

***In-vitro* testování iritačního potenciálu surfaktantů s využitím proteinů**

Barbora Zápalková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Zápalková**
Osobní číslo: **T21335**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **In-vitro testování iritačního potenciálu surfaktantů s využitím proteinů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Vypracujte rešerši zaměřenou na problematiku působení surfaktantů na pokožku a klasifikujte metody využívané pro hodnocení jejich vzájemných interakcí.

II. Praktická část:

V praktické části provedte in-vitro testování iritačního potenciálu povrchově aktivních látek, případně jejich kombinací, které jsou běžnou součástí kosmetických přípravků.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Cohen, L., Sanchez, E., a kol. Study on the effects of LAS and zein concentrations on protein solubilization. *Journal of Surfactants and Detergents* 2016, 19, 1089-1092. doi: 10.1007/s11743-016-1846-3.
- [2] Ong, M. W. S., Simion, A., Maibach, H. I. Methods for testing irritation potential. In book: *Textbook of Hand Eczema* (str. 233-246). © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014. 10.1007/978-3-642-39546-8_22.
- [3] Misra, P. K., Dash, U., Maharana, S. Investigation of bovine serum albumin-surfactant aggregation and its physicochemical characteristics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2015, 483, 36-44. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.052.
- [4] Deo, N., Jockusch, S., a kol. Surfactant interaction with zein protein. *Langmuir* 2003, 19, 5083-5088. 10.1021/la020854s.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky: Barbora Zápalková

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Teoretická část bakalářské práce se zabývá problematikou iritace pokožky, jejími projevy a teoretickými modely. Dále popisuje vliv surfaktantů na pokožku a předpokládané mechanismy jejich vzájemných interakcí. Součástí kapitoly je i charakteristika jednotlivých zástupců surfaktantů zvolených pro praktickou část této práce. Poslední kapitoly rešeršní části jsou věnovány klasifikaci *in-vitro* a *in-vivo* metod využívaných ke stanovení iritačního potenciálu surfaktantů.

Praktická část je v úvodu zaměřena na charakterizaci roztoků vybraných surfaktantů, případně jejich směsí, zahrnující stanovení kritické micelární koncentrace směsných micel, velikosti a náboje micelárních agregátů. Stěžejní část se věnuje *in-vitro* testování iritačního potenciálu připravených roztoků surfaktantů a vybraných komerčních vzorků oplachové kosmetiky s využitím kukuřičného proteinu zeinu a hovězího sérového albuminu.

Klíčová slova: iritace, hovězí sérový albumin, pH, solubilizace, surfaktant, zein

ABSTRACT

The theoretical part of the bachelor thesis deals with the issue of skin irritation, its manifestations, and theoretical models. It also describes the effect of surfactants on skin, and the presumed mechanisms of their mutual interaction. This chapter also includes the characterization of individual surfactant representatives that were selected for the practical part of the bachelor thesis. The last chapters of the research section are devoted to the classification of *in-vitro* and *in-vivo* methods for assessing irritation potential of surfactants.

The practical part is initially focused on the identification of selected surfactant solutions, eventually their mixtures, including the evaluation of critical micelle concentration of mixed micelle systems, as well as size and charge of micellar aggregates. The crucial part is dedicated to *in-vitro* assessing of irritation potential of prepared surfactant solutions and selected commercial samples of rinse-off cosmetics using zein protein and bovine serum albumin.

Keywords: irritation, bovine serum albumin, pH, solubilization, surfactant, zein protein

Především bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, paní doc. Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D. za velmi cenné rady, ochotu, odborné vedení, trpělivost a čas, který mi při zpracování práce věnovala. Také bych chtěla poděkovat paním laborantkám za pomoc při zpracování praktické části této práce.

Velké díky patří také mé rodině a přátelům za obrovskou podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 IRITACE POKOŽKY	11
1.1 PROJEVY IRITACE POKOŽKY	11
1.2 TEORETICKÉ MODELY IRITACE	12
2 PŮSOBENÍ SURFAKTANTŮ NA POKOŽKU.....	15
2.1 STRUKTURA MOLEKULY SURFAKTANTŮ.....	15
2.2 VLASTNOSTI SURFAKTANTŮ.....	15
2.3 INTERAKCE SURFAKTANTŮ S POKOŽKOU.....	16
2.3.1 Monomerní model průniku do pokožky.....	16
2.3.2 Micelární model průniku do pokožky.....	16
2.3.3 Model korelace hustoty náboje	17
2.4 INTERAKCE SURFAKTANTŮ S PROTEINŮ A LIPIDY	17
2.5 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ IRITACE ZPŮSOBENÉ SURFAKTANTY	18
2.6 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ SURFAKTANTŮ.....	19
2.6.1 Sodium dodecyl sulfate.....	19
2.6.2 Sodium laureth sulfate.....	19
2.6.3 Sodium coco sulfate	20
2.6.4 Sodium dodecylbenzene sulfonate.....	20
2.6.5 Sodium cocoyl isethionate	20
2.6.6 Cocamidopropyl betaine	21
2.6.7 Lauryl glucoside.....	21
2.6.8 Coco glucoside	22
3 IN-VIVO METODY STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU SURFAKTANTŮ.....	23
3.1 NÁPLAŠŤOVÉ TESTY (PATCH TESTY).....	23
3.2 ZÁTĚŽOVÉ TESTY	24
4 IN-VITRO METODY STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU SURFAKTANTŮ.....	26
4.1 STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU S VYŽITÍM ZEINU	26
4.1.1 Princip interakce zeinu se surfaktantem ve vodném roztoku.....	26
4.1.2 Zein test.....	27
4.1.3 Gravimetrické stanovení solubilizovaného zeinu	28
4.1.4 Vliv množství zeinu na jeho rozpustnost	28
4.2 STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU S VYUŽITÍM HOVĚŽÍHO SÉROVÉHO ALBUMINU.....	28
4.2.1 Princip interakce surfaktantu s hověžím sérovým albuminem	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	30

5	CÍLE PRÁCE	31
6	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A METODIKA	32
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	32
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	32
6.4	TENZIOMETRICKÉ MĚŘENÍ.....	35
6.5	MĚŘENÍ VELIKOSTI A ZETA POTENCIÁLU ČÁSTIC	36
6.6.1	Příprava roztoku 75% ethanolu.....	37
6.6.2	Příprava zásobního roztoku zeinu	37
6.6.3	Sestrojení kalibrační přímky	37
6.8	STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU SURFAKTANTŮ S VYUŽITÍM HOVĚŽÍHO SÉROVÉHO ALBUMINU BSA.....	40
6.9	STANOVENÍ PĚNIVOSTI	42
7	VÝSLEDKY	43
7.1	STANOVENÍ CMC SMĚSÍ SURFAKTANTŮ	43
7.2	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	45
7.3	STANOVENÍ ZETA POTENCIÁLU ČÁSTIC.....	47
7.4	ZEIN TEST.....	48
7.5	GRAVIMETRICKÉ STANOVENÍ SOLUBILIZOVANÉHO ZEINU	51
7.6	STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU SURFAKTANTŮ S VYUŽITÍM HOVĚŽÍHO SÉROVÉHO ALBUMINU BSA.....	53
7.7	STANOVENÍ PĚNIVOSTI	55
	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	65
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK.....	68

ÚVOD

Surfaktanty, látky s povrchovou aktivitou, patří mezi nejčastější složky kosmetických přípravků, kde zajišťují detergenční účinky, pěnivost, ale současně mohou sloužit jako emulgátory a stabilizátory. Oplachová kosmetika je každodenní součástí našich životů, jejímž hlavním účelem je odstraňování nečistot z povrchu pokožky těla a vlasů. Na druhou stranu se v důsledku častého používání těchto přípravků mohou objevit i nepříznivé projevy v podobě iritace pokožky, jejíž hlavními příznaky jsou pak pocity suchosti, svědění a vznik erytému.

Z těchto důvodů je v posledních letech složení kosmetiky věnována značná pozornost a jsou hledány různé strategie, jak zmírnit případnou míru dráždivosti jejích složek. Iritační potenciál surfaktantů, vyjadřující míru nepříznivých účinků, lze stanovit *in-vivo* metodami prováděnými na pokožce dobrovolníků. Byly ale také vyvinuty *in-vitro* metody, využívající proteiny s vlastnostmi podobnými složkám pokožky. Jako příklad lze uvést kukuřičný protein zein, který se po interakci s daným surfaktantem stanoví spektrofotometricky nebo gravimetricky. Druhým proteinem, prostřednictvím něž je možno iritační potenciál testovat, je hovězí sérový albumin, který slouží ke zhodnocení změny pH po interakci s vodným roztokem surfaktantu.

Cílem předložené bakalářské práce bylo ověřit vhodnost *in-vitro* metod využívajících zmíněné proteiny pro testování vybraných vzorků, zahrnujících nejen jednotlivé surfaktanty běžně se vyskytující v kosmetických přípravcích, ale i konkrétní komerční produkty oplachové kosmetiky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 IRITACE POKOŽKY

Iritaci pokožky lze chápat jako její reakci na chemické látky, zranění nebo vliv prostředí, která se projevuje vizuálními nebo sensorickými změnami [1, s. 233]. Kromě surfaktantů a dalších složek kosmetických přípravků mají na stav pokožky vliv i další faktory, jako je věk, genetika, výživa a počasí. V tomto případě může použití surfaktantů s vysokým iritačním potenciálem stav pokožky ještě významně zhoršit [2, s. 20].

1.1 Projevy iritace pokožky

Mezi hlavní projevy iritace pokožky patří erytém (začervenání pokožky) a pocit svědění, způsobené poškozením kožní bariéry [2, s. 20]. Ve svrchních vrstvách pokožky dochází často k sensorické iritaci, poškození svrchní vrstvy kožních buněk a nadměrné hydrataci *stratum corneum*. Následně může dojít i k projevům iritace v hlubších vrstvách kůže, a to zejména v případech, kdy je již vrstva *stratum corneum* porušena nebo při delším a intenzivnějším kontaktu s iritantem [1, s. 235].

Sensorická forma iritace zahrnuje nepříjemné pocity na pokožce, jako je suchost, pocity svědění a pálení. Tyto projevy patří mezi hlavní reakce na iritanty, ovšem jejich mechanismus není jednoznačný. Hlavní roli zde pravděpodobně hraje hormon histamin, který dokáže stimulovat nervová vlákna (skupiny C) neobalená myelinem a navodit tak svědivý pocit. Stimulací většího počtu nervových vláken dochází až k pocitu pichlavosti [1, s. 235]. Povrch iritované pokožky může být hrubý s výskytem šupinek. Avšak suchost pokožky nemusí být vždy spojená s iritací, vliv mají i alkoholy obsažené v kosmetickém přípravku nebo studený a suchý vzduch [2, s. 20]. Proniknutím surfaktantů do *epidermis* dochází k uvolnění zánětlivých signálních molekul (cytokininů), které způsobí zánět a hyperproliferační buněk *epidermis*. Následně dochází k odlupování a praskání pokožky, což dále vede k usnadnění pronikání tenzidu do hlubších vrstev *epidermis* [3, s. 696].

Studiem porušení svrchní vrstvy kožních buněk se zabývá squamometrie a corneografometrie. Při kontaktu s iritantem může dojít k rozpadu tkáně korneocytů na jednotlivé buňky, což lze zhodnotit pod mikroskopem [1, s. 236].

Nadměrná hydratace *stratum corneum*, způsobená kontaktem vodného roztoku anionického surfaktantu s pokožkou, může vést až k jejímu otoku. Důvodem je poměrně výrazná interakce a vazba hydrofobní části molekuly anionického surfaktantu se *stratum corneum*. Záporně nabitě hydrofilní skupiny se odpuzují, což způsobuje vypuzení přirozených

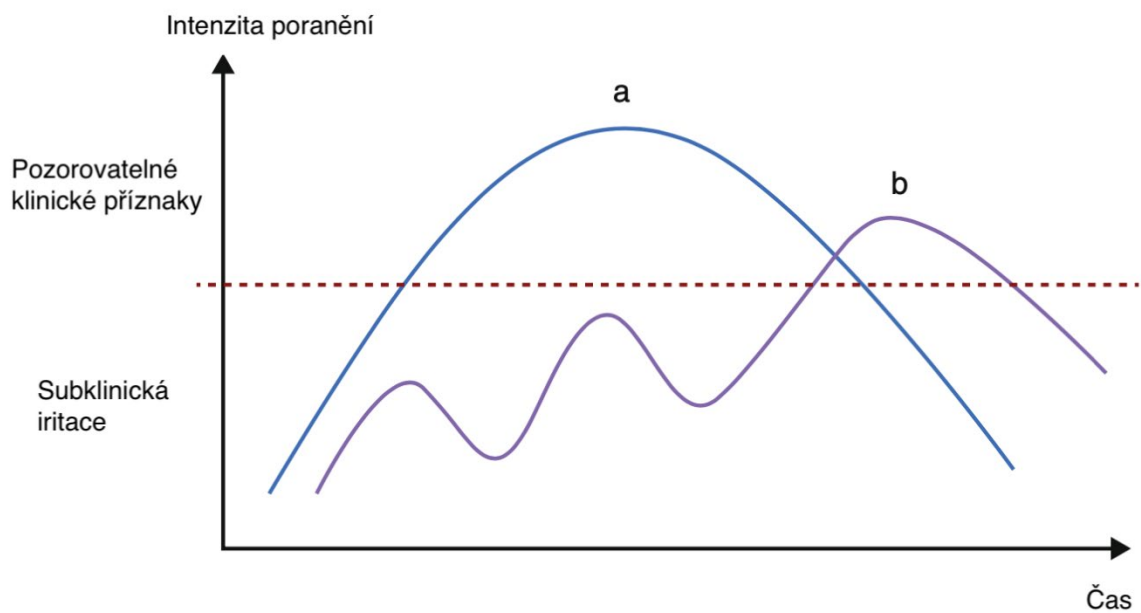
hydratačních faktorů (natural moisturizing factors, NMF) z pokožky a ztrátu hydratace, která se následně projevuje napnutím a hrubostí pokožky. Neionické a kationické tenzidy otoky nezpůsobují, přestože spadají mezi iritanty [1, s. 236]. K napnutí dochází po rychlém odpaření vody z pokožky, způsobeném botnáním vrstev *epidermis*, z nichž se pak snadněji voda odpařuje. Výsledkem je nižší obsah vody než před použitím surfaktantu [2, s. 20].

Typ a intenzita odezvy na daný podnět a potenciální podráždění jsou výrazně ovlivněny stavem pokožky a konkrétním místem. Pokožka na různých částech těla může na stejný typ iritantu reagovat s různou intenzitou. Největší citlivost byla po kontaktu s lauryl sulfátem sodným prokázána v oblasti stehna, zatímco nejméně citlivými byly dlaně. Tyto rozdíly souvisejí s faktem, jak snadno mohou molekuly difundovat skrze *stratum corneum* nebo s různou velikostí kožních buněk v dané oblasti. Ve studii provedené Rougierem a kol. byla také prokázána korelace mezi propustností pokožky pro vodu a absorpcí hydrofobních molekul (kyselina benzoová, acetylsalicylová) [1, s. 237].

1.2 Teoretické modely iritace

Teoretické modely iritace slouží k lepšímu porozumění typům a mechanismům podráždění pokožky. Byly vyvinuty jak *in-vitro*, týkající se prostředí mimo živý organismus, tak *in-vivo* modely využívající substráty s charakteristikami odpovídajícími vlastnostem pokožky [1, s. 233].

