowski, A., Wojciuk, E.: Group identification of essential oils components using partition coefficients in a hexane–acetonitrile system. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 814, no. 1–2, pp. 253–260. ISSN 0021-9673.

[100] Lukić, I., Banović, M., Peršurić, Đ., Radeka, S., Sladonja, B.: Determination of volatile compounds in grape distillates by solid-phase extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1101, no. 1–2, pp. 238–244. ISSN 0021-9673.

[101] Holt, R. U.: Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 937, no. 1–2, pp. 107–114. ISSN 0021-9673.

[102] Bianchi, G., Nuzzi, M., Leva, A. A., Rizzolo, A.: Development of a headspace-solid phase micro extraction method to monitor changes in volatile profile of rose (Rosa hybrida, cv David Austin) petals during processing. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1150, no. 1–2, pp. 190–197. ISSN 0021-9673.

[103] Chen, Y., Begnaud, F., Chaintreau, A., Pawliszyn, J.: Analysis of flavor and perfume using an internally cooled coated fiber device. *Journal of Separation Science*, 2007, vol. 30, no. 7, pp. 1037–1043. ISSN 1615-9306.

[104] White, E. L., Uhrig, M. S., Johnson, T. J., Gordon, B. M., Hicks, R. D., Borgerding, M. F., Coleman, W. M., Elder, J. F. Jr.: Quantitative determination of selected compounds in a Kentucky 1R4F reference cigarette smoke by multidimensional gas chromatography and selected ion monitoring-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 1990, vol. 28, no. 8, pp. 393–399. ISSN 0021-9665.

[105] David, F., Tienpont, B., Sandra, P.: *23èmes Journées Internationales des Huiles Essentielles*. New Developments for the Analysis of Allergens in Essential Oil and in Cosmetic Products, Digne-les-Bains, France, 2004.

[106] Liu, Z., Philips, J. B.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatografic Science*, 1991, vol. 29, pp. 227–231. ISSN 0021-9665.

[107] Ong, R. C. Y., Marriott, P. J.: A Review of Basic Concepts in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 2002, vol. 40, no. 5, pp. 276–291. ISSN 0021-9665.

[108] Shellie, R., Marriott, P.: Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, 2003, vol. 18, no. 3, pp. 179–191. ISSN 0882-5734.

[109] Blumberg, L. M.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography: metrics, potentials, limits. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 985, no. 1–2, pp. 29–38. ISSN 0021-9673.

[110] Debonneville, C., Thomé, M. A., Chaintreau, A.: Hyphenation of Quadrupole MS to GC and Comprehensive Two-Dimensional GC for the Analysis of Suspected Allergens: Review and Improvement. *Journal of Chromatographic Science*, 2004, vol. 42, no. 8, pp. 450–455. ISSN 0021-9665.

[111] Debonneville, C., Chaintreau, A.: Quantitation of suspected allergens in fragrances: Part II. Evaluation of comprehensive gas chromatography–conventional mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1027, no. 1–2, pp. 109–115. ISSN 0021-9673.

[112] Cordero, C., Bicchi, C., Joulain, D., Rubiolo, P.: Identification, quantitation and method validation for the analysis of suspected allergens in fragrances by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry and with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1150, no. 1–2, pp. 37–49. ISSN 0021-9673.

[113] Wu, J., Lu, X., Tang, W., Kong, H., Zhou, S., Xu, G.: Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry in the analysis of volatile oil of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1034, no. 1–2, pp. 199–205. ISSN 0021-9673.

[114] LECO Separation Science: *Quantitative Analysis of Allergens in Perfumes Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry* [online]. 2004, Application Note no. 203-821-237. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.leco.com>.

[115] Özel, M. Z., Göğüş, F., Lewis, A. C.: Comparison of direct thermal desorption with water distillation and superheated water extraction for the analysis of volatile components of Rosa damascena Mill. using GCxGC-TOF/MS. *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 566, no. 2, pp. 172–177. ISSN 0003-2670.

[116] Shellie, R., Marriott, P., Chaintreau, A.: Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control. *Flavour and Fragrance Journal*, 2004, vol. 19, no. 2, pp. 91–98. ISSN 0882-5734.

[117] Bossi, R., Rastogi S. C., Bernard, G.,Gimenez-Arnau, E., Johansen, J. D., Lepoittevin, J. P., Menné, T.: A liquid chromatography-mass spectrometric method for the determination of oak moss allergens atranol and chloroatranol in perfumes. *Journal of Separation Science*, 2004, vol. 27, no. 7–8, pp. 537–540. ISSN 1615-9306.

[118] Rastogi, S. C., Bossi, R., Johansen, J. D., Menné, T., Bernard, G., Giménez-Arnau, E., Lepoittevin, J. P.: Content of oak moss allergens atranol and chloroatranol in perfumes and similar products. *Contact Dermatitis*, 2004, vol. 50, no. 6, pp. 367–370. ISSN 0105-1873.

[119] Lübke, M., le Quéré, J. L., Barron, D.: Normal-phase high-performance liquid chromatography of volatile compounds. Selectivity and mobile phase effects on polar bonded silica. *Journal of Chromatography A*, 1995, vol. 690, no. 1, pp. 41–54. ISSN 0021-9673.

[120] Villa, C., Gambaro, R., Mariani, E., Dorato, S.: High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 44, no. 3, pp. 755–762. ISSN 0731-7085.

[121] Benzo, M., Gilardoni, G., Gandini, C., Caccialanza, G., Finzi, P.V.,Vidari, G.,Abdo, S., Layedra, P.: Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography–olfactometry incremental dilution technique. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1150, 2007, no. 1–2, pp. 131–135. ISSN 0021-9673.

[122] IFRA: *Analytical procedure. GC/MS Quantitation of potential fragrance allergens in fragrance compounds* [online]. September 25, 2003, Version 1. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:5LEJFQLpxaMJ:www.ifraorg.org/01/MyDocuments/IL683_att_AnalyticalProcedureFragAllerfinal(1).pdf/download+IL683_att_AnalyticalProcedureFragAllerfinal(1)&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESh5Zw1SWfqZjd9KzF9_kpwXDMrt8OHU40FSpTChM04m2x2a8UrEHsAxPOyJ4SMgC2I8TllrFpJPIv5rHzunB0wLCUXvgAdRrfnOKulAmEwqUr2elMaPHLFFRALRI_FZ3BE0wN3U&sig=AHIEtbRz03pD_SM5SVQj5Z0FTmXO9O3Sfw>.

[123] Wisneski, H. H.: Determination of bergapten in fragrance preparations by thin layer chromatography and spectrophotofluorometry. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1976, vol. 59, no. 3, pp. 547–551. ISSN 1060-3271.

[124] Bettero, A., Benassi, C. A.: Determination of bergapten and citropten in perfumes and suntan cosmetics by high-performance liquid chromatography and fluorescence. *Journal of Chromatography A*, 1983, vol. 280, pp. 167–171. ISSN 0021-9673.
[125] Wisneski, H. H., Yates, R. L., Davis, H. M.: High-performance liquid chromatographic—fluorometric determination of safrole in perfume, cologne and toilet water. *Journal of Chromatography A*, 1983, vol. 255, pp. 455–461. ISSN 0021-9673.
[126] Wisneski, H. H., Yates, R. L., Davis, H. M.: *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1982, vol. 65, star page 598. ISSN 1060–3271.
[127] Bruze M., Edman, B., Niklasson, B., Möller, H.: Thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography of musk ambrette and other nitromusk compounds including photopatch studies. *Photodermatology*, 1985, vol. 2, no. 5, pp. 295–302. ISSN 0905-4383.
[128] Sommer, C.: *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 1993, vol. 89, pp. 108–111. ISSN 0012-0413.
[129] Goh, C. L., Kwok, S. F.: A simple method of qualitative analysis for musk ambrette, musk ketone and musk xylene in cologne. *Contact Dermatitis*, 1986, vol. 14, no. 1, pp. 53–56. ISSN 0105-1873.
[130] Porcu, M., Spanneda, L.: *Journal of Commodity Science*, 1988, vol. 27, pp. 175–185. ISSN 1593–2052.
[131] Wisneski, H. H.: Determination of musk ambrette, musk xylol, and musk ketone in fragrance products by capillary gas chromatography with electron capture detection. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 2001, vol. 84, no. 2, pp. 376–381. ISSN 1060-3271.
[132] Sommer, C., Juhl, H.: Bestimmung makrozyklischer Moschus-Verbindungen in alkoholhaltigen. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 2004, vol. 100, no. 6, start page 224. ISSN 0012-0413.
[133] Demers, F. X., Yates, R. L., Davis, H. M.: *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 1987, vol. 70, start page 958. ISSN 1060-3271.
[134] Sherma, J., Pilgrim, M.: *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 1988, vol. 1, star page 360. ISSN: 0933-4173.
[135] Yates, R. L., Wenninger, J. A.: Fluorometric determination of benzylideneacetone in fragrance products by liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1988, vol. 71, no. 5, pp. 965–967. ISSN 1060-3271.
[136] Anderton, S. M., Sherma, J.: Quantitative Thin Layer Chromatographic Determination of Benzylideneacetone in Fragrance Products. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 1996, vol. 9, no. 2, star page 136. ISSN 0933-4173.
[137] Trivedi, R. J.: *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1988, vol. 71, star page 36. ISSN 1060-3271.
[138] Zhang, X. G., Tang, B., Liu, S. Q., Jiang, C. Q.: *Fenxi Shiyanshi*, 1996, vol. 15, start page 50. ISSN 1000-0720.
[139] Coleman, W. M., Perfeti, T. A., Suber, R. L. Jr.: *Journal of Chromatographic Science*, 1998, vol. 36, start page 318. ISSN 0021-9665.
[140] Hancock, W., Rose, B. A., Singer, D. D.: *Analyst*, 1966, vol. 91, start page 449. ISSN 0003-2654.
[141] Godly, E. W., Mortlock, A. E.: *Analyst*, 1973, vol. 98, start page 493. ISSN 0003-2654.

[142] Koo, H., Lee, B.: Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2004, vol. 67, no. 23–24, pp. 1901–1914. ISSN 1528-7394.
[143] Chen, H., Wang, C., Wang, X., Hao, N., Liu, J.: Determination of phthalate esters in cosmetics by gas chromatography with flame ionization detection and mass spectrometric detection. *International Journal of Cosmetic Science*, 2005, vol. 27, no. 4, pp. 205–210. ISSN 0142-5463.
[144] Hubinger, J. C., Havery, D. C.: Analysis of consumer cosmetic products for phthalate esters. *Journal of Cosmetic Science*, 2006, vol. 57, no. 2, pp. 127–138. ISSN 1525-7886.
[145] Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
[146] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
[147] Opekar, F. a kol.: *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-0553-1.
[148] Volka, K. a kol.: *Analytická chemie II*. Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
[149] Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
[150] Pawliszyn, J.: *Solid phase microextraction: theory and practise*. New York: Wiley-VCH Inc., 1997. 247 p. ISBN 0-471-19034-9.
[151] Sigma-Aldrich : *Mikroextrakce tuhou fází SPME* [online]. [cit. 20. 3. 2010]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/11.Par.0001.File.tmp/11.pdf>.
[152] Steffen, A., Pawliszyn, J.: Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Mictroextraction. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 1996, vol. 44, no. 8, pp. 2187–2193. ISSN 0021-8561.
[153] Popp, P., Paschke, A.: Solid-Phase Mictroextraction of Volatila Organic Compounds Using Carboxen-Polydimethylsiloxane Fibers. *Chromatographia*, 1997, vol. 46, no. 7/8, pp. 419–424. ISSN 0009-5893.
[154] Barták, P., Bednář, P., Čáp, L., Ondráková, L., Stránský, Z.: SPME – A valuable tool for investigation of flower scent. *Journal of Separation Science*, 2003, vol. 26, pp. 715–721. ISSN 1615-9306.
[155] Pawliszyn, J., Pawliszyn, B., Pawliszyn, M.: Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, 1997, vol. 2, no. 4, pp. 1–7. ISSN 1430-4171.
[156] Augusto, F., Valente, A. L. P.: Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in analytical chemistry*, 2002, vol. 21, no. 6+7, pp. 428–438. ISSN 0165-9936.
[157] Theodoris, G. a kol.: *Solid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B, Vol. 745, 2000, Pp. 49-82. ISSN 1570-0232.
[158] Chen, Y., Begnaud, F., Chaintreau, A., Pawliszyn, J.: Quantification of perfume compounds in shampoo using solid-phase microextraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, vol. 21, no. 5, pp. 822–832. ISSN 0882-5734.

[159] Mothlag, S., Pawliszyn, J.: Online Monitoring of Flowing Samples Using Solid-Phase Microextraction Gas-Chromatogrpahy. *Analytica Chimica Acta*, 1993, vol. 284, no. 2, pp. 265–273. ISSN 0003-2670.
[160] Zhang, Z. Y., Yang, M. J., Pawliszyn, J.: Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 1994, vol. 66, no. 17, pp. A844–A853. ISSN 1061-9348.
[161] Ai, J.: Solid Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Analytical Chemistry*, 1997, vol. 69, no. 6, pp. 1230–1236. ISSN 1061-9348.
[162] Mills, G. A., Walker, V.: Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 902, no. 1, pp. 267–287. ISSN 0021-9673.
[163] Snow, N. H., Slack, G. C.: Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends in analytical chemistry*, 2002, vol. 21, no. 9+10, pp. 608–617. ISSN 0165-9936.
[164] Lord, H., Pawliszyn, J.: Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 885, no.s 1-2, pp. 153–193. ISSN 0021-9673.
[165] Suchánek, M., Plzák, Z., Šubrt, P., Koruna, I.: *Validace analytických metod*. *Kvalimetrie: řada příruček pro laboratoře. 7*. Praha: EURACHEM-ČR, 1997. 137 s. ISBN 80-901868-2-3.
[166] Barek, J. a kol. (Terminologická komise): Nomenklatura a terminologie. Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*, 2000, roč. 94, s. 439–444. ISSN 0009-2770.
[167] Kratochvíla, J., Friedecký, B., Plzák, Z.: *Požadavky na validace z hlediska norme souvisejících s akreditačními procesy v klinické laboratoři*. Akademie věd České republiky, Seminář Poděbrady, duben 2004.
[168] Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, F. X.: Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, no. 2, pp. 137–145. ISSN 0165-9936.
[169] Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. L., McDowall, R. D.: Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, vol. 17, no. 2, pp. 193–218. ISSN 0731-7085.
[170] Araujo, P.: Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 2009, vol. 877, no. 23, pp. 2224–2234. ISSN 1570-0232.
[171] *Validační program pro statistické zpracování analytických dat* [online]. [cit. 10. 2. 2010]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/index.htm> <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf>.
[172] Hendl, J.: *Přehled statistických metod zpracování dat*. Praha: Portál, 2004. 584 s. ISBN 80-7178-820-1.
[173] Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E.: Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, no. 8, pp. 535–552. ISSN 0165-9936.
[174] Mokáňová, R.: *Analýza vonných látek v kosmetických prostředcích metodou plynové chromatografie*. Brno, 2009. 92 s. Diplomová práce na Fakultě chemické VUT v Brně. Vedoucí diplomové práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.
[175] Jelínková, M.: *Stanovení vonných látek rostlinného původu v potravinách*. Brno, 2009. 79 s. Diplomová práce na Fakultě chemické VUT v Brně. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
[176] Kratochvíl, F.: *Pasporty alergenů* [online]. Fragrance. [cit. 25. 10. 2009]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/default.asp?inc=vyh>.

[177] Sigma-Aldrich: *Flavors & Fragrances. Alphabetical Listings* [online]. Product Catalog, Sigma-Aldrich, 2010. [cit. 25. 10. 2009]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/life-science-catalog/product-catalog.html?TablePage=11553406>.

[178] Bickers, D. R., Calow, P., Greim, H. A., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J. H., Sipes, I. G., Smith, R. L., Tagami, H.: The safety assessment of fragrance materials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, vol. 37, no. 2, pp. 218–273. ISSN 0273-2300.

[179] Scheman, A., Jacob, S., Zirwas, M., Warshaw, E., Nedorost, S., Katta, R., Cook, J., Castanedo-Tardan, M. P.: Contact Allergy: Alternatives for the 2007 North American Contact Dermatitis Group (NACDG) Standard Screening Tray. *Disease-a-Month*, 2008, vol. 54, no. 1–2, pp. 7–156. ISSN 0011-5029.

[180] Cocchiara, J., Letizia, C. S., Lalko, J., Lapczynski, A., Api, A. M.: Fragrance material review on cinnamaldehyde. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, vol. 43, no. 6, pp. 867–923. ISSN 0278-6915.

[181] Lalko, J., Api, A. M.: Citral: Identifying a threshold for induction of dermal sensitization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, vol. 52, no. 1, pp. 62–73. ISSN 0273-2300.

[182] Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Letizia, C. S., Api, A. M.: Fragrance material review on dl-citronellol. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 11, pp. S103–S109. ISSN 0278-6915.

[183] Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Foxenberg, R. J., Letizia, C. S., Api, A. M.: Fragrance material review on geraniol. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 11, pp. S160-S170. ISSN 0278-6915.

[184] Letizia, C. S., Cocchiara, J., Lalko, J., Api, A. M.: Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, vol. 41, no. 7, pp. 943–964. ISSN 0278-6915.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AES	atomová emisní spektroskopie *Atomic Emission Spectroscopy*
AICS	Australský seznam chemických substancí *Australian Inventory of Chemical Substances*
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
ARTG	Australský registr terapeutického zboží *Australian Register of Therapeutic Goods*
BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen, xylen
CAS č.	CAS registrační číslo *Chemical Abstracts Service (CAS) Registry Number*
CE	kapilární elektroforéza *Capillary Electrophoresis*
CE-MS	kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*
CI	chemická ionizace *Chemical Ionization*
CPSC	Komise pro bezpečnost spotřebitelských výrobků *U.S. Consumer Product Safety Commission*
DAD	detektor diodového pole *Diode Array Detector*
DI	přímá extrakce *Direct Extraction*
DRIFTS	difúzní reflektance *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*
EC	Evropská komise *European Commission*
EC č.	EC číslo *European Commission Number*
EEC	Evropské hospodářské společenství *European Economic Community*
EHS	Evropské hospodářské společenství
EEM	excitačně-emisní maticová fluorescence *Excitation-Emission Matrix Fluorescence*
EI	elektronová ionizace *Electron Ionziation*
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací *Electron Ionziation-Mass Spectrometry*
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí *U.S. Environmental Protection Agency*
ES	Evropské společenství
ESI	ionizace elektrosprejem *Electrospray Ionization*

ET	epikutánní test *Patch Test*
EU	Evropská unie *European Union*
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv *U.S. Food and Drug Administration*
FD&C Act	Zákon o potravinách, léčivech a kosmetice *Food, Drugs and Cosmetics Act*
FID	plamenově ionizační detektor *Flame Ionization Detector*
FT-IR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací *Fourier Transform Infrared Spectrometry*
GC	plynová chromatografie *Gas Chromatography*
GC-AES	plynová chromatografie s atomovou emisní spektrometrií *Gas Chromatography-Atomic Emission Spectrometry*
GC-CI-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s chemickou ionizací *Gas Chromatography-Chemical Ionization-Mass Spectrometry*
GC-ECD	plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu *Gas Chromatography-Electron Capture Detector*
GC-EI-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s elektronovou ionizací *Gas Chromatography-Electron Ionziation-Mass Spectrometry*
GC-FID	plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*
GC-FTIR	plynová chromatografie infračerveným spektroskopem s Fourierovou transformací *Gas Chromatography-Infrared Spectroscopy with Fourier Transformati*on
GC×GC	orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography*
GC×GC-FID	orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*
GC×GC-qMS	orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s kvadrupólovým analyzátorem *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Quadrupole-Mass Spectrometry*
GC×GC-TOF-MS	orthogonální dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátorem *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry*
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*

GC-MS/MS	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií *Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
GC-O	plynová chromatografie-olfaktometrie (*Sniffing* analýza) *Gas Chromatography-Olfactometry*
GC-qMS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s kvadrupólovým analyzátorem *Gas Chromatography-Quadrupole-Mass Spectrometry*
GC-UV/VIS	plynová chromatografie s UV/VIS spektroskopií *Gas Chromatography-Ultraviolet/Visible-Spectroscopy*
HS	headspace
HS-GC	headspace plynová chromatografie *Headspace-Gas Chromatography*
HS-GC-FID	headspace plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem *Headspace-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*
HS-SPME-GC-FID	headspace mikroextrakce tuhou fází s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem *Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*
HS–SPME-GC-MS	headspace mikroextrakce tuhou fází s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem *Headspace-Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
HS-GC-TOF-MS	vysoce rychlostní plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátorem *High Speed-Gas Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry*
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie *High Performance Liquid Chromatography*
HPLC-APCI	vysoce účinná kapalinová chromatografie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku *High Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
HPLC-ESI	vysoce účinná kapalinová chromatografie s ionizací elektrosprejem *High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization*
HPLC-GC	vysoce účinná kapalinová chromatografie s plynovou chromatografií *High Performance Liquid Chromatography-Gas Chromatography*
HPLC-MS	vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*
HPLC-MS/MS	vysoce účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*
HPLC-NMR	vysoce účinná kapalinová chromatografie s nukleární magnetickou rezonancí *High Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance*