Maltenův teoretický model iritace předpokládá, že k viditelnému poškození pokožky dochází po překročení prahové koncentrace. Pozorovatelné klinické příznaky mohou vznikat v důsledku jednoho významnějšího podnětu (Obrázek 1a), či série menších podnětů, které se kumulují (Obrázek 1b). Jakmile dojde k obnově kožní tkáně, dochází ke snížení intenzity pod daný práh a klinické projevy iritace mizí [1, s. 233].



Obrázek 1 Graf znázorňující Maltenův teoretický model iritace, upraveno dle [1]

V podstatě lze předpokládat, že pokožka může reagovat dříve, než se objeví klinické příznaky. Tato teorie je základem jevu nazvaného jako „neviditelná dermatóza“, který popisuje potenciální iritaci pokožky neprojevující se viditelnými znaky na povrchu, přestože k porušení kožní tkáně došlo. Důkazem této teorie byl výskyt nabotnalých keratinocytů a mezibuněčných prostorů naplněných tekutinou při působení 0,5% roztoku sodium lauryl sulfátu (SLS) na pokožku po dobu 24 hodin, přestože nedošlo k zarudnutí pokožky a iritace se neprojevila ani změnami tkáně. Z tohoto výzkumu lze vyvodit, že poškozená pokožka je vůči iritantům mnohem více responzivní. Současně se iritace takto poškozené pokožky projeví i po menší míře zásahu [1, s. 234, 235].

Freemanová a Maibach tuto studii podpořili stanovením transepidermální ztráty vody (TEWL) po provedení tzv. patch testu (viz Kapitola 3.1). Stejně místo pokožky bylo ve dvoutýdenním rozmezí ošetřeno 2% roztokem SLS. Po prvním kontaktu pokožky s roztokem došlo k obnovení pokožky do původního stavu, ale po druhém provedení patch testu se již objevila výraznější reakce [4, s. 502].

Druhý teoretický model iritace definuje charakteristické odpovědi jednotlivých vrstev kůže na působení iritantu (Obrázek 2). Poškození *epidermis* a *stratum corneum* se projevuje senzorickou iritací a suchostí. Při poškození hlubších vrstev kůže, *dermis*, dochází ke zvýšení prokrvení a zarudnutí (erytém) [1, s. 235].

Pro normální pokožku

Metoda	Ovlivněná vrstva kůže	Vizuální hodnocení	Přístrojové hodnocení	Senzorické hodnocení
Krátké omytí Normální omytí	Povrch	Ne	Vodivost	Pocitově měkká, napnutá a suchá
Přehnané omytí Krátké mytí (10 sekund) Ponechání pěny na pokožce Opakování 4 krát za den po dobu několika dní	Stratum Corneum	Suchost	Vodivost Test s lepicí páskou Obrazová analýza Fotografie	Pocitově suchá, svědivá
Prodloužené omytí Delší mytí (>1 minutu) Okamžité mytí Opakování 4 krát za den po dobu několika dní Uzavřený patch test Okluzivní „patching“ odpovídajících objektů na >24 hodin	Povrch až dermis	Erytém Suchost	TEWL* Kolorimetr Laser Doppler Vodivost	Pocitově suchá, zarudnutá

*TEWL: Transepidermální ztráta vody

Zvýšená intenzita ošetření

Obrázek 2 Odezvy kůže na působení kosmetického přípravku, upraveno dle [1]

2 PŮSOBENÍ SURFAKTANTŮ NA POKOŽKU

Surfaktanty neboli tenzidy, lze definovat jako látky s povrchovou aktivitou, tedy látky schopné snížit volnou mezifázovou energii soustavy. Jedná se o sloučeniny organického původu tvořené molekulami s tzv. amfifilní strukturou [5, s. 19].

2.1 Struktura molekuly surfaktantů

Amfifilní struktura molekuly je tvořena dvěma charakteristickými částmi – hydrofilní a hydrofobní (Obrázek 3). Hydrofilní část může být tvořena anionickou, kationickou, amfoterní nebo neionickou skupinou a podle jejího typu lze tenzidy klasifikovat na anionické, kationické, amfoterní a neionické. Hydrofobní část pak nejčastěji tvoří uhlovodíkový zbytek (alkyl), jehož součástí může být i aromatické jádro (alkylaryl). Charakteristickou délkou uhlovodíkového zbytku je u většiny tenzidů řetězec tvořený 12 až 18 uhlíky [5, s. 19].



Obrázek 3 Zjednodušené znázornění molekuly s amfifilní strukturou, vlastní zdroj

2.2 Vlastnosti surfaktantů

Klíčovou roli pro chování a vlastnosti tenzidů hraje právě zmíněná amfifilní struktura. Hydrofilní část totiž molekuly vody přitahuje, na rozdíl od hydrofobní části, která je odpuzuje. Molekuly surfaktantu jsou tak schopny adsorpce na fázové rozhraní a následné tvorby micelárních agregátů. Ke tvorbě micel dochází pouze při dosažení kritické micelární koncentrace [5, s. 21, 22]. Další důležitou vlastností surfaktantů je jejich rozpustnost ve vodě. Ta je ovlivňována převážně typem hydrofilní části molekuly. Hraniční hodnotou rozpustnosti je tzv. Krafftův bod, který udává hodnotu teploty, při které začne gradient rozpustnosti výrazně růst v souvislosti se vznikem micel. Tenzidy, obsahující ve své molekule ionické skupiny, se ve vodě rozpouštějí stejným mechanismem jako iontové sloučeniny a jejich rozpustnost ve většině případů klesá s rostoucí délkou hydrofobní části molekuly. Rozpustnost neionických tenzidů klesá s rostoucí teplotou, což je způsobeno

existencí vodíkových můstků mezi atomy vodíku molekul vody a kyslíkovými atomy přítomnými ve struktuře neionického tenzidu [5, s. 45–47].

2.3 Interakce surfaktantů s pokožkou

Při kontaktu surfaktantů a dalších potenciálních iritantů s pokožkou dochází nejprve k interakci s vrstvou *stratum corneum*, v níž se také projeví první odezvy [1, s. 235]. Ze studií vyplývá, že iritaci způsobují převážně surfaktanty schopné interagovat s kožními proteiny [2, s. 16]. Vědci předpokládají, že k iritaci dochází pouze pokud tenzid pronikne skrz ostnitou vrstvu *epidermis* do hlubších vrstev. Důvodem je 100 krát větší odolnost ostnité vrstvy než odolnost představená vrstvami obsahující živé korneocyty [6, s. 12]. Interakci tenzidů s pokožkou lze vysvětlit pomocí modelů popisujících mechanismy průniku do pokožky [7, s. 90].

2.3.1 Monomerní model průniku do pokožky

Tento model, patřící mezi nejčastěji přijímané teorie, předpokládá, že právě jednotlivé molekuly surfaktantů mohou pronikat do pokožky. Důvodem je jejich menší rozměr a povrchová aktivita, díky čemuž pronikají do pokožky snáze než micelární agregáty, které mohou být pro penetraci příliš velké. V důsledku penetrace molekul povrchově aktivních látek do pokožky následně může dojít k iritaci. Hraniční hodnotou pro tento typ penetrace je kritická micelární koncentrace (CMC), která udává maximální koncentraci tenzidu, kdy se surfaktant v roztoku vyskytuje ve formě monomeru a prostupuje snadno do pokožky. I přes tuto skutečnost ale byly získány důkazy o podráždění pokožky po překročení CMC, což vedlo k zavedení jiné teorie, tzv. micelárního modelu penetrace pokožky [7, s. 90].

2.3.2 Micelární model průniku do pokožky

Tento model popisuje mechanismus průniku do pokožky více komplexně. Dosažením kritické micelární koncentrace dochází ke snížení povrchové aktivity monomeru tenzidu. Jak už bylo zmíněno, micely obecně nesnadno pronikají do pokožky, kvůli své velikosti [7, s. 91]. Avšak u micel dostatečně malých rozměrů, které jsou tvořeny některými anionickými tenzidy, lze průnik do pokožky očekávat. Stabilita prošlých micel není příliš vysoká a dochází k rozpadu na jednotlivé molekuly surfaktantů [8, s. 8]. Přestože je penetrace micely do pokožky méně pravděpodobná, ve studii provedené Moorem a kol. byla prokázána lineární závislost mezi rostoucí koncentrací sodium dodecyl sulfátu (SDS) v roztoku, který přišel do kontaktu s pokožkou, a zvyšujícím se množstvím SDS

detekovaném v pokožce. V rámci studia micelárního modelu je nutno vzít v potaz velikost micelárních agregátů v souvislosti s průměrem póru v kožní bariéře. Z toho důvodu byl sledován vliv přídavku polyethylenoxidu (PEO) do roztoku SDS, přičemž došlo k vzájemné interakci obou složek a vzniku komplexů větších než vykazují samotné micely SDS. Důsledkem bylo snížení potenciálu průniku komplexů do pokožky. Obdobných výsledků bylo dosaženo i přidáním neionického surfaktantu s obsahem jednotek ethylenoxidu PEO [7, s. 91; 9, s. 33–39]. Další studie autorů Ananthapadmanabhan a kol. se zabývala interakcí SCI s proteiny pokožky. Bylo zjištěno, že hodnota kritické micelární koncentrace SCI je nižší než hodnota CMC dodecyl sulfátu sodného a váže se na proteiny asi o 1/5 méně než SDS, při stejných podmínkách a době působení [7, s. 92].

2.3.3 Model korelace hustoty náboje

Monomerní model popisuje průnik pokožkou pouze z krátkodobého hlediska. K popisu dlouhodobé penetrace pokožky slouží model zabývající se poškozením kožní bariéry navázáním anionického surfaktantu na kožní proteiny. Následně dochází ke zvýšení náboje proteinu a botnání pokožky, což vede ke zvýšení pravděpodobnosti penetrace i pro micelární agregáty. Existuje tak souvislost mezi mírou negativního náboje surfaktantu a mírou vazby na proteiny [7, s. 92; 10, s. 3647].

2.4 Interakce surfaktanů s proteiny a lipidy

Proteiny jsou polymerní látky tvořené aminokyselinami, které obsahují polární a nepolární skupiny, a tvoří až 40 % hmoty *stratum corneum*. Anionické tenzidy jsou schopny vytvořit elektrostatickou vazbu mezi negativně nabitou skupinou surfaktantu a kladně nabitou skupinou aminokyseliny proteinu [7, s. 92, 93]. Interakce tenzidu s proteinem klesá s rostoucí velikostí hydrofilní části tenzidu. Vazba na protein klesá v řadě anionických surfaktantů: sodium dodecyl sulfate nebo sodium laurate > monoalkyl fosfáty > sodium cocoyl isethionate [2, s. 18]. Neionické surfaktanty nejsou schopny tvorby elektrostatických vazeb, ale může docházet ke vzniku kooperativní vazby mezi micelou a proteinem. Výsledkem je rozbalení proteinu a ztráta jeho sekundární struktury. Kombinací anionického a neionického surfaktantu dochází ke snížení hustoty náboje na povrchu směsné micely a poklesu elektrostatických interakcí s proteiny [7, s. 93].

Lipidy jsou jednou z hlavních složek kožní bariéry. Změnou jejich uspořádání ve *stratum corneum* může dojít ke značnému snížení účinnosti této bariéry při ochraně pokožky

[7, s. 93]. Jak již bylo zmíněno, anionické surfaktanty jsou na rozdíl od ostatních tenzidů schopny vazby s proteiny. Amfoterní a neionické surfaktanty jsou pak spojovány především se solubilizací lipidů [3, s. 698]. V koncentracích blízkých CMC surfaktantu může docházet k uzavírání lipidů do vzniklých micelárních agregátů, vedoucímu k jejich odstranění ze *stratum corneum*. Tento jev byl potvrzen studií, která sledovala úbytek lipidů v pokožce po expozici roztoku SDS s koncentrací vyšší než jeho CMC [11, s. 341]. Současně se surfaktanty obsahující nabitě skupiny v molekule mohou vázat na lipidovou dvojvrstvu ve *stratum corneum* a měnit její organizaci, což následně vede ke zvýšení propustnosti a destabilizaci [2, s. 18]. Bylo také prokázáno, že různé surfaktanty mohou odstraňovat různé typy lipidů [7, s. 94].

2.5 Možnosti snížení iritace způsobené surfaktanty

Vzhledem ke každodennímu používání oplachové kosmetiky obsahující surfaktanty je problematika potenciální iritace velmi důležitým a diskutovaným tématem přímo souvisejícím se zachováním zdravé pokožky. Primární složky oplachové kosmetiky tvoří nejčastěji anionické tenzidy v kombinaci s amfoterním nebo neionickým zástupcem. Právě kombinace anionických surfaktantů s jinými tenzidy představuje jednu z možností snížení iritačního potenciálu vůči pokožce. Důležitým parametrem je v tomto případě jejich poměr ve složení kosmetického přípravku [7, s. 94]. Důvodem příznivého vlivu kombinace anionického a amfoterního nebo neionického surfaktantu může být snížení hustoty náboje a stabilizace micel tvořených pouze anionickými monomery, zabraňující tak rozpadu agregátů a penetraci do pokožky [3, s. 697]. Další možností je přidavek polymerních sloučenin, které dokáží ovlivnit průchod micel do pokožky (viz Kapitola 2.3.2). Například kombinací hydrofobně modifikovaného polymeru se surfaktantem dochází k jejich agregaci vedoucí ke snížení iritace [7, s. 94, 95].

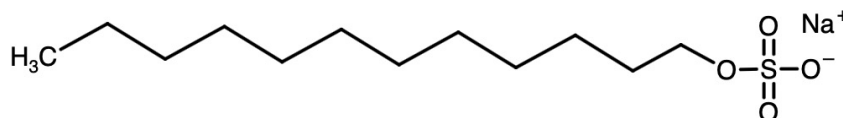
Součástí formulace jsou často hydratační přísady, které by měly vyvažovat vysušení pokožky způsobené surfaktanty. Jednotlivé skupiny hydratačních látek působí proti vysušení pokožky různými mechanismy. Například emolienty mohou pronikat do pokožky a hydratovat hlubší vrstvy, současně tak existuje možnost, že zabraňují interakci proteinů pokožky se surfaktanty. Jednou z nejčastěji využívaných hydratačních složek je glycerol, jehož nevýhodou je vysoká rozpustnost ve vodě. Důsledkem je tak odplavení glycerolu při oplachování pokožky [3, s. 699; 7, s. 95].

2.6 Charakteristika vybraných zástupců surfaktantů

Pro experimentální část této bakalářské práce byli vybráni zástupci různých skupin surfaktantů, a to klasické anionické, které jsou obecně považovány za silnější iritanty, dále pak anionické tenzidy s můstky, jeden zástupce amfoterních surfaktantů, a dva neionické surfaktanty, u nichž jsou deklarovány mírnější účinky na pokožku.

2.6.1 Sodium dodecyl sulfate

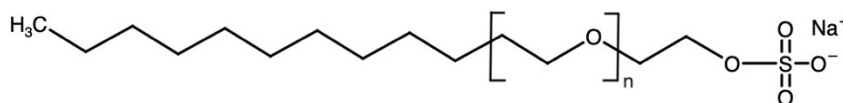
Laurylsulfát sodný, dle INCI označován jako sodium lauryl sulfate (SLS), je anionický tenzid často užívaný v oplachové kosmetice. Jeho molekula je tvořena hydrofilní sulfátovou skupinou se sodným protiiontem a hydrofobním uhlovodíkovým řetězcem o délce 12 uhlíků, jedná se tedy o sodnou sůl alkylsírany (Obrázek 4). Je dobře rozpustný ve vodě a v koncentraci nad 30 % tvoří gely, avšak je poměrně citlivý na tvrdou vodu. V kosmetických přípravcích má vhodné pěnicí, smáčecí a detergenční vlastnosti a je často využíván jako primární ingredience šamponů v kombinaci s amfoterními tenzidy [5, s. 164].