HPLC-PB	vysoce účinná kapalinová chromatografie s rozprášením proudem plynu *High Performance Liquid Chromatography-Particle Beam*
HPLC-TSP	vysoce účinná kapalinová chromatografie s termosprejem *High Performance Liquid Chromatography-Thermospray*
HPLC-UV/VIS	vysoce účinná kapalinová chromatografie s UV/VIS spektroskopií *High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet/Visible-Spectroscopy*
IFRA	Mezinárodní asociace pro výzkum aromatických látek *International Fragrance Research Association*
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických ingrediencí *International Nomenclature for Cosmetic Ingredients*
IR	infračervená spektroskopie *Infrared Spectroscopy*
IRMS	hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů *Isotope Ratio Mass Spektrometry*
L_k	rozpustnost látky v ethanolu; k = obsah ethanolu (% obj.)
LC	kapalinová chromatografie *Liquid Chromatography*
LC-FL	kapalinová chromatografie s fluorimetrickou detekcí *Liquid Chromatography-Fluorimetric Detector*
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií *Liquid Chromatography-Mass spectrometry/Mass Spectrometry*
LC-UV/VIS	kapalinová chromatografie s UV/VIS spektroskopií *Liquid Chromatography-Ultraviolet/Visible-Spectroscopy*
LLNA	test lokálních lymfatických uzlin *Local Lymph Node Assay*
LOD	mez detekce *Limit of Detection*
LOQ	mez stanovitelnosti *Limit of Quantification*
MDGC	multidimensionální plynová chromatografie *Multidimensional Gas Chromatography*
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie *Micellar Electrokinetic Chromatography*
MS	hmotnostní spektrometrie *Mass Spectrometry*
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie *Tandem Mass Spectrometry*
NHPs	přírodní produkty pro zdraví *Natural Health Products*
NICNAS	Národní ohlašování chemických látek a scénáře hodnocení zdravotních rizik *National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme*

NIR	spektroskopie v blízké infračervené části spektra *Near Infrared Spectroscopy*
OPLC	chromatografie na tenké vrstvě za zvýšeného tlaku *Overpressured Layer Chromatography*
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*
PASs	potenciálně alergenní látky *Potentially Allergenic Substances*
PB	rozprášení proudem plynu *Particle Beam*
PDMS	polydimethylsiloxan *Polydimethylsiloxane*
PY	pyrolytický *Pyrolysis*
PY-GC-MS	pyrolytická plynová chromatografie s hmotnostní detekcí *Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
qMS	hmotnostní spektrometrie s kvadrupólovým analyzátorem *Quadrupole-Mass Spectrometry*
QRA	přístup Kvantitativního zhodnocení rizika *Quantitative Risk Assessment*
REXPAN	Panel expertů RIFM *Expert Panel of RIFM*
RIFM	Výzkumný ústav aromatických látek *Research Institute for Fragrance Materials*
ROAT	test opakované aplikace *Repeated Open Application Test*
RP-HPLC-DAD	rychlá vysoce účinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového polem *High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector*
RSD	relativní směrodatná odchylka
SAF	senzibilizační hodnotící faktory *Sensitization Assessment Factors*
SBSE	mikroextrakce na magnetickém míchadle *Stir Bar Sorptive Extraction*
SCCPNFP	Vědecký výbor pro kosmetické prostředky a nepotravinové výrobky *Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Product*s
SEC-GC-MS	gelová permeační chromatografie s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem *Size Exclusion Chromatography-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
SFC	superkritická fluidní chromatografie *Supercritical Fluid Chromatography*
SFC-UV/VIS	superkritická fluidní chromatografie s UV/VIS spektroskopií *Supercritical Fluid Chromatography-Ultraviolet/Visible Spectroscopy*
SFE	superkritická fluidní extrakce *Supercritical Fluid Extraction*

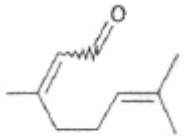
SHD-SHLPME-GC-MS	kombinace hydrodestilace se statickou headspace mikroextrakcí kapalnou fází v propojení s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem *Simultaneous Hydrodistillation-Static Headspace Liquid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
SNIF-NMR	přirozená frakcionace izotopů pomocí nukleární magnetické rezonance *Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance*
SPE-GC-FID	extrakce tuhou fází s plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem *Solid Phase Extraction-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*
SPME	mikroextrakce tuhou fází *Solid Phase Microextraction*
SPTE	extrakce tuhou fází s rozpouštědlem *Solid Phase Trapping Solvent Extraction*
SPTE-GC-MS	extrakce tuhou fází s rozpouštědlem s plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem *Solid Phase Trapping Solvent Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
TCD	tepelně vodivostní detektor *Thermal Conductivity Detector*
TLC	chromatografie na tenké vrstvě *Thin Layer Chromatography*
TLC-FD	chromatografie na tenké vrstvě s fluorescenční denzitometrií *Thin Layer Chromatography-Fluorescence Densitometry*
TLC-FL	chromatografie na tenké vrstvě s fluorimetrickou detekcí *Thin Layer Chromatography-Fluorimetric Detector*
TLC-UAD	chromatografie na tenké vrstvě s ultrafialovou absorpční denzitometrií *Thin Layer Chromatography-Ultraviolet Absorption Densitometry*
TOF	průletový analyzátor (analyzátor doby letu) *Time of Flight*
TSP	termosprej *Thermospray*
UAD	ultrafialová absorpční denzitometrie *Ultraviolet Absorption Densitometry*
USA	Spojené státy americké *United States of America*
UVA	ultrafialové paprsky A *Ultraviolet A rays*
UV/VIS	ultrafialový/viditelný *Ultraviolet/Visible*
VOCs	těkavé organické sloučeniny *Volatile Organic Compounds*

8 PŘÍLOHY

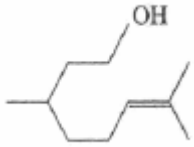
Příloha I Vlastnosti ostatních identifikovaných alergenních vonných látek ***(Tab. I–VII)***.
Příloha II Chromatogramy reálných vzorků kosmetických přípravků ***(Graf I–X)***.
Příloha III Seznam 26 ingrediencí určených SCCNFP k uvedení na etiketě ***(Tab. VIII)***.

Příloha I Vlastnosti ostatních identifikovaných alergenních vonných látek

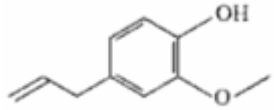
Tab. I *Vlastnosti Citralu* [31; 41; 61; 176; 177; 178; 181]

Název podle INCI	***Citral***	
Struktura		
Synonyma	Citral; 3,7-dimethyl-2,6-octadienal; geranialdehyde; 3,7-dimethylokta-2,6-dienal; lemonal; neral; geranial; citronal.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{16}O$
	CAS č.	5392-40-5
	EC č.	226-394-6
	Mol. hmotnost	152,24 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	olejovitá kapalina nažloutlé barvy; příjemná citronová vůně a nahořklá chuť
	Bod varu	104–107 °C
	Bod vzplanutí	103 °C
	Hustota (ρ)	0,885–0,895 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	dobře mísitelný s ethanolem a s etherem
	Rozpustnost v ethanolu (L_{70})	1:2
Výroba	synteticky oxidací geraniolu nebo linaloolu, popřípadě z geranylchloridu; přesmykem dehydrolinaloolu; izoluje se ze silic (z lemongrasové a *Litsea cubeba*); z citronového oleje kyselým siřičitanem; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Citral (nenasycený terpenický aldehyd) se vyskytuje ve dvou izomerech (geranial a neral). Kondenzací citralu s acetonem a následnou cyklizací se připravuje směs jononů (aromatické sloučeniny s vůní po fialkách a malinách). Geranial je obsažen v citrusových plodech (v citronové silici tvoří až 80 %) a olejích dalších rostlin. Je přítomen např. v: • citrusových olejích, • kosmetice –citronová vůně, • čajových směsích, • různých výrobcích ke korekci zápachu, • insekticidních atraktantech, • potravinářských aromatech.	

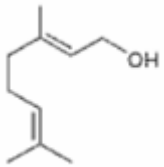
Tab. II *Vlastnosti Citronellolu* [31; 41; 61; 176; 177; 182]

Název podle INCI	***Citronellol***	
Struktura		
Synonyma	Citronellol; dihydrogeraniol, 3,7-dimethyl-6-octen-1-ol; 2,6-dimethyl-2-octen-8-ol; 3,7-dimethylokt-6-en-1-ol; 3,7-dimethyl-6-okten-1-ol; cefrol; rhodinol; cephrol.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{20}O$
	CAS č.	106-22-9
	EC č.	203-375-0
	Mol. hmotnost	156,27 g·mol˙1
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá až světle žlutá olejovitá kapalina se zajímavou nasládlou vůní květů růže, kůže, stařinky a s jemnou nuancí citrusů
	Bod varu	106–108 °C
	Bod vzplanutí	77 °C
	Hustota (*ρ*)	0,850–0,860 g·cm^{-3}
	Rozpustnost	mísitelný s ethanolem a s petrolejem, nerozpustný ve vodě
Výroba	zisk destilací listů rostlin; výroba redukcí geraniolu, citralu nebo citronellalu; opticky aktivní je syntetizován z pinenu; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Přodní acyklický monoterpenoid (alkohol) přítomný ve více než 30 rostlinných olejích, v černém čaji a mnoha druzích ovoce (např. citrusy). V přírodním citronellovém oleji, známém ve dvou varietách jako Ceylonský nebo Jávský olej, se vyskytuje ve formě (+)citronellolu (pravotočivý). Ve formě (-)citronellolu (levotočivý) je přítomen např. v růžovém nebo geraniovém oleji. Přidává se jako vonná látka do mnoha výrobků. Je přítomen např. v: • mnoha přírodních rostlinných olejích, • kosmetice (používá se do parfémových kompozic typu růže, geránie aj.), • potravinářských aromatech, • čajových směsích a některých exotických nápojích, • různých výrobcích ke korekci zápachu, • insekticidních atraktantech a pesticidech.	

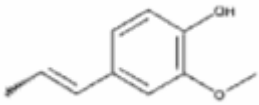
Tab. III *Vlastnosti Eugenolu* [31; 41; 61; 176; 177]

Název podle INCI	***Eugenol***	
Struktura		
Synonyma	Eugenol; 4-allylbenzkatechin-2-methyläther; 4-hydroxy-3-methoxy-1-allyl-benzol; 4-allylkatechol-2-methyl ether; 4-allyl-2-methoxyphenol; 2-methoxy-4(2-propenyl)-phenol; 4-allyl-2-methoxy phenol caryophyllic acid; 1-hydroxy-2-methoxy-4-prop-2-enylbenzene; 4-allylguajakol; eugenic acid; 4-allylguaiacol.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{12}O_2$
	CAS č.	97-53-0
	EC č.	202-589-1
	Mol. hmotnost	164,21 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá kapalina hnědnoucí na vzduchu a na světle; voní hřebíčkem a karafiátem
	Bod varu	121 °C
	Bod vzplanutí	110 °C
	Hustota (ρ)	1,071–1,074 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný v ethanolu, v chloroformu, v etheru a v oleji, prakticky nerozpustný ve vodě
	Rozpustnost v ethanolu (L_{50})	1:6
Výroba	alkalickou extrakcí či destilací hřebíčkové silice nebo synteticky z guajakolu a allylchloridu nebo allylalkoholu; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Eugenol (fenol) patří mezi rozšířené aromatické substance. Má antiseptické, antibakteriální a bolest tišící účinky. Je součástí karafiátového a skořicového oleje. Je přítomen v muškátovém oříšku a v hřebíčkové silici. V parfumerii se využívá do orientálních a karafiátových vůní. Dále se využívá do aromat pro zubní pasty a ústní vody, kde současně působí dezinfekčně, a k výrobě kořenitých aromat; ve farmacii a k výrobě vanilinu. Kromě toto je pravidelnou součástí: • většiny komerčně vyráběných tiskových hmot ve stomatologii, • většiny parfémových směsí, • mnoha insekticidů (hmyzích atraktantů).	

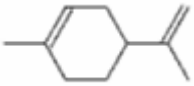
***Tab. IV** Vlastnosti Geraniolu* [31; 41; 61; 67; 176; 177; 178; 179; 183]

Název podle INCI	***Geraniol***	
Struktura		
Synonyma	Geraniol; geraniový olej; 6-cis-2,6-dimethyloctadien-2,6-ol-8; 3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol; 2,6-dimethyl-2,6-octadien-8-ol; (2E)-3,7-dimethylokta-2,6-dien-1-ol; lemonol, gerallol.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{18}O$
	CAS č.	106-24-1
	EC č.	203-377-1
	Mol. hmotnost	154,25 g/mol
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá až slabě žlutá olejovitá kapalina; růžově gerániová vůně
	Bod varu	110–111 °C
	Bod vzplanutí	101 °C
	Hustota (ρ_{25})	0,871–0,886·cm^{-3}
	Rozpustnost	mísitelný s ethanolem a etherem, prakticky nerozpustný ve vodě
	Rozpustnost v ethanolu (L_{70})	1:2
Výroba	izolací z přírodních silic, např. citronellové nebo palmorůžové; přesmykem linalloolu; hydrogenací citralu nebo synteticky z β-pinenu přes myrcen; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Geraniol (alkohol) je považován za slabý kontaktní alergen, má ovšem potenciál k autooxidaci na vzduchu při pokojové teplotě a k tvorbě vysoce alergenních sloučenin. Je jednou z nejčastěji používaných aromatických látek. Geraniol je přítomen ve většině rostlinných silic, poskytuje vůni růže. Používá se do řady květinových kompozic, nejčastěji do typů jako růže, geránie, jasmín, lípa, ylang-ylang aj.; do aromat jako ananas, jablko, broskev nebo meruňka. Má také antiseptický účinek. Přidává se jako vonná látka do mnoha výrobků. Je přítomen např. v: • rostlinách (růžích, levanduli, jasmínu, pelargoniích aj.), • kosmetice (poskytuje vůni růže), • léčivech pro zevní použití ke koreckci zápachu, • insekticidních atraktantech.	

Tab. V *Vlastnosti Isoeugenolu* [31; 41; 61; 176; 177; 178; 179]

Název podle INCI	***Isoeugenol***	
Struktura		
Synonyma	Isoeugenol; 4-hydroxy-3-methoxy-1-propenylbenzene; 4-propenyl-brenzcatechin-2-methyläther; 4-propenyl guajacol; 2-methoxy-4-propenylphenol; 4-hydroxy-3-methoxy-propenylbenzol; 2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl) fenol.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{12}O_2$
	CAS č.	97-54-1
	EC č.	202-590-7
	Mol. hmotnost	164,21 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá až nažloutlá viskózní kapalina; něžná karafiátová vůně
	Bod tuhnutí	12 °C
	Bod tání	14–18 °C
	Bod varu	130–132 °C
	Bod vzplanutí	137 °C
	Hustota (ρ)	1,087–1,091 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	velmi málo rozpustný ve vodě, mísitelný s alkoholem a etherem
	Rozpustnost v ethanolu (L_{50})	1:5
Výroba	získává se zejména izomerizací eugenolu, přesmykem eugenolu, popř. ze safrolu; z guajakolu lze získat přímo isoeugenol přes 4-hydroxy-3-methoxypropiofenon; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Isoeugenol (fenol) se v přírodě vyskytuje v cis- i trans-formě. Cis-forma je v absolutní karafiátové silici, trans forma v bazalkové silici. Používá se jako báze karafiátových kompozic. Velmi hezké efekty dává v šeříkových a růžových kompozicích nebo květinových fantaziích. Testovací látka isoeugenol je směs cis/trans izomerů. Vyskytuje se v mnoha rostlinách a esenciálních olejích, např. v hřebíčkovém oleji. Jde o meziprodukt při výrobě syntetického vanilínu (jeho oxidací vzniká vanilín). Používá se ke korekci vůně, např. v: • dentálních materiálech, • aromatizovaných čajích a jiných výrobcích potravinářského průmyslu, např. v kořenicích směsích aj.	

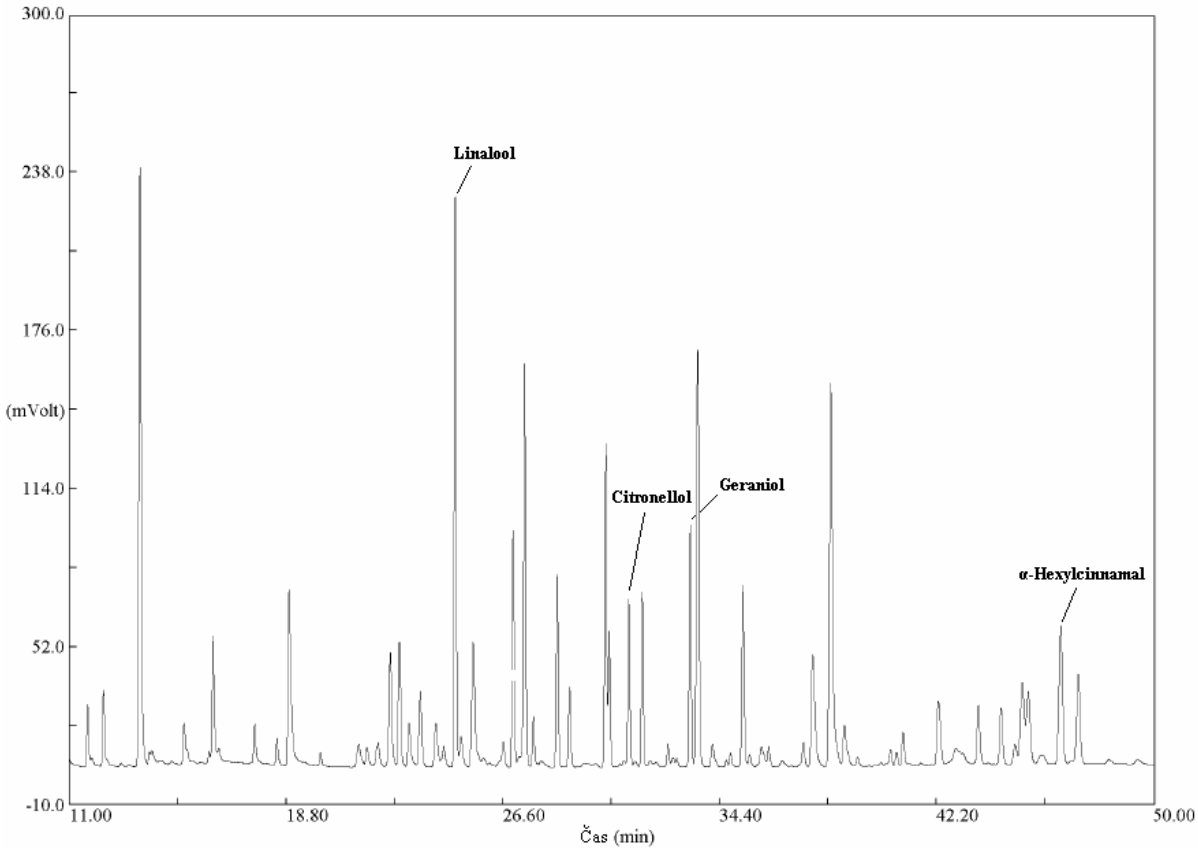
Tab. VI *Vlastnosti Limonenu* [31;41; 61; 176; 177; 178]

Název podle INCI	***Limonene***	
Struktura		
Synonyma	Limonen; D-limonene; 1-methyl-4-prop-1-en-2-yl cyclohexene; (4R)-1-methyl-4-prop-1-en-2-yl cyclophexene; meadione; carvene; dextro-limonene; (R)-1-methyl-4-(1-methyl ethenyl) cyclohexene; (R)-1-methyl-4-isopropenyl-1-cyklohexen; (R)-p-mentha-1,8-diene.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{16}$
	CAS č.	5989-27-5
	EC č.	227-813-5
	Mol. hmotnost	136,23 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá kapalina; svěží citrusová vůně, na vzduchu oxiduje za zisku nepříjemné až kmínové vůně
	Bod varu	71 °C
	Hustota (ρ)	0,840–0,850 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný v alkoholu, olejích, kerosinu, parfínovém oleji; ve vodě se rozpouští pouze 14 $mg \cdot l^{-1}$; nerozpustný v propylenglykolu
Výroba	izolace z citrusových terpenů; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	V přírodě se limonen (terpenický uhlovodík, terpen) vyskytuje především opticky aktivní. Racemická forma se nazývá dipenten. Je velmi rozšířenou vonnou látkou citronové vůně, a proto možnost přijít do kontaktu s d-limonenem je vysoká. Vyskytuje se v mnoha výrobcích, které mají vůni citrusových plodů. Je široce používána v různých oblastech průmyslu, především v kosmetickém, ale i k parfemaci mnoha dalších výrobků. V přírodě se vyskytuje v grapefruitech, citrónech, limetkách, pomerančích, pepři, australském tea tree oleji a v muškátovém oříšku. Používá se k výrobě syntetických vonných látek. Využívá se do svěžích parfémových kompozic, hlavně typu kolínských vod a přírodní pravotočivý do aromat.	