Obrázek 4 Strukturální vzorec SDS, vlastní zdroj

2.6.2 Sodium laureth sulfate

Laurethsulfát sodný, v INCI označován jako sodium laureth sulfate (SLES), je anionický surfaktant s podobnou molekulární strukturou jako SDS. Ve své molekule však obsahuje kromě hydrofilní sulfátové skupiny a hydrofobního uhlovodíkového řetězce navíc tzv. můstek, tvořený ethylenoxidovými jednotkami (EO) (Obrázek 5). Mezi jeho významné vlastnosti patří vyšší rozpustnost oproti nemůstkované formě molekuly, detergenční schopnost ve tvrdé vodě a nižší dráždivost k pokožce. Obdobně jako SDS má výbornou pěnicí a emulgační schopnost, proto je SLES často využíván jako náhrada alkylsulfátů v oplachové kosmetice [5, s. 166].



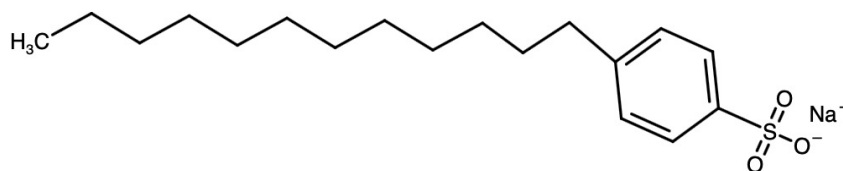
Obrázek 5 Strukturální vzorec SLES, vlastní zdroj

2.6.3 Sodium coco sulfate

Dalším vybraným zástupcem anionických surfaktantů je kokosulfát sodný, dle INCI označován jako sodium coco sulfate (SCS). V molekule obsahuje, obdobně jako u SDS, hydrofilní sulfátovou skupinu. Hydrofobní řetězec je tvořen směsí mastných alkoholů, získávaných z kokosového oleje, na rozdíl od SDS, pro jehož výrobu je využíván pouze lauryl alkohol. Má obdobné vlastnosti jako jeho syntetická verze, ale díky svému rostlinnému původu působí na pokožku mírněji [12, s. 127].

2.6.4 Sodium dodecylbenzene sulfonate

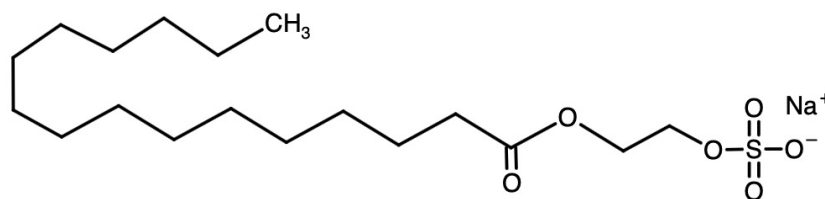
Dodecylbenzensulfonát sodný (SDBS) je anionickým zástupcem tenzidů, jejichž hydrofilní část je tvořena sulfonátovou skupinou. Uhlovodíkový řetězec o délce 12 uhlíků obsahuje navíc i benzenové jádro (Obrázek 6). Jedná se o druhý nejvíce produkováný tenzid ve světě z důvodu snadné výroby a stability dodecylbenzensulfonové kyseliny při transportu. V kyselém ani zásaditém prostředí nehydrolyzuje a je rozpustný ve vodě. Má optimální pěnicí, smáčecí i detergenční schopnosti. SDBS nepatří mezi vhodné ingredience oplachové kosmetiky, z důvodu vysoké dráždivosti vůči kůži, častěji bývá využíván v práškových pracích prostředcích [5, s. 175, 176]. V naší práci byl vybrán jako reprezentant s deklarovanými horšími dermatologickými vlastnostmi.



Obrázek 6 Strukturální vzorec SDBS, vlastní zdroj

2.6.5 Sodium cocoyl isethionate

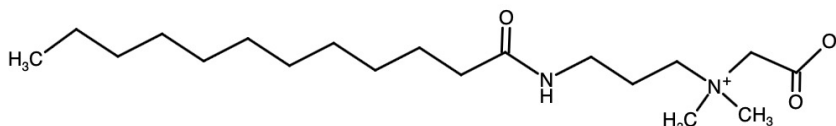
Jedná se o anionický tenzid, v INCI označován jako sodium cocoyl isethionate (SCI), jehož molekula je tvořena 2-hydroxyethansulfonátem sodným a mastnými alkoholy získávanými z kokosového oleje (Obrázek 7). Je špatně rozpustný ve studené vodě a hydrolyzuje v kyselém a alkalickém prostředí. Má dobré pěnicí vlastnosti a schopnost dispergovat vápenatá mýdla. SCI je vhodnou ingrediencí toaletních mýdel, jeho širšímu využití ovšem brání jeho vysoká cena [5, s. 184].



Obrázek 7 Strukturní vzorec SCI, vlastní zdroj

2.6.6 Cocamidopropyl betaine

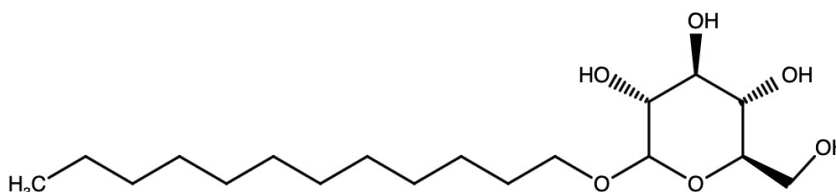
Kokamidopropyl betain, v INCI označován jako cocamidopropyl betaine (CAPB), je významným zástupcem amfoterních surfaktantů. Amfoterní jednotku molekuly CAPB tvoří karboxylový anion a kvarterní amoniový kation, na který jsou navázány dva methylové zbytky a propylamid kokosové mastné kyseliny (Obrázek 8). Skupina amidobetainů je obecně stabilní při všech hodnotách pH a kompatibilní s ostatními zástupci surfaktantů. Mají dobrou detergenční, pěnicí a smáčecí schopnost. Díky schopnosti stabilizovat pěnu a snížit dráždivost k pokožce je kokamidopropyl betain často využíván v kombinaci se SLES jako součást většiny výrobků oplachové kosmetiky [5, s. 213].



Obrázek 8 Strukturní vzorec CAPB, vlastní zdroj

2.6.7 Lauryl glucoside

Zástupcem neionických surfaktantů je laurylglukosid (LG) s alkylovým řetězcem o délce 12 uhlíků (Obrázek 9) [5, s. 226]. Lauryl glucoside je připravován reakcí glukózy a mastných alkoholů [6, s. 1]. Je snadno rozpustný ve vodě a má výborné pěnicí schopnosti [5, s. 226]. V kosmetických přípravcích bývá často kombinován s anionickými tenzidy, které zvyšují jeho detergenční schopnost a stabilizují pěnu [6, s. 2].



Obrázek 9 Strukturní vzorec LG, vlastní zdroj

2.6.8 Coco glucoside

Coco glucoside (CG) patří do skupiny neionických surfaktantů se strukturou podobnou laurylglukosidu, rozdílem je nahrazení uhlovodíkového řetězce dodecyly delší strukturou tvořenou mastnými alkoholy pocházejícími z kokosu [13, s. 857].

3 *IN-VIVO* METODY STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU SURFAKTANTŮ

Iritační potenciál surfaktantů lze stanovit metodami prováděnými na pokožce dobrovolníků, tedy *in-vivo*. Testování na reálné pokožce může poskytnout vysoce relevantní výsledky, zvláště pokud zkouška imituje každodenní používání oplachové kosmetiky, jako např. exaggerated half-face wash metoda (metoda využívající „přehnané mytí poloviny obličeje“). Avšak tyto postupy mohou být ovlivněny environmentálními faktory, jako je klima a roční období, což bylo potvrzeno naměřením nižší reakce na SDS v letním období ve studii, kterou vedli Agner a Serup [1, s. 239]. Mezi další *in-vivo* metody patří např. uzavřený nebo otevřený náplast'ový, neboli patch test.

3.1 Náplast'ové testy (Patch testy)

Principem této *in-vivo* metody je ošetření pokožky dobrovolníka testovaným potenciálním iritantem a překrytí ošetřeného místa náplastí po určitý definovaný časový interval, který se v různých provedeních patch testu liší. Původní postup zavedený Phillipsem a kol. trval maximálně 21 dní, ale pozdější studie provedená Burgerem a Bowmanem dokázala, že mezi 14. a 21. dnem k významným změnám na pokožce nedochází, tudíž byla doba působení iritantu zkrácena na 14 dní. Další modifikace byla zavedena Maibachem a Marzullim, kteří vyvinuli Human Repeated Insult Patch Test (HRIPT), spočívající v opakování aplikace iritantu, výměně náplasti třikrát za týden a současném zaznamenávání vzniku potenciálního erytému na ošetřené pokožce. Existuje i další typ patch testu, ve kterém je iritant ponechán na kůži dobrovolníka pouze do doby, kdy na jeho pokožce vznikne erytém, maximálně ale na dobu 4 hodin [1, s. 238].

Dalším způsobem provedení patch testu je tzv. metoda mýdlové komory (angl. soap chamber test), navržená Froschem a Kligmanem. V tomto testu figuruje panel dobrovolníků, kteří vykazují vysokou citlivost pokožky a tedy i silnou odezvu při zkoušce patch testu s roztokem SDS nebo roztokem mýdla o dané koncentraci. U vybraných jedinců je nejprve 5–8% roztok mýdla aplikován na pokožku po dobu 24 hodin. Patch test je pak zopakován ještě čtyřikrát se zkrácenou dobou působení iritantu na 6 hodin a metoda je vyhodnocena 3 dny po posledním zopakování. S využitím této techniky bylo možné rozlišit působení syntetického detergentu obsahujícího SCI od použití klasického tuhého mýdla, které způsobilo vyšší stupeň iritace. Opět byla metoda provedena i s kratším intervalem doby působení iritantu,

přičemž vyhodnocení prováděl zkušený pozorovatel, popř. byl využit kolorimetr nebo byla změřena transepidermální ztráta vody pomocí evaporimetru [1, s. 238–39; 14, s. 37, 38].

Na závěr je důležité zmínit, že provedení patch testu nebere v potaz ostatní faktory mající vliv na výskyt iritační reakce, proto byly postupně během let vyvíjeny další metody testování iritačního potenciálu surfaktantů [1, s. 239].

Obdobou klasického patch testu je metoda otevřené aplikace, v rámci níž je pokožka ošetřená potenciálním iritantem vystavena vnějším vlivům. Výsledky naměřené Wilhelmem a kol. poukázaly na rozdílnou reakci pokožky na surfaktant získanou uvedenými metodami. Zatímco uzavřený patch test vedl ke vzniku erytému, metoda otevřené aplikace způsobila pouze vysušení pokožky [1, s. 241; 15, s. 986].

3.2 Zátěžové testy

Tyto metody byly vyvinuty za účelem simulace skutečného používání komerčních produktů. Zahrnují tak kromě iritačního potenciálu složek kosmetických přípravků i vliv dalších faktorů souvisejících s jejich použitím [1, s. 239].

Principem metody nadměrného neboli tzv. „přehnaného“ mytí poloviny obličeje je omývání obličeje klasickým mýdlem a syntetickým detergentem v intervalu 2 minut dvakrát denně po dobu 4–5 dnů. Výsledky jsou následně stanoveny porovnáním vzniku erytému a sensorických projevů iritace. Na základě této metody vznikly další oplachové testy, tentokrát prováděné na pokožce rukou. Hlavní změny spočívaly ve způsobu nanesení iritantu na pokožku, jeho použité formě (pěna), intervalech opakování působení a definování meze testování. Důsledkem změn bylo jednodušší vyhodnocení výsledků testovaných vzorků, snížení vlivu environmentálních faktorů, nebo např. možnost hodnocení působení iritantu do větší hloubky pokožky [1, s. 239, 240]. Například metoda s názvem arm-flex wash test sleduje vliv surfaktantu po omytí loketní jamky roztokem obsahujícím sledovaný vzorek v intervalu dvakrát denně po dobu dvou týdnů. Vyhodnocení je pak provedeno sledováním vizuálních změn pokožky a subjektivním zhodnocením sensorických projevů iritace dobrovolníkem [6, s. 4].

Některé pracovní pozice zahrnují četné mytí rukou, což vede k vyšší pravděpodobnosti vzniku iritace. Proto byly vyvinuty testy za účelem přiblížení *in-vivo* metod reálnému používání výrobků spotřební chemie na bázi surfaktantů, hlavně v oblasti kvantifikace kontaktu iritantu s pokožkou. Jednou z metod je test opakovaného mytí rukou mýdlem,

umožňující stanovit poškození pokožky způsobené právě opakovaným kontaktem s iritantem. Vyhodnocení je provedeno zaškoleným pozorovatelem nebo např. pomocí squamometrie (viz Kapitola 1.1) [1, s. 240, 241].

4 *IN-VITRO* METODY STANOVENÍ IRITAČNÍHO POTENCIÁLU SURFAKTANTŮ

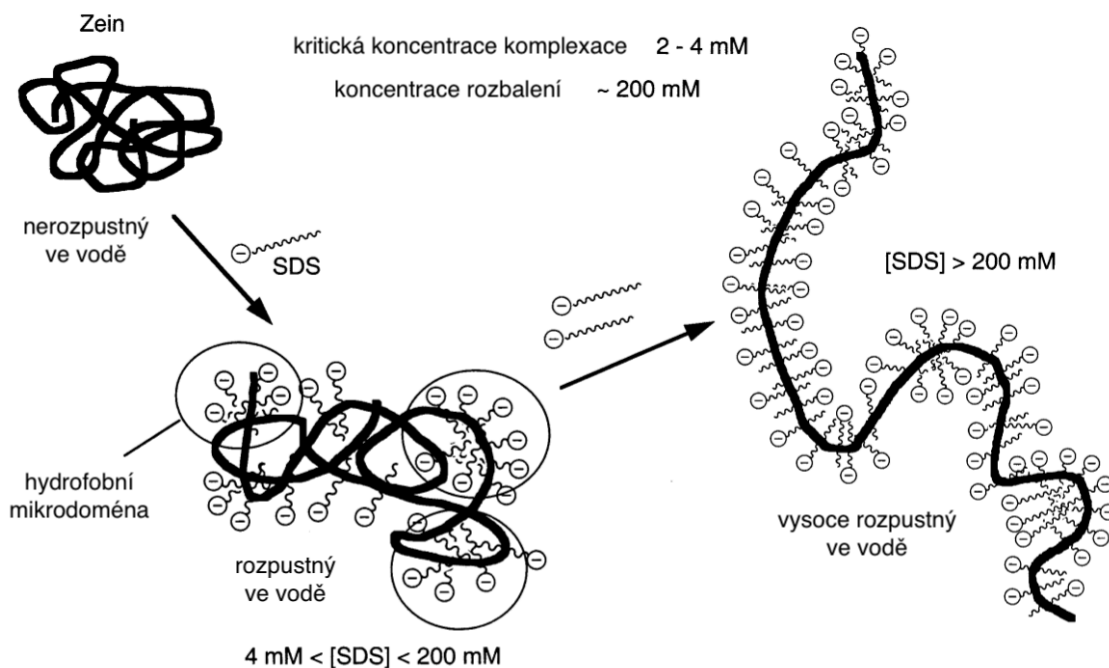
Od roku 2013 podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 je ve státech Evropské Unie zakázáno testovat konečné kosmetické přípravky na zvířatech. Proto byly vynalezeny *in-vitro* metody testování bezpečnosti kosmetických přípravků, které mohou být prováděny např. na uměle vytvořených modelech kůže, buněčných kulturách nebo na proteinech s vlastnostmi shodnými s keratinem [16, s. 1933–1934]. Mezi vhodné proteiny, určené na *in-vitro* testování iritačního potenciálu, lze zahrnout zein a hovězí sérový albumin, které byly využity právě v rámci praktické části této bakalářské práce.