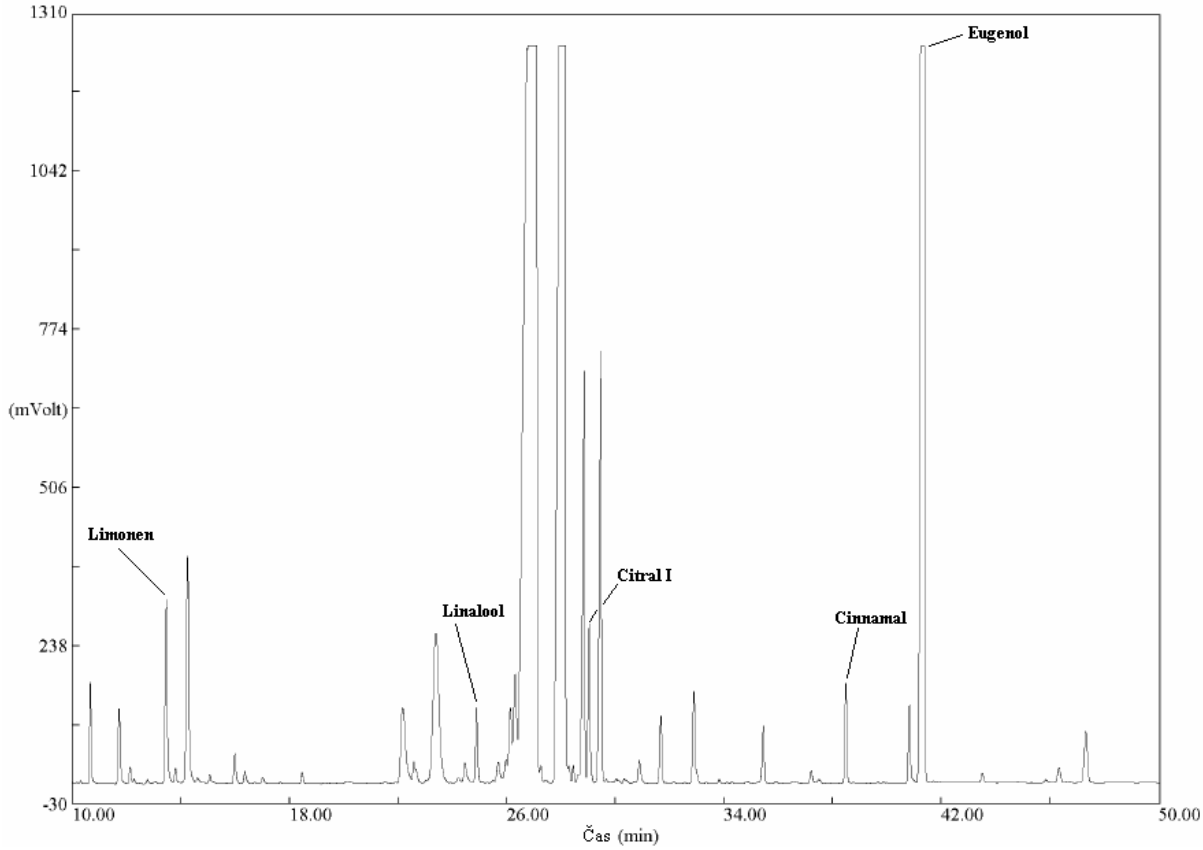
Tab. VII *Vlastnosti Linaloolu* [31; 41; 61; 75; 176; 177; 178; 184]

Název podle INCI	***Linalool***	
Struktura		
Synonyma	Linalool, synthetic; linalyl alkohol; 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol; 3,7-dimethyl-3-hydroxy-1,6-octadiene; β-linalool; 2,6-dimethyl octa-2,7-dien-6-ol; (3S)-3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol; p-linalool; 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimethyl.	
Identifikace látky	**Vzorec**	$C_{10}H_{18}O$
	CAS č.	78-70-6
	EC č.	201-134-4
	Mol. hmotnost	154,25 $g \cdot mol^{-1}$
Chemické a fyzikální vlastnosti	**Vzhled, skupenství a aroma**	bezbarvá až světle žlutá kapalina; výrazná květinová vůně, připomínající konvalinky
	Bod varu	85 °C
	Bod vzplanutí	78 °C
	Hustota (*ρ*)	0,858–0,870 $g \cdot cm^{-3}$
	Rozpustnost	rozpustný v olejích, parafínovém oleji, propylenglykolu; ve vodě se rozpouští 1 590 $mg \cdot l^{-1}$; nerozpustný v glycerinu
	Rozpustnost v ethanolu (L_{60})	1:4
Výroba	izolací ze silic nebo parciální hydrogenací dehydrolinaloolu, popřípadě z myrcenu přes acetát; syntetický nebo přírodní	
Výskyt a použití	Linalool je nenasycený uhlovodík (alkohol) a na vzduchu podléhá autoxidaci. Primárními oxidačními produkty jsou hydroperoxidy (reaktivní sloučeniny, které mohou být potenciálními senzibilizátory). Čistý linalool sám o sobě není senzibilizátorem. V přírodě se vyskytuje v mnoha silicích, např. v silici koriandrové. V koncentrovaném stavu připomíná vůně květy citrusů nebo divoké růže. Přítomnost v přírodě zjištěna v jablečné, mandarinkové a pomerančové šťávě, v meruňkách, broskvích, jahodách, švestkách, gardeniích, levanduli, mrkvi, bergamotovém oleji, majoránce, tymiánu, kardamonu, koriandru, brusinkách aj. Používá se v kosmetických výrobcích, hlavně v pěnách do koupele, šamponech, tekutých i pevných mýdlech a ve sprejích na vlasy, do mnoha květinových kompozic a svěžích aromat.	

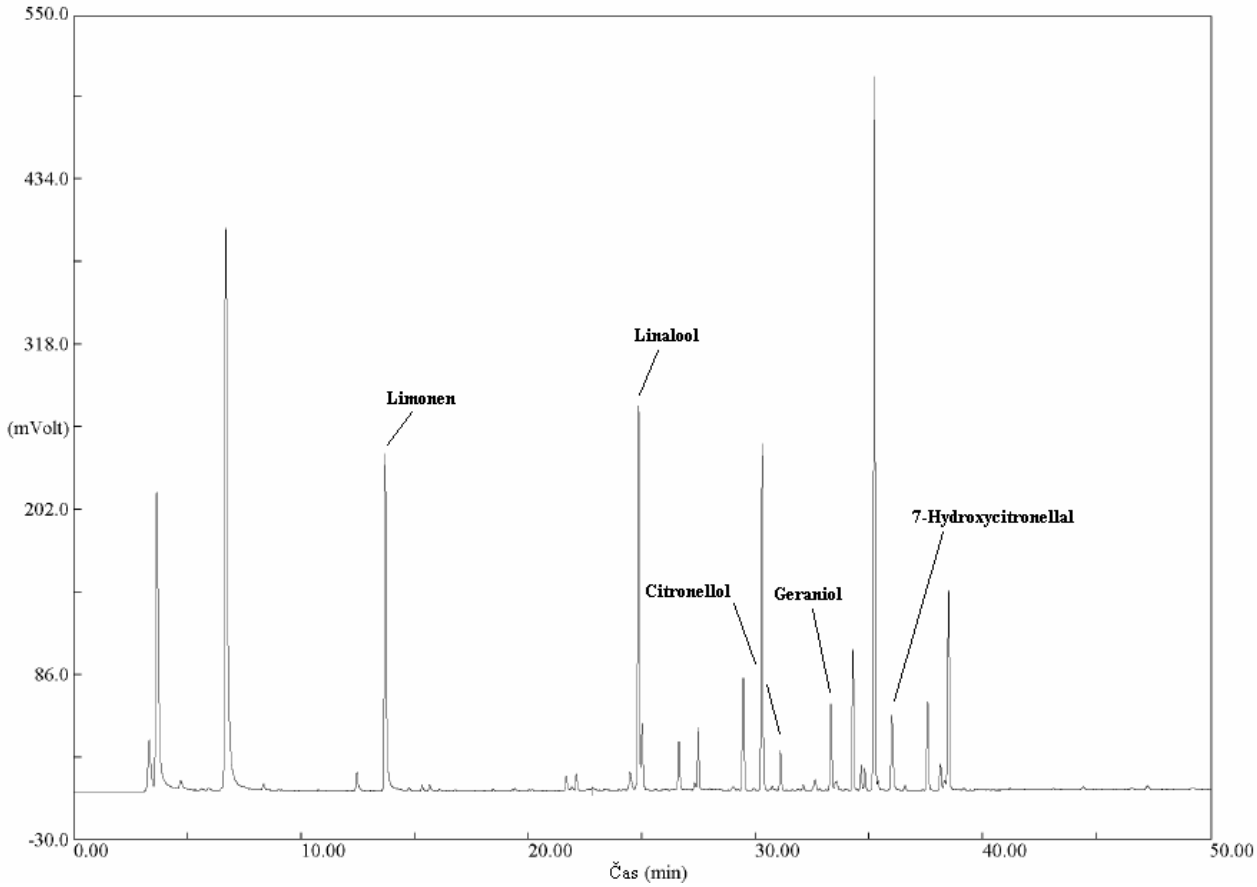
Příloha II Chromatogramy reálných vzorků kosmetických přípravků



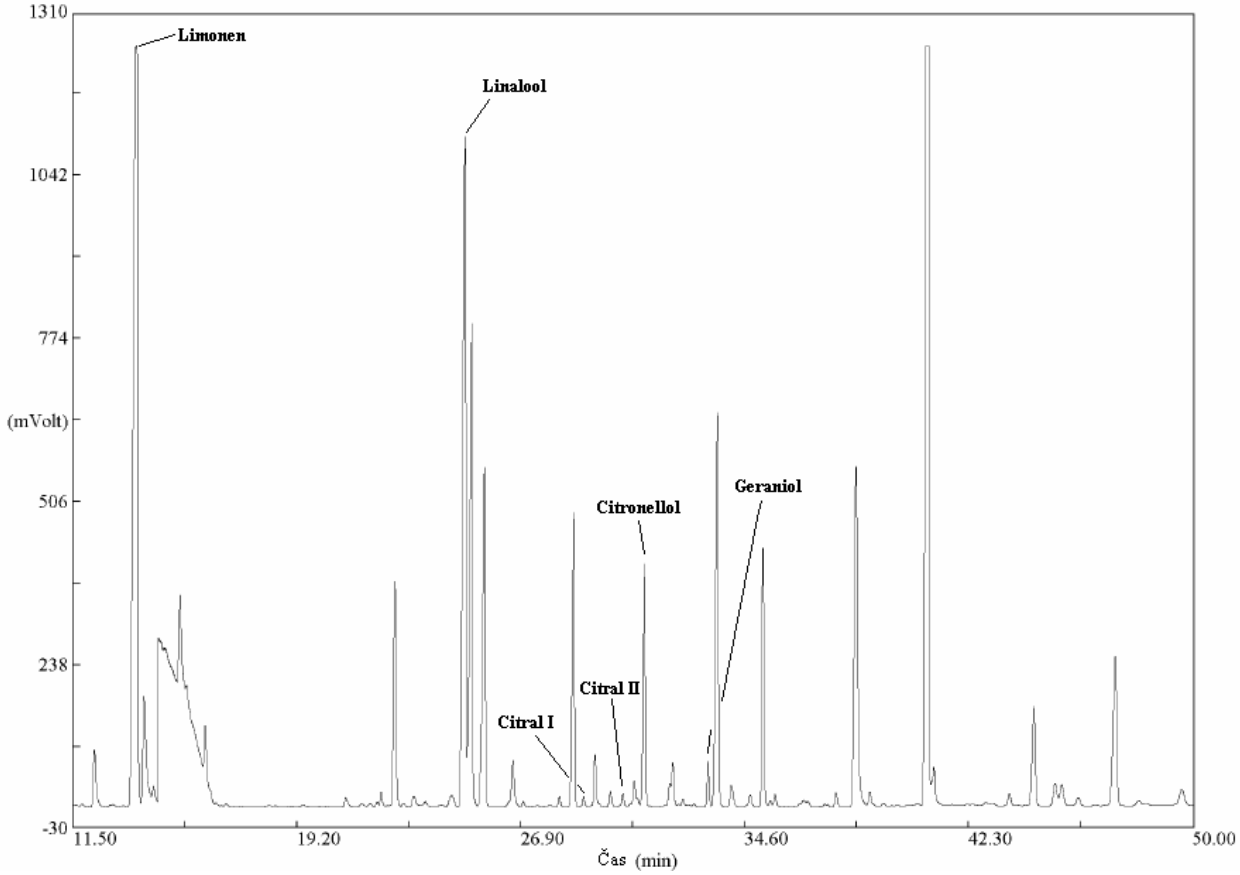
Graf I *Chromatogram alergenních vonných látek (Adidas Natural Vitality)*



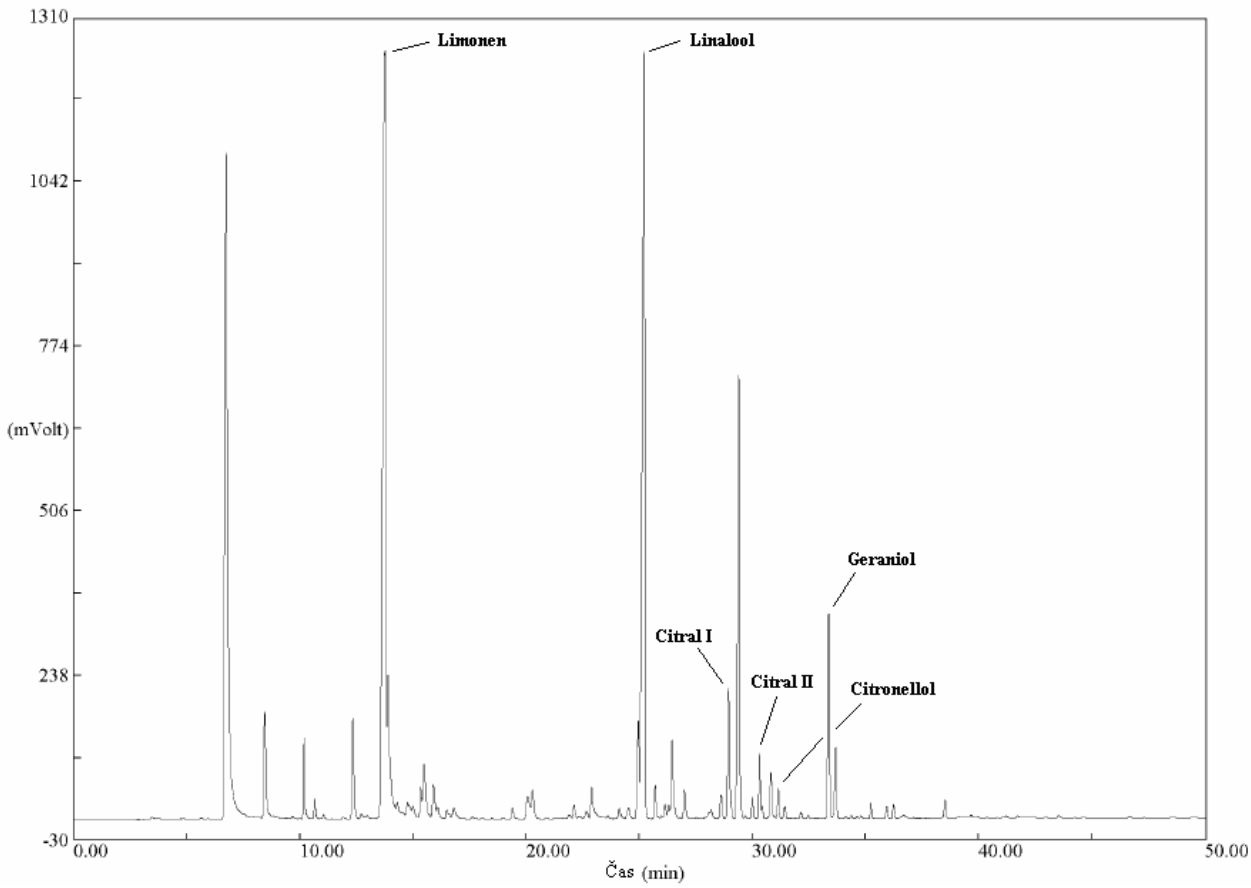
Graf II *Chromatogram alergenních vonných látek (ALPA s hřebíčkem)*



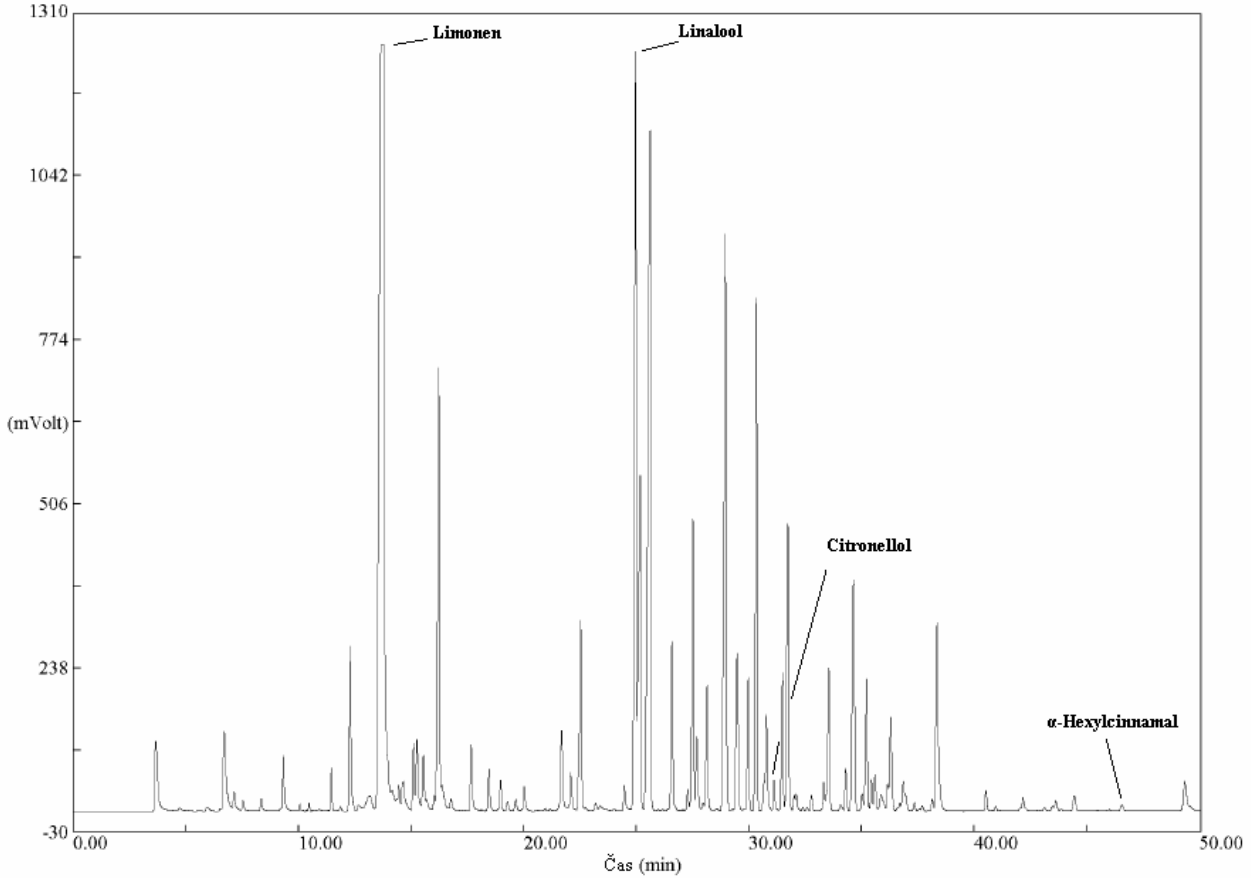
Graf III *Chromatogram alergenních vonných látek (Aviril s azulenem)*