4.1 Stanovení iritačního potenciálu s vyžitím zeinu

Zein je rostlinný globulární protein s vlastnostmi podobnými proteinům obsaženým v *epidermis* (keratinu). Pochází z rostliny kukuřice seté, kde se nachází jako zásobní protein endospermu [17, s. 5083]. Hlavní vlastností zeinu, využívanou v rámci testování potenciální iritace vůči pokožce, je jeho nerozpustnost ve vodě. Interakcí tenzidu s molekulou zeinu dojde k její denaturaci a zein se tak stává rozpustným. Iritační potenciál tenzidu je pak vyhodnocen stanovením množství rozpuštěného zeinu ve vodném roztoku surfaktantu [18].

4.1.1 Princip interakce zeinu se surfaktantem ve vodném roztoku

Jak již bylo zmíněno v Kapitole 2.4, anionické tenzidy jsou schopny interagovat s globulárními proteiny vytvořením elektrostatické vazby mezi negativně nabitou hydrofilní částí molekuly tenzidu a kladně nabitou aminovou skupinou proteinu [18]. Současně dochází k hydrofobním interakcím mezi alkylovým řetězcem molekuly surfaktantu a nepolárními částmi molekuly proteinu [17, s. 5083]. Tyto interakce způsobují denaturaci molekuly zeinu a jeho solubilizaci ve vodném roztoku tenzidu [18]. S rostoucí koncentrací tenzidu v roztoku dochází k naboštění molekuly zeinu, čímž se zvyšuje možnost interakce mezi těmito látkami [17, s. 5087]. V důsledku neutralizace kladných nábojů proteinu dochází k odpuzování záporně nabitých hydrofilních částí molekul surfaktantu, což následně vede k rozbalení proteinové struktury a usnadnění průniku nepolárních částí molekuly tenzidu do proteinu. Zvyšování počtu molekul anionického surfaktantu podél hydrofobního řetězce proteinu vede k dalšímu vzájemnému odpuzování a kompletnímu rozbalení struktury proteinu (Obrázek 10) [17, s. 5087].



Obrázek 10 Interakce molekul SDS s řetězcem zeinu, upraveno dle [17]

4.1.2 Zein test

Zein test slouží k vyhodnocení množství rozpuštěného zeinu v roztoku tensidů. V rámci testu probíhá interakce mezi roztokem surfaktantu o dané koncentraci a definovaným množstvím zeinu. Podmínky interakce (míchání, teplota) se mohou lišit, v závislosti na konkrétním testovaném vzorku. Odstředěním je získán sediment zeinu, který v roztoku tensidů nebyl rozpuštěn, a roztok solubilizovaného zeinu v roztoku tensidů, který je dále analyzován [18].

Vyhodnocení testu probíhá vyjádřením množství organického dusíku, a to většinou pomocí Kjeldhalovy metody, založené na titraci mineralizovaného vzorku, zbaveného přebytečného dusíku, pomocí hydroxidu sodného [12, s. 128]. Množství solubilizovaného zeinu lze také vyhodnotit spektrofotometricky měřením absorbance zředěného roztoku obsahujícího rozpuštěný zein oproti roztoku tensidů, neobsahujícího zein, se stejným zředěním. Absorbance je měřena při vlnové délce 278 nm a množství zeinu je vyhodnoceno metodou kalibrační přímky.

Výsledkem vyhodnocení zein testu je tzv. zein číslo, které udává množství dusíku v mg stanovené ve 100 ml vzorku [18]. Podle hodnot zein čísla lze pak zhodnotit iritační potenciál surfaktantů, a to prostřednictvím rozdělení do skupin: silný iritant odpovídající $ZČ > 400$, střední iritant $ZČ 200-400$, není iritant $ZČ < 200$ [12, s. 129].

4.1.3 Gravimetrické stanovení solubilizovaného zeinu

V rámci gravimetrické metody interaguje známé množství zeinu s vodným roztokem surfaktantu o předem stanovené koncentraci za stálého míchání po dobu jedné hodiny při teplotě 30 °C. Roztok surfaktantu a zeinu se následně odstředí, přefiltruje přes předem zvážený filtrační papír, nechá se vysušit přes noc při teplotě 45 °C a následující den se zváží. Množství rozpuštěného zeinu se následně vypočítá pomocí počáteční hmotnosti zeinu a hmotnosti zeinu získané po interakci s tenzidem. Výsledkem je procentuální vyhodnocení rozpuštěného zeinu ve vodném roztoku surfaktantu [18].

4.1.4 Vliv množství zeinu na jeho rozpustnost

Výsledky metod využívajících zein ke stanovení iritačního potenciálu tenzidů mohou být ovlivněny množstvím zeinu vstupujícího do interakce s tenzidem. Ze studií vyplývá, že s rostoucím množstvím zeinu přidaného do vodného roztoku tenzidu vzrostly i výsledky zein čísla a gravimetricky stanoveného množství rozpuštěného zeinu [17; 18]. Pomocí těchto studií byla následně stanovena minimální koncentrace roztoku tenzidu, potřebná k rozpuštění celkového množství zeinu přidaného do roztoku. Stanovení vhodného poměru vstupujícího množství zeinu a koncentrace roztoku tenzidu je tedy významným faktorem ovlivňujícím následnou vhodnou interpretaci výsledků jejich vzájemné interakce [18].

4.2 Stanovení iritačního potenciálu s využitím hovězího sérového albuminu

Metoda spočívá ve stanovení denaturace proteinu, způsobené působením tenzidu, měřením změny pH roztoku hovězího sérového albuminu v roztoku stanovovaného tenzidu.

Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin, BSA) je protein se strukturou podobnou keratinu, díky čemuž lze sledovat účinky tenzidů na proteiny v pokožce. Bylo prokázáno, že interakce mezi surfaktantem a keratinem může vést k denuraci α -helixu keratinu rozpletením polypeptidového řetězce. V důsledku této interakce může při mytí pokožky docházet k poškození kožní bariéry [8].

4.2.1 Princip interakce surfaktantu s hovězím sérovým albuminem

Přestože je makromolekula BSA stabilní, může reagovat na různé vlivy (pH, teplota, iontová síla, přítomnost surfaktantů) změnou své struktury [19, s. 37]. V rámci BSA metody je

sledována denaturace hovězího sérového albuminu a změny pH roztoků, k nimž dochází působením roztoku surfaktantu. [8, s. 3].

Princip interakce mezi surfaktantem a BSA spočívá ve schopnosti hydrofilní skupiny anionického tenzidu vázat se na kladně nabitě skupiny hovězího sérového albuminu. Důsledkem této vazby je vznik záporného náboje na molekule proteinu, který následně přitahuje protony vyskytující se v rozpouštědle a hodnota pH celého roztoku tak vzroste. Změna hodnoty pH roztoku je pak přímo úměrná iritačnímu potenciálu testovaného surfaktantu [8, s. 3]. Avšak k interakcím nedochází pouze v případě anionických zástupců povrchově aktivních látek. Kladně nabitě hydrofilní skupiny kationických surfaktantů se mohou vázat na záporně nabitě skupiny molekuly BSA a tvořit tak komplexy [19, s. 38]. Metoda je konkrétně prováděna na směsi 2% roztoku hovězího sérového albuminu a 10% roztoku tenzidu. Dále se změří hodnota pH roztoku ihned po smíchání a po 48 hodinách, přičemž rozdíl naměřených hodnot pH slouží k vyhodnocení iritačního potenciálu zvoleného tenzidu [8, s. 11; 12, s. 128].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cíle této bakalářské práce zahrnují:

- přípravu vodných roztoků surfaktantů, resp. jejich směsí a komerčních vzorků
- charakterizaci těchto připravených roztoků (stanovení velikosti částic, zeta potenciálu, kritické micelární koncentrace směsných roztoků a vyhodnocení pěnivosti)
- vyhodnocení iritačního potenciálu pomocí *in-vitro* metod s využitím kukuřičného proteinu zeinu a hovězího sérového albuminu

6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A METODIKA

6.1 Použité chemikálie

Sodium dodecyl sulfate, Sigma Aldrich

Sodium coco sulfate, Handy made

Sodium dodecylbenzene sulfonate, Sigma Aldrich

Sodium cocoyl isethionate, Handy made

Spolapon AES 242/70 (Sodium laureth sulfate), Enapol a.s.

Coco glucoside, Handy made

Lauryl glucoside, Handy made

Flavol KDA (Cocamidopropyl betaine), Enapol a.s.

Ethanol 96%

Zein, Sigma Aldrich

Hovězí sérový albumin, VWR Life Science

Kyselina citronová, PENTA, s.r.o.

Hydroxid sodný, PENTA, s.r.o.

6.2 Použité přístroje

Běžné laboratorní sklo

Plastové zkumavky

Exsikátor, Simax

Tenziometr EasyDyne Krüs

Váhy Kern EW, Sartorius Basic

Zetasizer Malvern Nano-ZS90

Spektrofotometr UV-VIS Jasco V-750

Centrifugátor Hettich D-78532 EBA 20

Magnetické míchadlo Heidolph

Magnetické míchadlo Lavat Chotutice

Magnetické míchadlo Heidolph MR 1000

pH metr CPH 51

Sušárna Memmert

6.3 Testované vzorky

Celkem bylo hodnoceno 8 vzorků jednotlivých surfaktantů (viz Tabulka 1), 2 jejich směsi, a dále pak 5 komerčních vzorků oplachové kosmetiky (viz Tabulka 2).

Tabulka 1 Testované vzorky surfaktantů

Název surfaktantu (INCI)	Zkratka
Sodium dodecylbenzene sulfonate	SDBS
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Sodium coco sulfate	SCS
Sodium laureth sulfate	SLES
Sodium cocoyl isethionate	SCI
Cocamidopropyl betaine	CAPB
Lauryl glucoside	LG
Coco glucoside	CG
Sodium coco sulfate + Coco glucoside	SCS+CG
Sodium cocoyl isethionate + Coco glucoside	SCI+CG

Tabulka 2 Testované komerční vzorky oplachové kosmetiky

Název	Složení (INCI)
Alverde sprchový gel relax	Aqua, Sodium Coco-Sulfate, Coco-glucoside, Lauryl glucoside, Maris Sal, Aloe Barbadensis Leaf Juice, Citric Acid, Sodium Lactate, Levulinic Acid, Glyceryl Oleate, Glycerin, Sodium Levulinate, Sodium Anisate, Alcohol denat., Levandula Hybrida Flower Extract, Lactic Acid, Tocopherol, Hydrogenated Palm Glycerides Citrate, Lecithin, Ascorbyl Palmitate, Parfum, Linalool, Citronellol
Ziaja Cocoa Butter krémové sprchové mýdlo	Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropyl Betaine, Glycerin, Styrene/Acrylates Copolymer, Coco-Glucoside, Panthenol, Sodium Cocoabutteramphoacetate, Sodium Chloride, Cocamide DEA, PEG-7 Glyceryl Cocoate, Disodium EDTA, Sodium Benzoate, 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol, Parfum (Fragrance), Citric Acid, CI 47005, CI 16035, CI 42090
La Roche- Posay Effaclar čisticí gel pro mastnou citlivou pleť	Aqua, Sodium Laureth Sulfate, PEG-8, Coco-Betaine, Hexylene Glycol, Sodium Chloride, PEG-120 Methyl Glucose Dioleate, Zinc PCA, Sodium Hydroxide, Caprylyl Glycol, Citric Acid, Sodium Benzoate, Phenoxyethanol, Parfum/Fragrance
Matrix Food For Soft hydratační šampon	Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Sodium Lauryl Sulfate, Cocamidopropyl Betaine, Sodium Chloride, Glycol Distearate, Hexylene Glycol, Parfum/Fragrance, Cocamide MEA, Citric Acid, Sodium Benzoate, Sodium Hydroxide, Dimethicone, Carbomer, Coco-Betaine, Salicylic Acid, Guar Hydroxypropyltrimonium Chloride, Menthol, Amodimethicone, Glycerin Persea Gratissima Oil/Avocado Oil, Linalool, Trideceth-10, Benzyl Salicylate, Benzyl Alcohol, Coumarin, PEG-100 Stearate, Steareth-6, Sodium Hyaluronate, Limonene, Trideceth-3, Phenoxyethanol, Fumaric Acid, Acetic Acid, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil/Sunflower Seed Oil, Rosmarinus Officinalis Leaf Extract/Rosemary Leaf Extract
Old Spice sprchový gel a šampon	Aqua, Sodium Lauryl Sulfate, Cocamidopropyl Betaine, Sodium Chloride, Parfum, Benzyl Alcohol, Sodium Benzoate, Sodium Citrate, Sodium Xylenesulfonate, Sodium Salicylate, Citric Acid, Linalool, Disodium EDTA, Sodium Hydroxide, Hexyl Cinnamal, Citronellol, CI 42090, CI 17200



Obrázek 11 a) Alverde sprchový gel relax, b) Ziaja Cocoa Butter krémové sprchové mýdlo, c) La Roche-Posay Effaclar čistící gel pro mastnou citlivou pleť, d) Matrix Food For Soft hydratační šampon, e) Old Spice sprchový gel a šampon

6.4 Tenziometrické měření

Za účelem stanovení kritické micelární koncentrace směsných roztoků bylo provedeno měření povrchového napětí jednotlivých vzorků. Byly připraveny zásobní roztoky SCS (sodium coco sulfate) o koncentraci $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a CG (coco glucoside) o koncentraci $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Navážky pro jednotlivé roztoky byly vypočítány dle vzorce (Rovnice 1). Vypočítané množství surfaktantu bylo naváženo do kádinky, rozpuštěno v destilované vodě a kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml. Připravené roztoky jednotlivých surfaktantů byly následně smíchány a převedeny do odměrné baňky o objemu 200 ml.

$$m = c \cdot M \cdot V \quad (1)$$

Kde m je hmotnost navážky surfaktantu potřebného pro přípravu roztoku [g], c je koncentrace připravovaného roztoku [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$], M je molární hmotnost surfaktantu [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] a V je objem připravovaného roztoku [l].

Obdobně byl připraven i druhý směsný zásobní roztok, tvořený 30mM roztokem SCI (sodium cocoyl isethionate) a 30mM roztokem CG (coco glucoside).

Z těchto zásobních roztoků byly připraveny pracovní roztoky v rozsahu koncentrací 0,09 až 7,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro směs SCS+CG a 0,03 až 2,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro směs SCI+CG, které byly využity pro měření povrchového napětí při teplotě 25 ± 1 °C. Z výsledných hodnot byl sestaven graf závislosti povrchového napětí na koncentraci roztoku směsi, z něž byla vypočtena hodnota kritické micelární koncentrace. Body grafu byly proloženy dvěma lineárními spojnicemi, jejichž rovnice byly položeny do rovnosti (dle Rovnice 2). Získaná hodnota x odpovídá průsečíku těchto rovnic a současně udává hodnotu CMC směsi. Následovně byl vytvořen graf závislosti povrchového napětí na přirozeném logaritmu koncentrace roztoku směsi. Směrnice poklesu povrchového napětí na koncentraci k byla použita pro výpočet Gibbsovy adsorpční izotermy (dle Rovnice 3). Na závěr byla vypočtena Gibbsova energie (dle Rovnice 4) a plocha, kterou zaujímá jedna molekula surfaktantu na rozhraní (dle Rovnice 5).

$$k_1 \cdot x + q_1 = k_2 \cdot x + q_2 \quad (2)$$

$$\Gamma = -\frac{k \cdot 10^{-3}}{R \cdot T} \quad (3)$$

$$\Delta G_m = R \cdot T \cdot \ln CMC \quad (4)$$

$$a = \frac{1 \cdot 10^{20}}{\Gamma \cdot N_A} \quad (5)$$

Kde Γ vyjadřuje adsorpci na rozhraní, R představuje molární plynovou konstantu [$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$], T vyjadřuje termodynamickou teplotu [K] a N_A je Avogadrova konstanta.

6.5 Měření velikosti a zeta potenciálu částic

Velikost micel a jejich náboj jsou důležitými parametry souvisejícími s jejich stabilitou, ale zejména pravděpodobností jejich průniku do hlubších vrstev pokožky a interakce s proteiny (viz Kapitola 2.3). Pro měření velikosti částic bylo smícháno 0,5 ml 0,7%hm. roztoku surfaktantu s 1 ml destilované vody přefiltrované stříkačkovým mikrofiltrem s velikostí pórů 1,2 μm . Roztok byl následně přelit do kyvety a vložen do Zetasizeru. Zeta potenciál byl měřen na roztoku připraveného smícháním 0,6 μl 0,7%hm. roztoku surfaktantu s 3 ml

přefiltrované vody, který byl pomocí injekční stříkačky dopraven do speciální kyvety určené pro měření zeta potenciálu a kyveta byla opět vložena do Zetasizeru. Výsledky velikosti micel a zeta potenciálu byly následně zaznamenány a zpracovány do grafu.

6.6 Zein test

6.6.1 Příprava roztoku 75% ethanolu

Roztok 75% ethanolu byl připraven pipetováním vypočítaného množství 96% ethanolu (dle Rovnice 6) a doplněním do 100ml odměrné baňky destilovanou vodou po rysku.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (6)$$

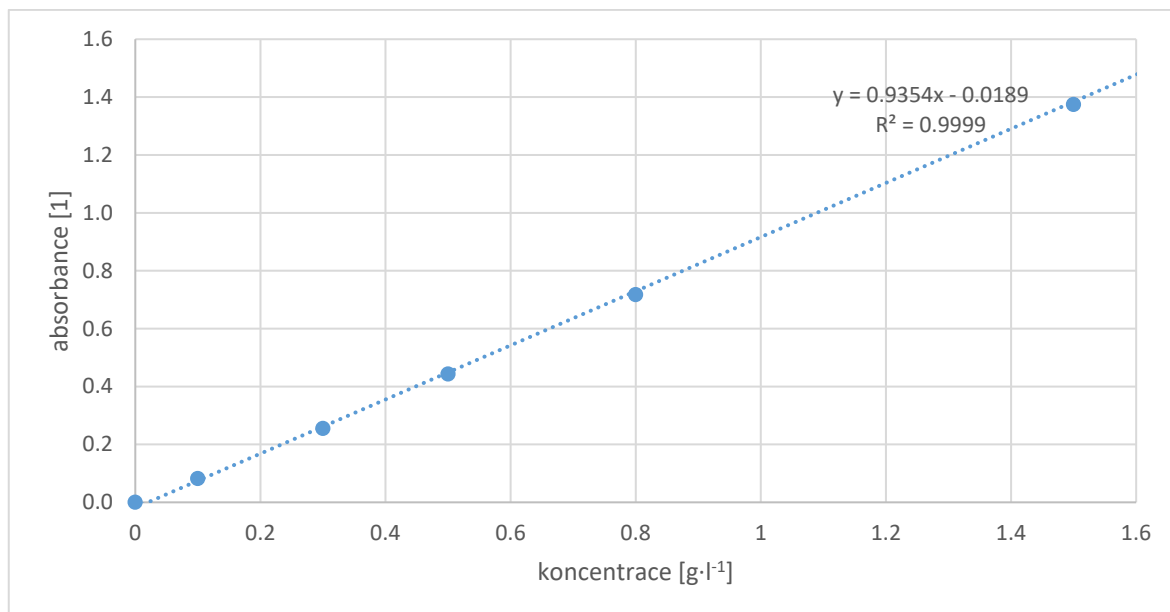
kde c_1 představuje koncentraci výchozího roztoku ethanolu [%], c_2 koncentraci připravovaného roztoku ethanolu [%], V_1 je pipetovaný objem výchozího roztoku ethanolu [ml] a V_2 je objem připravovaného výsledného roztoku ethanolu [ml].

6.6.2 Příprava zásobního roztoku zeinu

Dále byl připraven zásobní roztok zeinu v 75% ethanolu o koncentraci $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Předem vypočítané množství zeinu ($m = 0,075 \text{ g}$) bylo naváženo na analytických váhách s přesností na $0,0001 \text{ g}$ do kádinky. Zein byl rozpuštěn v 75% ethanolu a kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml. Roztok zeinu byl následně doplněn 75% ethanolom po rysku.

6.6.3 Sestrojení kalibrační přímky

Byly připraveny roztoky zeinu o vybraných koncentracích ($0,1$ až $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), a to zředěním (dle Rovnice 6) zásobního roztoku zeinu 75% ethanolom do odměrných baněk o objemu 10 ml. Předem byla stanovena vlnová délka při maximální absorbanci (278 nm), při níž byla změřena absorbance všech připravených kalibračních roztoků zeinu v ethanolu oproti čistému ethanolu. Z naměřených hodnot absorbance roztoků v závislosti na jejich koncentraci byl sestaven graf (Obrázek 12).



Obrázek 12 Kalibrační přímka zeinu

Získaná rovnice závislosti absorbance na koncentraci roztoků zeinu byla dále využita pro výpočet množství solubilizovaného zeinu při provedení zein testu.

6.6.4 Příprava roztoků surfaktantů

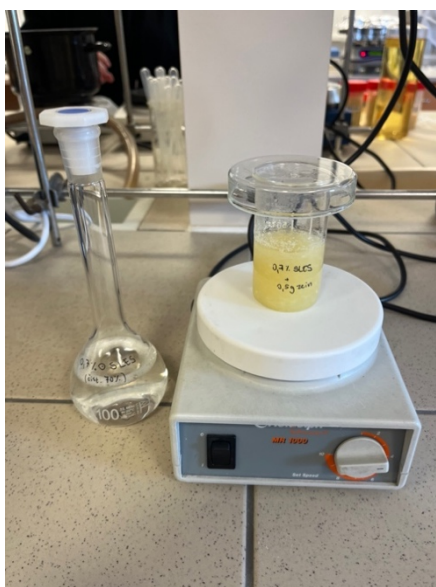
Pro provedení zein testu byly využívány 0,7%hm. roztoky vybraných surfaktantů ve vodě. Postup přípravy těchto roztoků spočíval v navážení daného množství surfaktantu do kádinky (s přesností na 0,0001 g), rozpuštění v malém množství destilované vody, kvantitativním převedení tohoto roztoku do odměrné baňky a doplnění destilovanou vodou po rysku.

Pro hodnocení iritačního potenciálu byly připraveny také dvě směsi surfaktantů, a to na bázi neionického tenzidu coco glucosidu s anionickým sodium coco sulfátem, resp. sodium cocoyl isethionátem. Vzorky byly připraveny vhodným naředěním zásobních směsných roztoků, využitých pro tenziometrické měření (Kapitola 6.4) tak, aby výsledná koncentrace byla srovnatelná s roztoky jednotlivých surfaktantů, tj. 0,7 hm. % (vztaženo vždy na anionický surfaktant).

V případě komerčních vzorků byly pro zein test použity 10%hm. roztoky ve vodě, připravené navážением vypočítaného množství do kádinky a doplněním v odměrné baňce destilovanou vodou po rysku.

6.6.5 Provedení zein testu

Prvním krokem bylo navážení 0,5 g zeinu do kádinky a smíchání s 25 ml roztoku surfaktantu, resp. směsí surfaktantů připravených dle Kapitoly 6.6.4. Následně proběhla interakce obou složek za kontinuálního míchání (500 ot./min.) na magnetickém míchadle po dobu 70 minut při laboratorní teplotě (Obrázek 13).



Obrázek 13 Zein test roztoku SLES

Po uplynutí dané doby se směs nechala dalších 10 minut stát, po čemž následovalo odstředění po dobu 10 minut při 5000 ot./min. Z odstředěné směsi byl odebrán 1 ml supernatantu do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Současně byl stejným postupem připraven i roztok čistého surfaktantu bez zeinu, který sloužil jako referenční roztok. Následně byla změřena absorbance připraveného vzorku oproti referenci. Každé měření bylo provedeno minimálně dvakrát.

Získané hodnoty absorbancí byly pomocí rovnice kalibrační přímky (dle Rovnice 7) přepočítány na koncentraci zeinu, která byla následně využita pro výpočet tzv. zein čísla v mg dusíku / 100 ml směsi (dle Rovnice 8):

$$y = 0,9354 \cdot x - 0,0189 \quad (7)$$

$$Z\check{C} = \frac{c_{zein} \cdot 1000 \cdot 10 \cdot 1}{10 \cdot 0,416} \quad (8)$$

Kde c_{zein} je koncentrace zeinu v $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, faktor 0,416 je přepočet na množství dusíku.

6.7 Gravimetrické stanovení solubilizovaného zeinu

Množství solubilizovaného zeinu ve vodném roztoku surfaktantu lze stanovit nejen spektrofotometricky, ale i gravimetricky. Stanovení spočívá v porovnání hmotnosti zeinu přidávaného do vodného roztoku surfaktantu a hmotnosti zeinu získaného filtrací po interakci s roztokem surfaktantu.

6.7.1 Příprava zásobních roztoků surfaktantů

Pro gravimetrické stanovení solubilizovaného zeinu byly využity vodné roztoky surfaktantů, resp. jejich směsí o koncentraci 0,7 hm. %, případně roztoky komerčních vzorků o koncentraci 10 hm. % připravené stejným postupem jako v Kapitole 6.6.4. Následovala úprava pH těchto roztoků na hodnotu 7 pomocí roztoku NaOH, popř. roztoku kyseliny citronové.

6.7.2 Provedení gravimetrického testu

Z testovaných roztoků surfaktantů, popř. směsí a komerčních vzorků, bylo odebráno 12,5 ml tohoto roztoku a smícháno s 0,5 g zeinu v kádince. Následně proběhla interakce obou složek po dobu 1 hodiny za kontinuálního míchání (500 ot./min.) při teplotě 30 °C. Směsi byly poté přelity do plastových zkumavek a odstředěny po dobu 20 minut při 2000 ot./min. Po odstředění byly vzorky přefiltrovány přes předem zvážené filtry typu KA2, které byly následně umístěny do sušárny, kde byly ponechány 24 hodin při teplotě 45 °C. Následující den byly filtry opět zváženy a ze získaných hmotností bylo vypočítáno procento solubilizovaného zeinu (dle Rovnice 9). Výsledky jsou průměrem ze dvou měření.

$$\text{solubilizovaný zein [\%]} = \frac{m_0 - m_{\text{zein}}}{m_0} \cdot 100 \quad (9)$$

Kde m_{zein} představuje hmotnost zeinu získaného filtrací po interakci s roztokem surfaktantu [g] a m_0 je původní hmotnost zeinu vstupujícího do interakce s roztokem surfaktantu [g].

6.8 Stanovení iritačního potenciálu surfaktantů s využitím hovězího sérového albuminu BSA

6.8.1 Příprava zásobních roztoků surfaktantů

Metoda stanovení iritačního potenciálu surfaktantů s využitím hovězího sérového albuminu (BSA) spočívá v interakci 10% vodného roztoku surfaktantu s 2% roztokem BSA. Zásobní

roztoky surfaktantů o koncentraci 10 hm. % byly připraveny navážením vypočteného množství surfaktantu do kádinky, rozpuštěním v destilované vodě, kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním po rysku.

6.8.2 Příprava zásobního roztoku hovězího sérového albuminu

Pro tuto metodu byl připraven zásobního roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 2 hm. %. Předem vypočtené množství hovězího sérového albuminu bylo naváženo do kádinky, kde bylo rozpuštěno v destilované vodě a kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku.

6.8.3 Provedení testu BSA

Poměr objemů jednotlivých roztoků vstupujících do interakce byl 1:1. Po smíchání roztoku surfaktantu s roztokem BSA bylo nastaveno pH vzniklé směsi na hodnotu přibližně 5,5, tedy optimální pH lidské pokožky, pomocí přídatku roztoku NaOH nebo kyseliny citronové. Následně byla směs ponechána po dobu 48 hodin na tmavém místě při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby interakce bylo změřeno pH směsi.

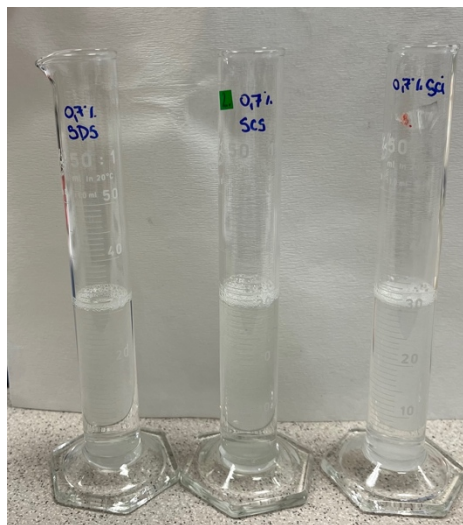
Na základě změny hodnot pH před a po interakci (dle Rovnice 10) byl vyhodnocen iritační potenciál vzorků.

$$\Delta pH [\%] = \frac{pH_2 - pH_1}{pH_1} \cdot 100 \quad (10)$$

Kde ΔpH představuje procentuální změnu pH po uplynutí 48 hodin, pH_2 představuje pH směsi po uplynutí 48 hodin, pH_1 je počáteční pH směsi.

6.9 Stanovení pěnovosti

Pro stanovení pěnovosti roztoků surfaktantů, jejich směsí a komerčních vzorků byla použita Ross-Millesova metoda. Pěnovost byla stanovena pro 0,7%hm. roztoky surfaktantů a jejich směsí a 10%hm. roztoky komerčních vzorků. Ross-Millesova metoda je založena na vytvoření pěny při samovolném vytékání 15 ml roztoku vzorku z pipety umístěné v definované výšce do odměrného válce obsahujícího 15 ml stejného roztoku (Obrázek 14). Následně byla odečtena výška pěny, a to ihned, a poté po uplynutí 30 minut. Pro každý roztok bylo toto stanovení provedeno dvakrát.