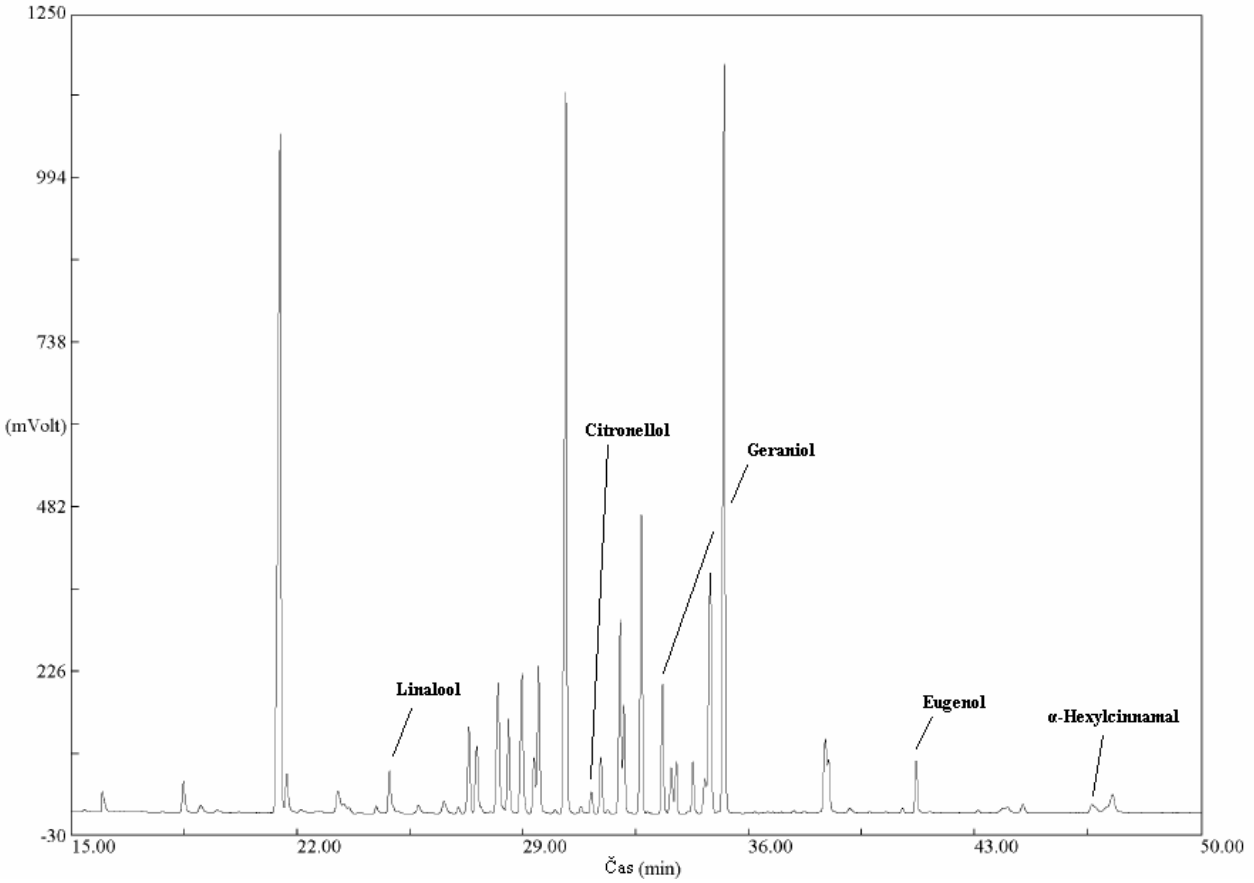
Graf IV *Chromatogram alergenních vonných látek (Davidoff Cool Water Woman)*



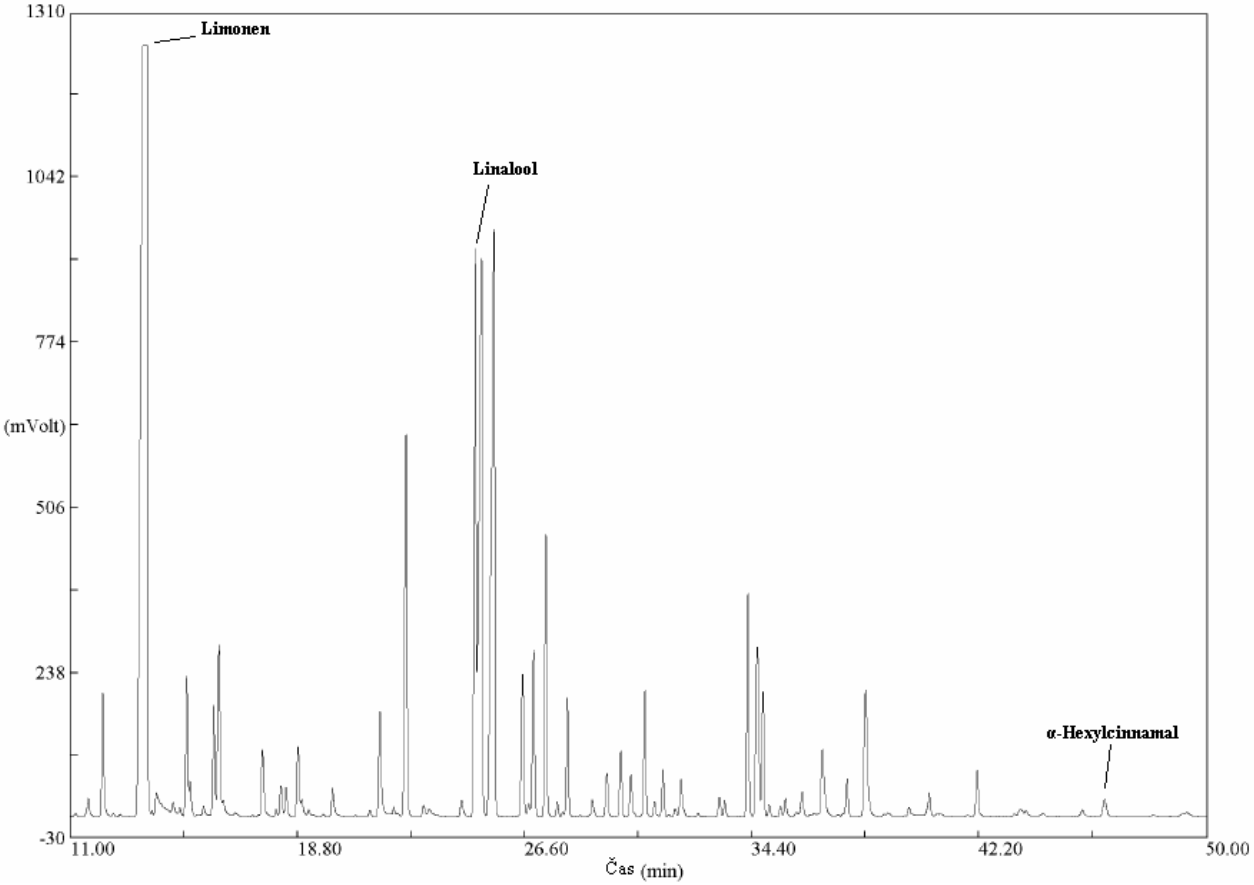
Graf V *Chromatogram alergenních vonných látek (Dixi březový šampón)*



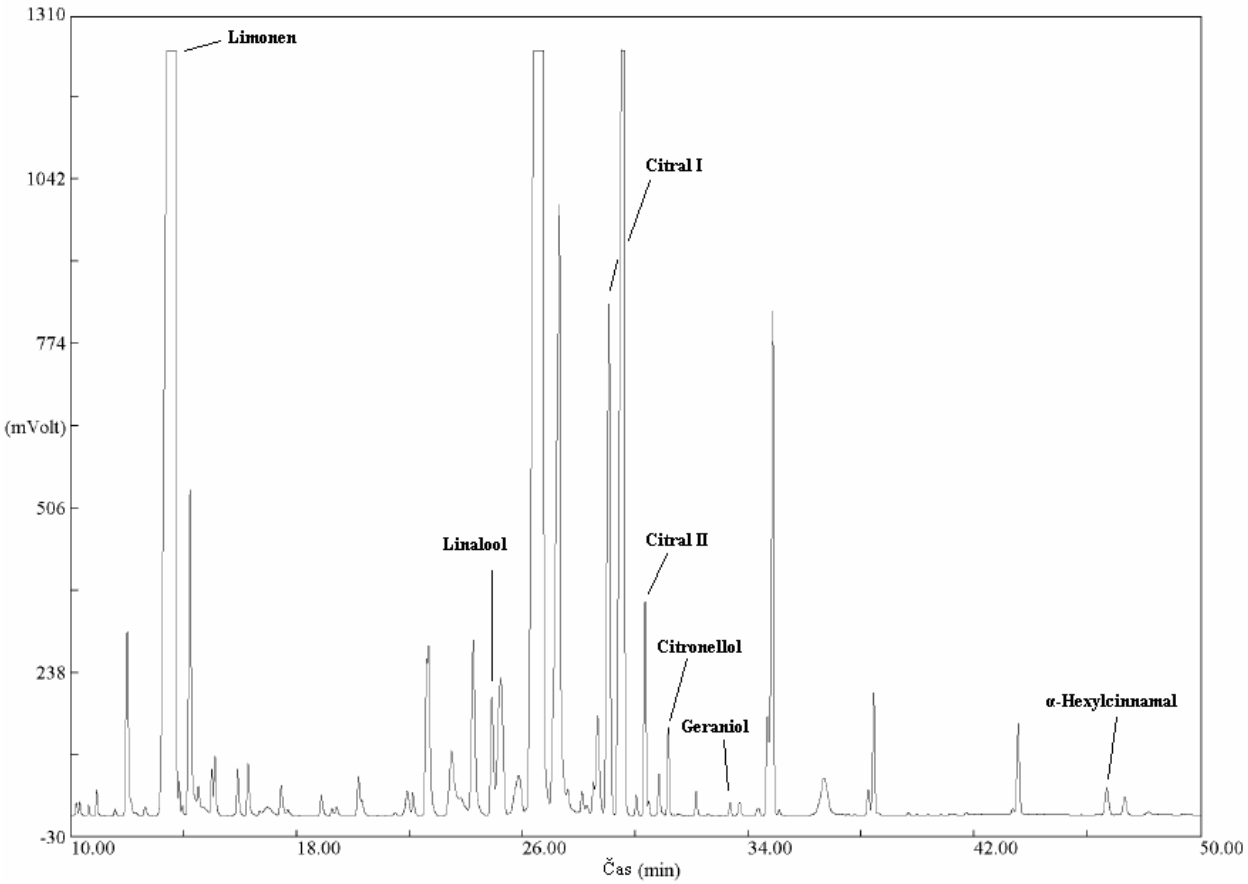
Graf VI *Chromatogram alergenních vonných látek (Dove Beauty Care Shower Fresh Touch)*



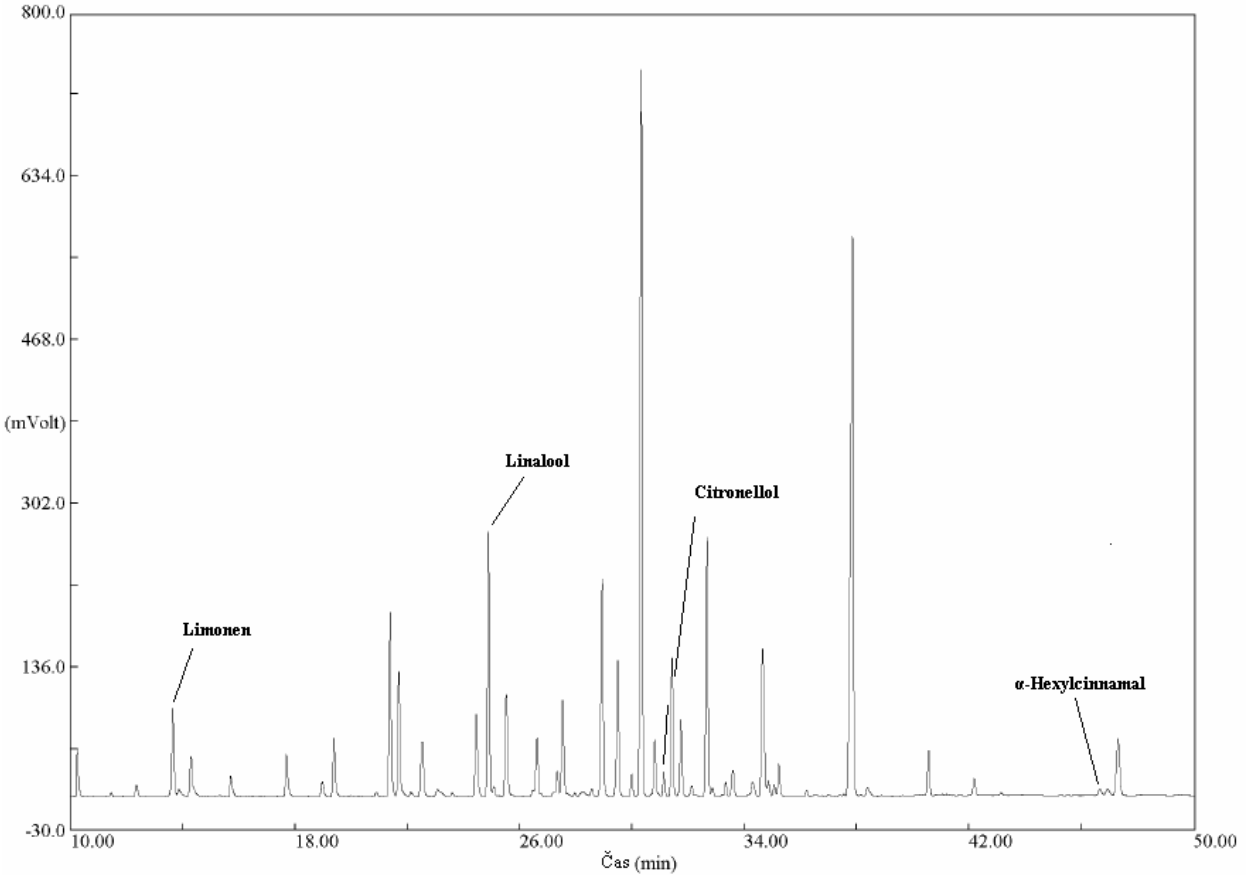
Graf VII *Chromatogram alergenních vonných látek (Dove Original Deodorant)*



Graf VIII *Chromatogram alergenních vonných látek (Gillette Shave Gel Satin Care)*



Graf IX *Chromatogram alergenních vonných látek (LUNA kopřivová)*

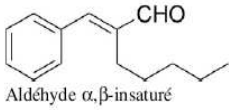
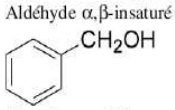
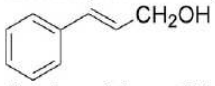
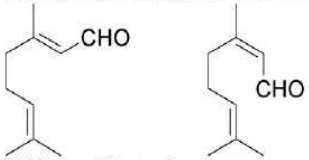
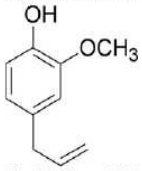
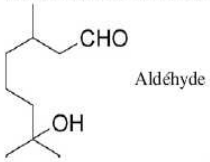
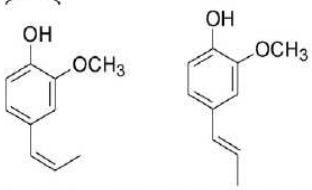
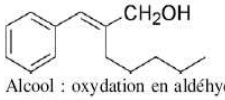
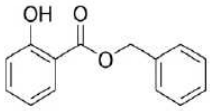
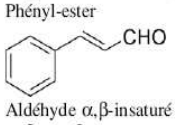
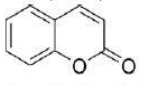


Graf X *Chromatogram alergenních vonných látek (Miris hand creme)*

Příloha III Seznam 26 ingrediencí určených SCCNFP k uvedení na etiketě

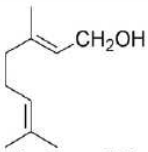
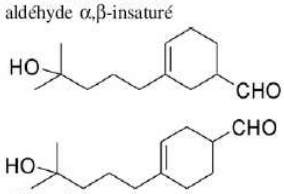
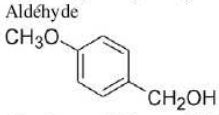
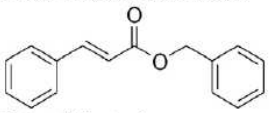
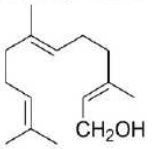
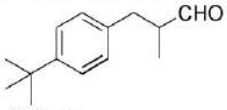
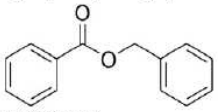
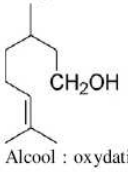
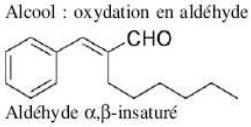
Tab. VIII *Seznam 26 ingrediencí určených SCCNFP k uvedení na etiketě* [41]

Tableau 2
Liste des 26 ingrédients retenus par le SCCNFP pour étiquetage.

Substance (synonymes)	N° CAS	Structure et fonction chimique électrophile
Amylcinnamaldéhyde (amyl cinnamal, 2-benzylideneheptanal, α-amyl cinnamic aldehyde)	122-40-7	 Aldéhyde α,β-insaturé
Alcool benzylique (benzyl alcohol)	100-51-6	 Alcool : oxydation en aldéhyde
Alcool cinnamique (cinnamyl alcohol)	104-54-1	 Alcool : oxydation en aldéhyde α,β-insaturé
Citral : mélange des isomères cis et trans (3, 7-diméthyl-2, 6-octadièn-1-al)	5392-40-5	 Aldéhyde α,β-insaturé
Eugénol	97-53-0	 Catéchol protégé : oxydation en orthoquinone
Hydroxycitronellal (7-hydroxycitronellal, laurine)	107-75-5	 Aldéhyde
Isoeugénol mélange des isomères cis et trans	97-54-1	 Catéchol protégé : oxydation en orthoquinone
Alcool amylcinnamique (amylcinnamyl alcohol, 2-pentyl-3-phenylprop-2-en-1-ol, α-amyl cinnamic alcohol)	101-85-9	 Alcool : oxydation en aldéhyde α,β-insaturé
Salicylate de benzyle (benzyl salicylate, benzyl-o-hydroxybenzoate)	118-58-1	 Phényl-ester
Aldéhyde cinnamique (cinnamal, cinnamaldehyde, 3-phenyl-2-propenal, cinnamic aldehyde)	104-55-2	 Aldéhyde α,β-insaturé
Coumarine (1-benzopyran-2-one, cis-o-coumarinic acid lactone)	91-64-5	 Ester cyclique α,β-insaturé

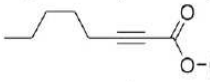
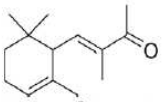
Tab. VIII *Seznam 26 ingrediencí určených SCCNFP k uvedení na etiketě (pokračování)* [41]

Tableau 2 (*Suite*)

Substance (synonymes)	N° CAS	Structure et fonction chimique électrophile
Géraniol	106-24-1	 Alcool : oxydation en aldéhyde α,β-insaturé
Hydroxyméthylpentylcyclohexènecarboxaldéhyde (hydroxyisohexyl-3-cyclohèxene carboxaldéhyde, lyral)	31906-04-4	 Aldéhyde
Anisyl alcool (4-methoxybenzyl alcohol)	105-13-5	 Alcool : oxydation en aldéhyde
Cinnamate de benzyle (benzyl cinnamate, benzyl 3-phenyl-2-propenoate, cinnamein)	103-41-3	 Ester α,β-insaturé
Farnésol (3, 7, 11-triméthyldodéca-2, 6, 10-triénol)	4602-84-0	 Alcool : oxydation en aldéhyde α,β-insaturé
2-(4-tert-Butylbenzyl) propionaldéhyde (lilial, lilestral)	80-54-6	 Aldéhyde
Linalool	78-70-6	Terpène : autoxydation en hydroperoxyde allylique
Benzyl benzoate	120-51-4	 Phényl-ester
Citronellol (3, 7-diméthyl-6-octénol)	106-22-9	 Alcool : oxydation en aldéhyde
Hexyl cinnamaldéhyde (α-hexyl cinnamaldéhyde)	101-86-0	 Aldéhyde α,β-insaturé

Tab. VIII *Seznam 26 ingrediencí určených SCCNFP k uvedení na etiketě (pokračování)* [41]

Tableau 2 (*Suite*)

Substance (synonymes)	N° CAS	Structure et fonction chimique électrophile
d-Limonène (R-limonène, (R)-*p*-mentha-1,8-diène)	5989-27-5	Terpène : autoxydation en hydroperoxyde allylique
Méthyl heptine carbonate (méthyl oct-2-ynoate)	111-12-6	 Ester
3-Méthyl-4-(2, 6, 6-triméthyl-2-cyclohexèn-1-yl)-3-butèn-2-one (α-isomethylionone)	127-51-5	 Cétone α,β-insaturée
Mousse de chêne (Oak moss)	90028-68-55	
Mousse d'arbre (Tree moss)	90028-67-4	