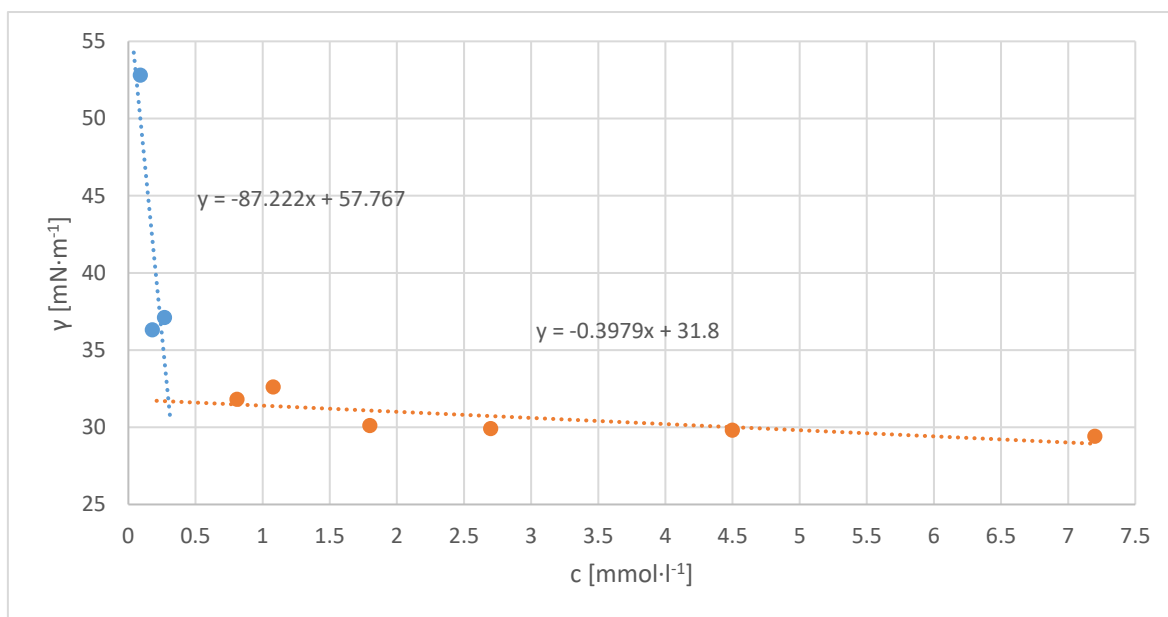


Obrázek 14 Ross-Millesova metoda

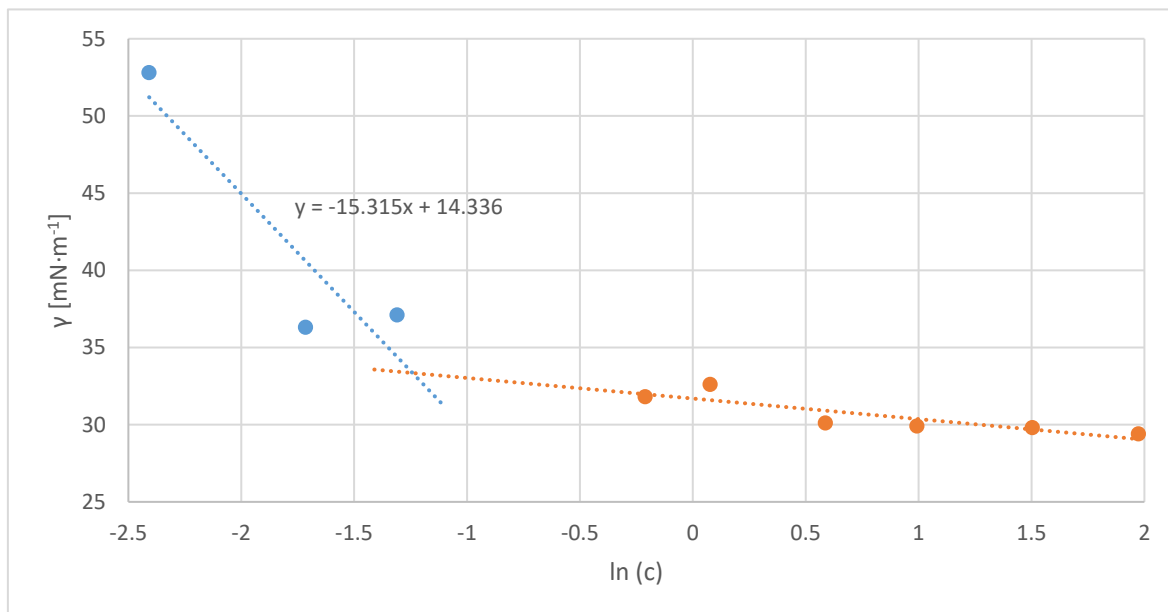
7 VÝSLEDKY

7.1 Stanovení CMC směsí surfaktantů

Měřením povrchového napětí řady roztoků směsí surfaktantů SCS+CG v koncentračním rozmezí 0,09 až 7,2 mmol·l⁻¹ a SCI+CG v koncentračním rozmezí 0,03 až 2,1 mmol·l⁻¹ byly získány grafické závislosti hodnot povrchového napětí na koncentraci roztoku směsi (Obrázek 15). Proložení obou částí grafu přímkovými směrnicemi a vyhodnocením jejich průsečíku byly stanoveny hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC) (viz Rovnice 2). Ze závislosti povrchového napětí na přirozením logaritmu koncentrace (Obrázek 16) byla vypočítána adsorpce na rozhraní (viz Rovnice 3). Hodnota adsorpce na rozhraní byla pak využita pro výpočet plochy, kterou zaujímá jedna molekula surfaktantu na rozhraní (viz Rovnice 5).



Obrázek 15 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci SCS+CG



Obrázek 16 Graf závislosti povrchového napětí na přirozeném logaritmu koncentrace směsi SCS+CG

Výsledné hodnoty CMC, spolu s dalšími micelárními parametry jsou uvedeny v Tabulce 3. Naměřená hodnota kritické micelární koncentrace směsi SCS+CG ($0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byla v porovnání s hodnotou CMC samotného SCS ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) o něco nižší [20, s. 9]. Výraznější rozdíl byl zaznamenán v případě směsi SCI+CG, kdy námi naměřená hodnota činila $0,24 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, tj. o řád nižší oproti samotnému SCI ($2,37 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) [21], lze tedy hovořit o synergickém účinku směsi. Zjištěné hodnoty Gibbovy energie ΔG_m (viz Rovnice 4) byly v obou případech směsi záporné a proces micelizace tak lze považovat za spontánní. Vyšší hodnota adsorpce na rozhraní Γ (viz Rovnice 3), indikující lepší nasycení na rozhraní, byla získána u směsi coco sulfátu s coco glukosidem. V souladu s tímto zjištěním byly stanovené hodnoty plochy a (viz Rovnice 5), kterou zaujímá jedna molekula surfaktantu na rozhraní. Tyto vyšly v případě zmíněné směsi v podstatě poloviční, což značí těsnější uspořádání molekul na rozhraní micely.

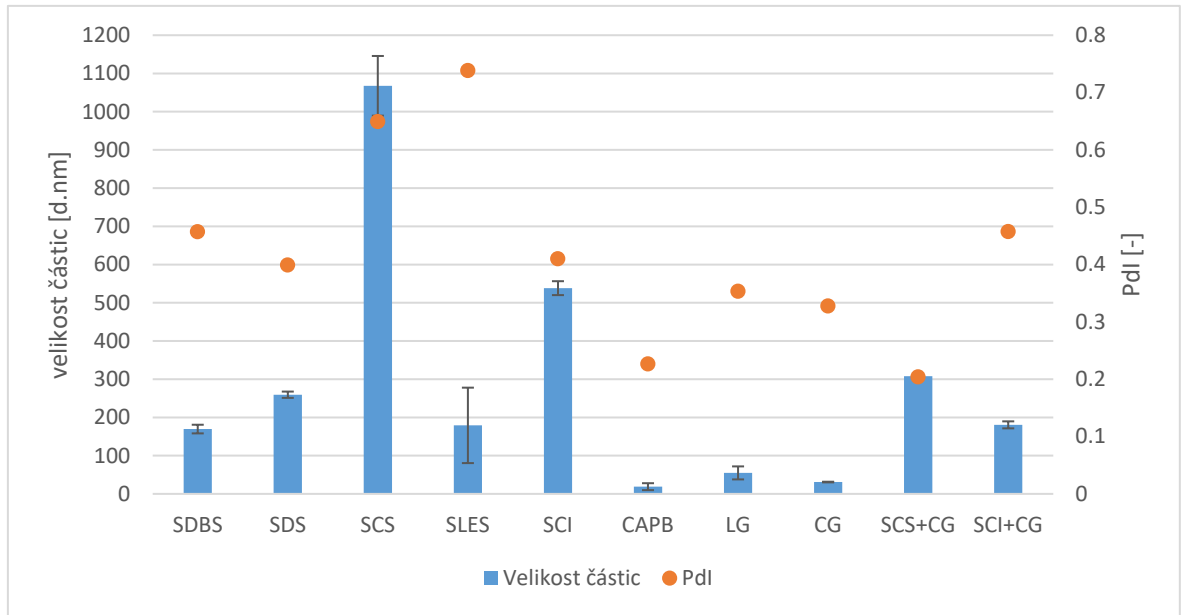
Tabulka 3 Micelární parametry směsných roztoků

	CMC [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Γ [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot 10^{-6}$]	ΔG_m [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]	a [nm^2]
SCS+CG	0,30	6,18	-2,99	0,27
SCI+CG	0,24	3,06	-3,51	0,54

7.2 Stanovení velikosti částic

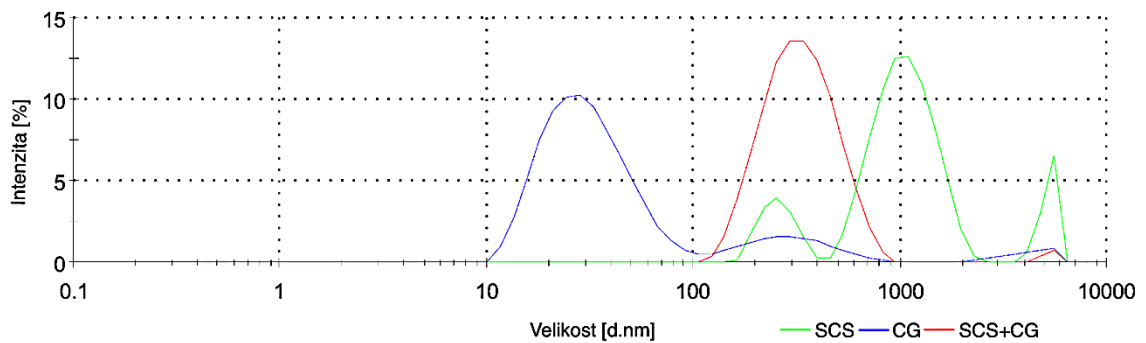
Výsledky měření velikosti částic a hodnoty PDI roztoků surfaktantů jsou shrnuty na Obrázku 17. Je patrné, že byly získány výrazně rozdílné hodnoty v závislosti na konkrétním vzorku. Nejmenší velikost částic (19 nm) byla zaznamenána u roztoku cocamidopropyl betainu, po němž následovaly vzorky glykosidů (s průměrnou velikostí okolo 50 nm). Ferreira a kol. ve své studii [24] zaměřené na interakce CAPB s polymery, stanovili metodou dynamického rozptylu světla hydrodynamický průměr micel CAPB okolo 6 nm, tj. zhruba třikrát menší než námi získaný výsledek. Největší agregáty (1068 nm) byly naměřeny v roztoku sodium coco sulfátu. Na druhou stranu dodecyl sulfát sodný vykazoval velikost micel výrazně nižší (okolo 260 nm). Na základě provedených literárních studií lze konstatovat, že velikost micel se může pohybovat ve velkém rozmezí a může být ovlivněna řadou faktorů. Například autoři Mehta a kol. naměřili pomocí DLS částice o rozměru 1,2 nm, což je o dva řády nižší hodnota než v našem případě (259 nm) [22, s. 334]. Ve studii Mandala a kol. [23, s. 191] byl sledován vliv iontové síly, přičemž bylo zjištěno, že velikost micel SDS v čisté vodě byla řádově nižší (3,2 nm) než rozměr agregátů v ionické kapalině (IL), kde částice dosahovaly velikosti od cca 90 do 160 nm. Důvodem vzniku větších micelárních agregátů může být zvýšení hydrofobicity roztoku v důsledku silné elektrostatické interakce mezi anionickým surfaktantem a kationty ionické kapaliny. Současně může docházet ke vzniku větších směsných micel, tvořených SDS a kladně nabitými skupinami IL. Dalším faktorem, který ovlivňuje velikost micelárních částic, může být specifikace daného surfaktantu použitého pro měření, jelikož ne vždy je snadné získat od výrobce látku o dostatečné čistotě. Například konkrétně u testovaného vzorku SLES (Spolapon AES 242/70) je deklarována čistota 70 %, v případě CAPB (Flavol KDA) výrobce deklaruje pouze 40 %. Surfaktanty nebyly před provedením měření nijak upraveny, jako například ve studii Mehta a kol. [22, s. 332], kde byl SDS přečištěn pomocí ethanolu. Současně mohlo během měření dojít ke vzniku mikroemulzí, popř. výskytu bublinek, které byly přístrojem vyhodnoceny jako agregáty surfaktantu. Velikost agregátů může být také zkreslena anizometrií micel, nebo v důsledku vytvoření hydratovaného obalu okolo částice [24, s. 4].

V případě směsi byl pozorován významný vliv neionického surfaktantu na razantní snížení velikostí micel, oproti jednotlivým anionickým zástupcům (SCI, nebo SCS). V případě směsi SCS s CG došlo ke snížení o 71 %, u vzorku SCI s CG bylo dosaženo poklesu o 66 % (Obrázek 17).

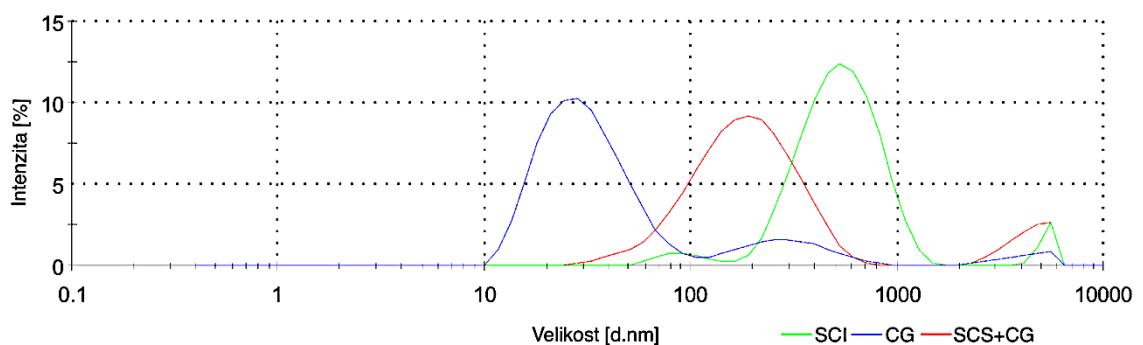


Obrázek 17 Velikost částic a Pdl roztoků surfaktantů a jejich směsí

Výrazný vliv přítomnosti neionického surfaktantu ve směsných micelách lze pozorovat také na grafech distribucí velikosti částic (Obrázky 18 a 19), kdy se hlavní pík směsi objevuje mezi píky jednotlivých tenzidů. V případě anionických tenzidů se objevují tři populace částic, zatímco u směsí převažuje primárně jeden hlavní pík.



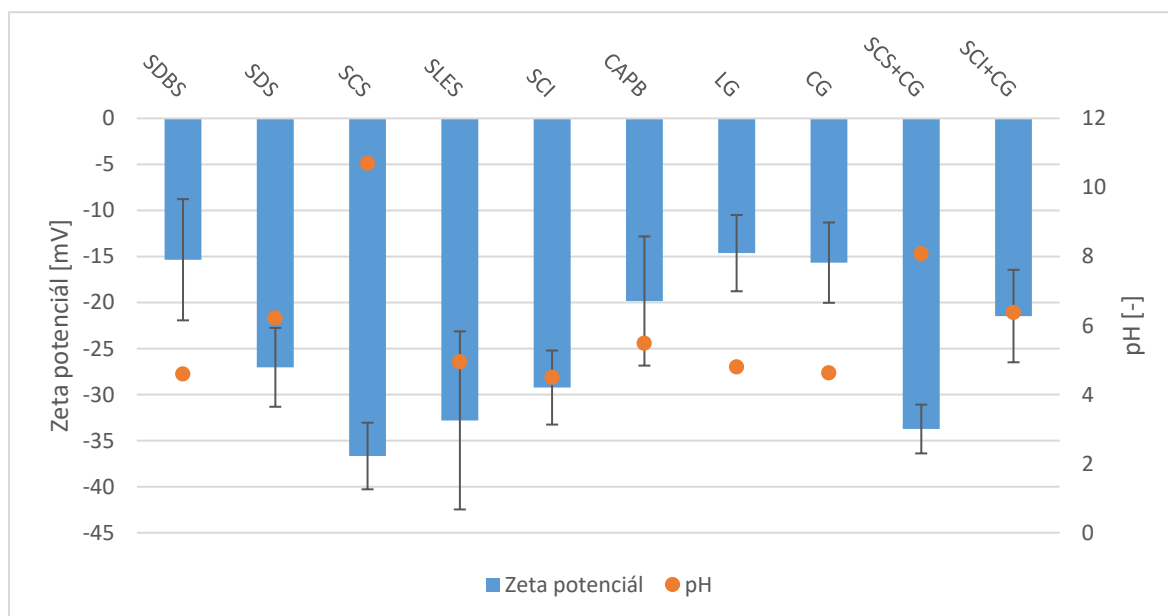
Obrázek 18 Graf distribuce velikosti částic vzorků SCS, CG a směsi SCS+CG



Obrázek 19 Graf distribuce velikosti částic SCI, CG a směsi SCI+CG

7.3 Stanovení zeta potenciálu částic

Zeta potenciál je důležitý parametr indikující náboj na tzv. rovině stírání, který také napomáhá odhadnout příspěvek elektrostatické stabilizace v případě disperzních soustav [19, s. 41]. V grafu na Obrázku 20 lze vidět, že zeta potenciál dosahoval u všech vzorků záporných hodnot, přičemž nejnižší náboj byl, dle teoretického předpokladu, naměřen u roztoků anionických surfaktantů. Nejvíce zápornou hodnotu zeta potenciálu (téměř -37 mV) vykazoval roztok SCS, naopak nejvyšší zeta potenciál (necelých -15 mV) byl naměřen pro roztok neionického surfaktantu LG. Podobně jako u velikosti částic se prokázal vliv přídavku neionického glukosidu do směsi s SCS, resp. SCI, kdy došlo k posunu zeta potenciálu do méně záporných hodnot oproti výsledku naměřenému pro roztoky samotných anionických surfaktantů. Důvodem existence záporného náboje na částicích neionických surfaktantů může být adsorpce různých aditiv z prostředí roztoku, což může vyústit v posun roviny stírání na povrchu částice. Předpokládá se, že negativní náboj se může objevit i jako důsledek ionických nečistot, z nichž některé vykazují také povrchovou aktivitu. Negativní náboj (od -8 do -15 mV) na neionických kopolymerních surfaktantech typu Pluronic byl naměřen i ve studii Tanase a kol., kteří se zabývali studiem vlivu hydrofobicity na propustnost membrány a zvýšení fotoindukované antibakteriální aktivity [25, s. 8].

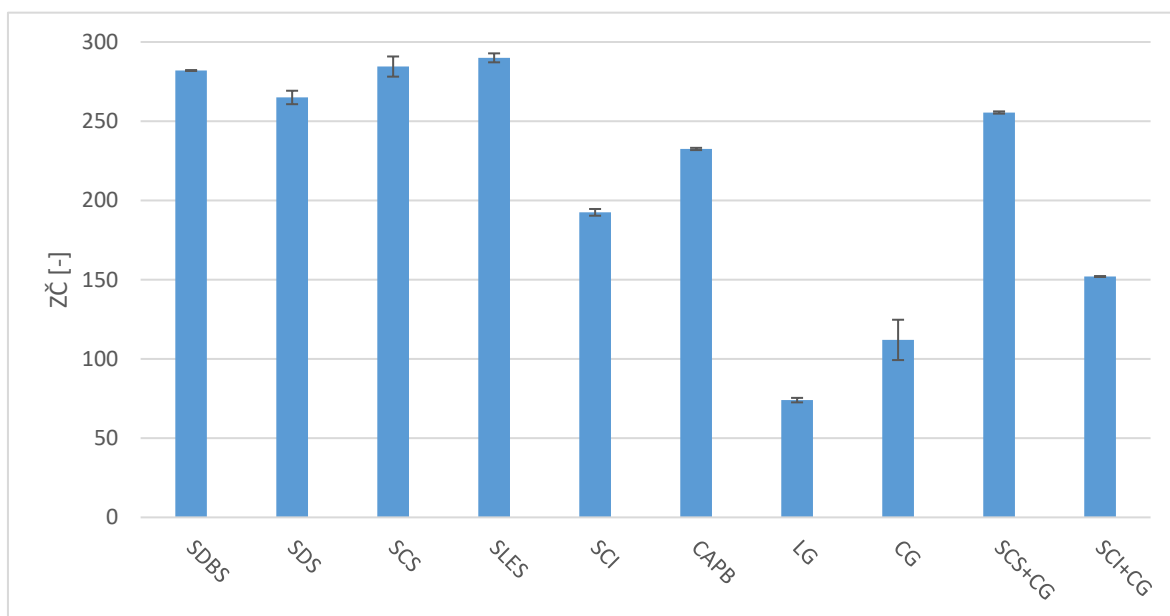


Obrázek 20 Zeta potenciál a pH roztoků surfaktantů a jejich směsí

7.4 Zein test

Stěžejní část práce byla zaměřena na stanovení iritačního potenciálu s využitím proteinu zeinu. Výsledky stanovení zein čísla pro jednotlivé roztoky surfaktantů a jejich směsí jsou shrnuty na Obrázku 21. Nejvyšší hodnoty zein čísla byly naměřeny pro roztoky anionických surfaktantů, u nichž se předpokládá největší tendence k interakci záporně nabitě hydrofilní funkční části molekuly s proteinem. Naopak nejnižší hodnoty vykazovaly roztoky neionických surfaktantů (74 pro vzorek lauryl glukosidu a 112 pro vzorek coco glukosidu). V případě obou směsí anionických a neionických surfaktantů došlo k poklesu hodnoty zein čísla, v porovnání s roztoky jednotlivých anionických tenzidů, lze tedy potvrdit pozitivní vliv kombinace ionické a neionické povrchově aktivní látky pro kosmetické formulace. Důležité je však zmínit vliv poměru / množství neionického surfaktantu ve výsledné směsi. Blagojević a kol. [26, s. 2690] ve své studii sledoval synergické a fyzikálně-chemické vlastnosti směsi ionických a neionických surfaktantů v závislosti na množství (0–5 % hm.) lauramin oxidu (AO). Výsledky studie prokázaly vliv rostoucího množství AO na pokles kritické micelární koncentrace, povrchového napětí a pěnících účinků směsi. Naopak ale nepotvrdily významný vliv na snížení iritačního potenciálu, stanoveného pomocí zein testu, který s rostoucí koncentrací AO ve směsi mírně vzrostl. Autoři studie tento jev odůvodnili skutečností, že snížení hodnoty CMC a povrchového napětí ve směsi obsahující více AO může vést k lepší rozpustnosti zeinu v roztoku a tím i navýšení zein čísla, přestože by neionický surfaktant měl iritační potenciál ionického tenzidu snížit. Solubilizace zeinu v přítomnosti lineárního alkylbenzensulfonátu byla studována autory Cohenem a kol. [18], kteří prokázali nárůst zein čísla při zvyšující se koncentraci tohoto anionického surfaktantu. Konkrétně byly pro koncentrace surfaktantu od 0,25 do 4 hm. % získány hodnoty v rozmezí od necelých 100 do více jak 600 mg N₂/100 ml roztoku. V případě 0,5% roztoku zein číslo činilo 240, tj. přibližně srovnatelné s naším výsledkem pro 0,7%hm. roztok SDBS [18]. Studie Bujaka a kol., ve které byly porovnávány iritační účinky SDS a jeho analogu SCS, přinesla mnohem vyšší hodnoty zein čísla (540) pro 1%hm. roztok SDS oproti naší hodnotě (259) 0,7%hm. roztoku SDS. Zároveň získali nižší hodnotu zein čísla (cca 450) pro 1%hm. roztok SCS v porovnání s jeho analogem SDS. Změny ve stanoveném zein čísle se mohou objevit také v důsledku rozdílného zastoupení mastných alkoholů v molekule SCS, a tím i rozdílné hydrofilně–lipofilní rovnovážné konstanty (HLB) [12, s. 129]. Zein čísla různých anionických surfaktantů dodávaných polskou společností PCC Group byla shrnuta ve studii [27, s. 44, 45]. Pro vzorek na bázi SDS byla získána hodnota zein čísla cca 225, zatímco zein

číslo surfaktantu SLES bylo, v porovnání s naší studií, nižší (cca 130) [27, s. 44, 45]. Z našich výsledků je ovšem zcela patrný významný pokles stanoveného zeinu u neionických vzorků. Podobně ve studii Pezrona a kol. byl zaznamenán výrazný rozdíl zein čísla u ionického SDS (500) a neionického alkylpolyglukosidu (30) [28, s. 286].



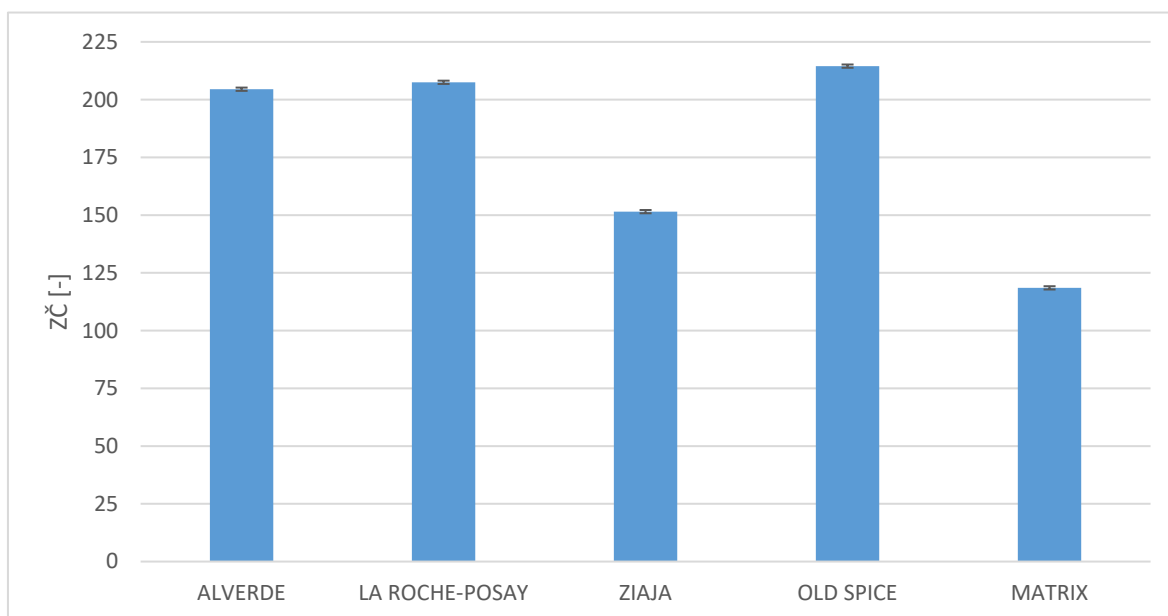
Obrázek 21 Zein čísla roztoků surfaktantů a jejich směsí

V případě SDBS byl test proveden i za změněných podmínek (koncentrace roztoku, doba odstředění, pH), za účelem zhodnocení vlivu těchto faktorů na výsledná zein čísla. Jak lze vidět z Tabulky 4, prodloužení doby odstředění, ani úprava pH neměly výrazný vliv na výsledek stanovení. Na druhou stranu, zvýšení koncentrace roztoku z 0,7 na 5 hm. % způsobilo pokles zein čísla. Autoři Deo a kol., kteří sledovali závislost množství solubilizovaného zeinu na rostoucí koncentraci SDS v roztoku, neprokázali ani významný vliv iontové síly na solubilizaci daného surfaktantu [17, s. 5084].

Tabulka 4 Porovnání zein čísla roztoku SDBS

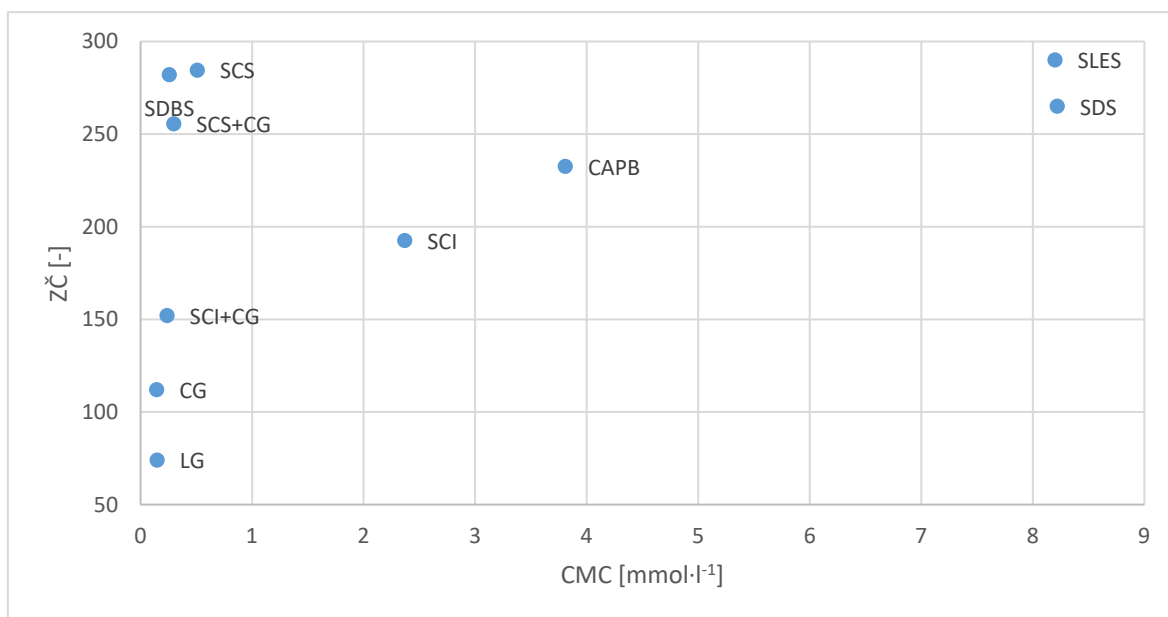
c [hm. %]	Podmínky zein testu	ZČ [-]
0,7	odstředění 10 minut	282 ± 0
	odstředění 20 minut	268 ± 1
5	pH = 4,75	241 ± 0
	pH = 7	248 ± 1

Výsledky stanovení zein čísel 10%hm. roztoků komerčních vzorků jsou znázorněny na Obrázku 22. Nejvyšší hodnota zein čísla (215) byla stanovena pro roztok vzorku Old Spice, která se ovšem výrazně nelišila od vzorku Alverde (205) a La Roche-Posay (208), což nebylo zcela v souladu s teoretickým předpokladem, vzhledem k recepturám uvedených komerčních produktů, konkrétně zastoupení jednotlivých surfaktantů. Nejnižší hodnota zein čísla (119) byla překvapivě prokázána u šamponu Matrix, který obsahuje jak sodium lauryl sulfát, tak jeho ethoxylovaný analog. Ve studii provedené Klimaszewskou a kol. byla naměřena hodnota zein čísla cca 122 pro vzorek mýdla obsahujícího SLES a CAPB. Stejně surfaktanty obsahoval i námi použitý komerční vzorek Ziaja, jehož zein číslo bylo vyšší (152), avšak je nutné zmínit, že kosmetické přípravky obsahují velké množství složek, což může ovlivnit výsledky měření [8, s. 3, 10].



Obrázek 22 Zein čísla roztoků komerčních vzorků oplachové kosmetiky

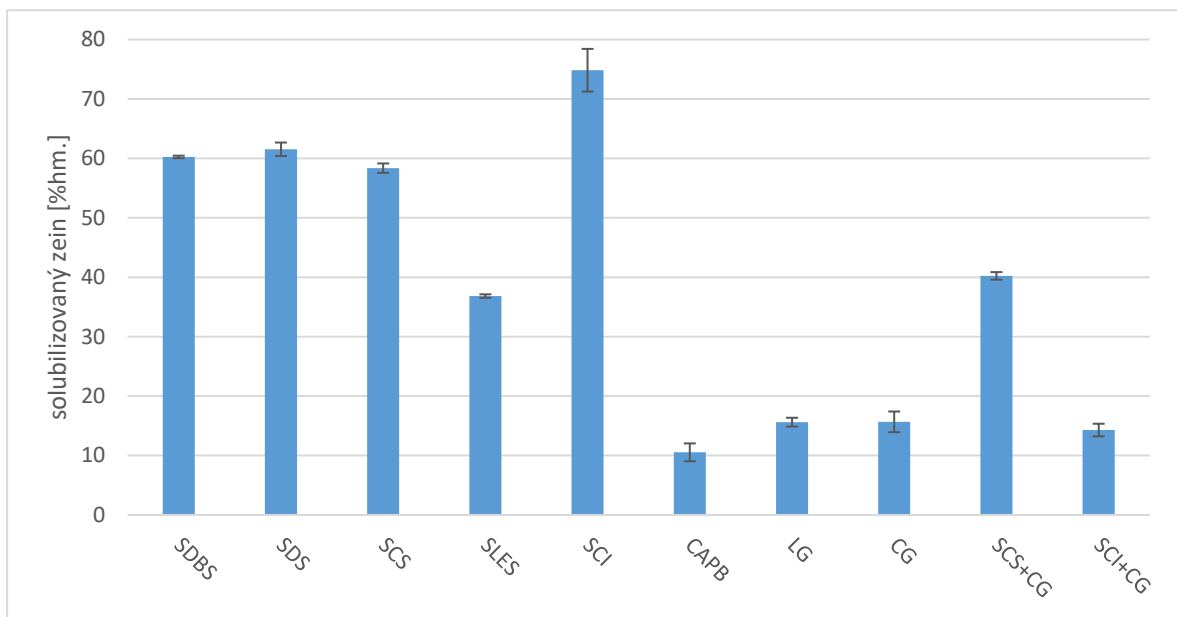
Pro vyhodnocení byl dále sestrojen graf závislosti zein čísla na CMC surfaktantů, přičemž tato byla stanovena v případě některých vzorků tenziometricky (SDS; SDBS; směsi SCS+CG; SCI+CG) a u ostatních byla využita data z literatury (Obrázek 23) [13; 20, s. 8,9; 21; 29–33]. U většiny vzorků lze pozorovat nárůst zein čísla s rostoucí hodnotou CMC, což by potvrdilo teoretický předpoklad, že surfaktanty s nižší CMC vykazují i nižší iritační potenciál.



Obrázek 23 Závislost zein čísla na kritické micelární koncentraci surfaktantů a jejich směsí

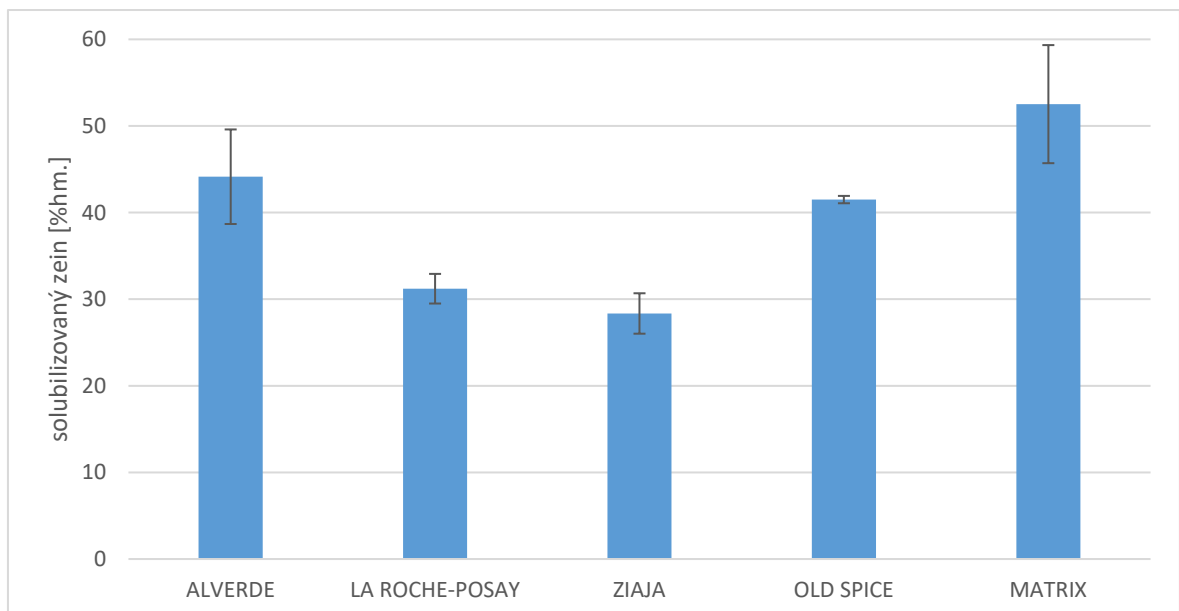
7.5 Gravimetrické stanovení solubilizovaného zeinu

Zeinový protein byl využit i pro stanovení %hm. solubilizovaného zeinu pomocí gravimetrické metody. Výsledné hodnoty získané pro vybrané roztoky a komerční vzorky jsou shrnuty v grafech na Obrázcích 24 a 25. Srovnáme-li výsledky pro jednotlivé roztoky, je patrné, že nejvyšší hodnoty solubilizovaného zeinu (přes 70 %hm.) byly stanoveny u roztoku SCI, dále pak SDS a SDBS vykazovaly hodnoty přes 60 %hm. solubilizovaného zeinu. Na druhou stranu, nejnižší hodnota byla naměřena pro roztok amfoterního CAPB, a také neionických surfaktantů, případně kombinace SCI+CG, kde je patrný výrazný pokles (rozdíl hodnot činí přes 80 %) v porovnání se samotným anionickým tenzidem. Obdobně jako v případě zein testu byly výsledky naměřené pro SDBS porovnány se zjištěními ve studii autorů Cohena a kol., kde pro roztoky alkylbenzensulfonátu o koncentracích 0,5 a 1 %hm. byly získány hodnoty solubilizovaného zeinu nižší, a to 15 a 47 %hm. [18].



Obrázek 24 Množství solubilizovaného zeinu v roztocích surfaktantů a jejich směsí

Výsledky stanovení solubilizovaného zeinu v roztocích komerčních vzorků oplachové kosmetiky jsou znázorněny na Obrázku 25. Nejvyšší hodnota byla naměřena pro roztok Matrixu (53 %hm.), jehož hodnota zein čísla byla z komerčních vzorků nejnižší. Naopak získaná hodnota pro roztok Old Spice (42 %hm.) nepatřila k nejvyšším výsledkům, přestože vykazoval nejvyšší iritační potenciál v porovnání s ostatními komerčními vzorky.



Obrázek 25 Množství solubilizovaného zeinu v roztocích komerčních vzorků

Z výše uvedených dat je patrné, že výsledky získané z obou metod využívajících zein nejsou zcela v souladu a je obtížné vyvodit jednotné závěry ohledně vzorku s nejvyšším iritačním potenciálem. Gravimetrická metoda je velmi citlivá na ztráty v průběhu provádění jednotlivých kroků. Navíc, vzorky zeinu po odstředění vykazovaly různý charakter v závislosti na konkrétním typu surfaktantu.

7.6 Stanovení iritačního potenciálu surfaktantů s využitím hovězího sérového albuminu BSA

Pomocí této metody byl iritační potenciál vyhodnocen jako změna pH směsi 2% roztoku BSA a 10%hm. roztoku surfaktantu, popř. jejich směsi nebo komerčního vzorku. Změny pH (%) zaznamenané v Tabulce 5 jsou vždy průměrem ze dvou měření. Obecně byly naměřeny poměrně nízké hodnoty procentuální změny pH. V porovnání s výsledky studie Bujaka a kol. [12, s. 129], ve které se pH v případě roztoku SDS změnilo až o 33 %, byl námi naměřený rozdíl pH mnohem nižší. Je ovšem nutno zmínit, že v uvedené studii byl experiment prováděn za modifikovaných podmínek, konkrétně byly vzorky míchány 3 hodiny a pH bylo přeměřeno až po 72 hodinách. V případě roztoku sodium coco sulfátu byla ve studii vyhodnocena změna pH po interakci s BSA 29,5 %. Studie Mateosové a kol. [34, s. 6,7] se zabývala interakcí BSA s různými zástupci anionických, kationických, zwitterionických a neionických surfaktantů. V případě zwitterionických a neionických povrchově aktivních látek byla zjištěna nejnižší afinita surfaktantu vůči proteinu, způsobená absencí náboje na hydrofilní části molekuly. Nelze tedy diskutovat denaturaci BSA, jelikož tento typ surfaktantů tvoří pouze kooperativní vazbu s hydrofobními skupinami proteinu, která nevede ke změně uspořádání makromolekuly proteinu. Srovnáním iritačních vlastností běžných syntetických ionických surfaktantů a rostlinného extraktu Mydlice lékařské se zabývala práce Jurekové a kol. [35, s. 8]. Zatímco běžné surfaktanty v této studii vykazovaly vzrůst pH o 0,9 (SLS), 0,8 (SLES) a 0,5 (CAPB), v případě testovaného saponinu byla zaznamenaná změna pH téměř zanedbatelná. Zjištěné rozdíly pH hodnot našich vzorků byly v porovnání s výsledky dané studie ještě o něco nižší, a to konkrétně 0,2 (SLS), 0,07 (SLES) a 0,05 (CAPB).

Tabulka 5 Změny pH roztoků surfaktantů a jejich směsí

Surfaktant	ΔpH [%]
SDBS	-
SDS	$4,0 \pm 2,0$
SCS	$1,5 \pm 0,3$
SLES	$1,3 \pm 1,0$
SCI	$0,7 \pm 0,5$
CAPB	$0,9 \pm 0,0$
SCS+CG	$3,0 \pm 0,3$
SCI+CG	-

- nestanoveno

Obdobně byly zpracovány změny pH roztoků komerčních vzorků (Tabulka 6). Největší změna pH (4,0 %) se projevila u roztoku komerčního vzorku Matrix, zatímco nejmenší rozdíl byl zaznamenán u sprchového mýdla Ziaja. Jak již bylo zmíněno výše, potenciál k podráždění pokožky lze ovlivnit různými přidanými složkami. Vliv přídavku kolagenu do formulace oplachové kosmetiky za účelem snížení iritačního potenciálu surfaktantů obsažených v oplachové kosmetice byl studován autory Klimaszewskou a kol. [36, s. 182–183]. Výsledné hodnoty procentuální změny pH v roztocích BSA a oplachové kosmetiky s obsahem různých typů mořského kolagenu potvrdily žádoucí účinky na snížení hodnoty iritačního potenciálu, konkrétně došlo k poklesu změny pH o 12–30 %. Byl také prokázán vliv rostoucí molekulové hmotnosti kolagenu na snížení iritačního potenciálu [36].

Tabulka 6 Změny pH roztoků komerčních vzorků

Komerční vzorek	ΔpH [%]
ALVERDE	$1,0 \pm 0,0$
LA ROCHE-POSAY	$0,6 \pm 0,2$
ZIAJA	$0,5 \pm 0,0$
OLD SPICE	$2,0 \pm 0,3$
MATRIX	$4,0 \pm 0,2$

7.7 Stanovení pěnivosti

Stanovením pěnivosti pomocí Ross-Milesovy metody byly získány výšky pěny, které byly měřeny ihned a po 30 minutách. Získané rozdíly výšky pěn jsou shrnuty v Tabulce 7. Nejstabilnější pěna byla prokázána u směsného roztoku surfaktantů SCI+CG, zatímco k největšímu poklesu došlo u roztoku SLES. Stabilita pěny je obecně významně ovlivněna velikostí a tvarem vytvořených vzduchových bublin. Zatímco v roztoku SLES mohou vznikat bubliny tvaru mnohostěnu, neionické glykosidické surfaktanty tvoří malé kulaté bubliny s vyšší stabilitou, což mohlo být důvodem lepší výdrže pěny v případě směsných vzorků SCS+CG a SCI+CG [6, s. 2].

Tabulka 7 Pokles pěny roztoků surfaktantů a jejich směsí

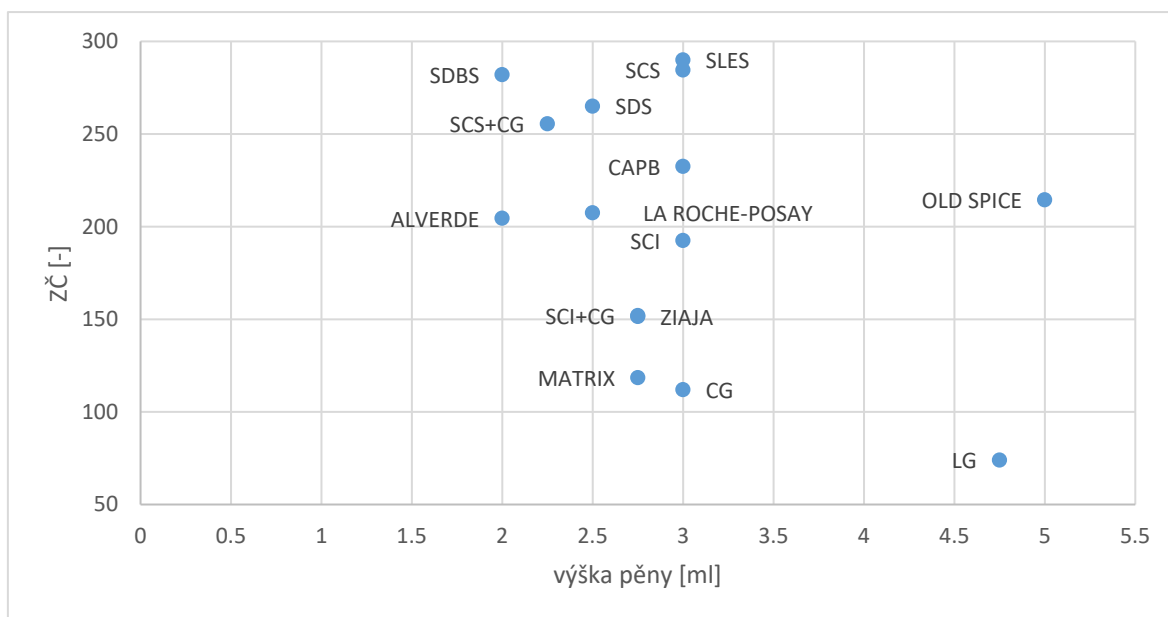
Surfaktant	Pokles pěny [%]
SDBS	27 ± 9
SDS	42 ± 12
SCS	25 ± 12
SLES	42 ± 12
SCI	7 ± 2
CAPB	33 ± 0
LG	8 ± 3
CG	33 ± 0
SCS+CG	14 ± 10
SCI+CG	0 ± 0

V případě komerčních vzorků (Tabulka 8) byla největší stabilita pěny zaznamenána u roztoku komerčního vzorku Old Spice, který v podstatě nevykázal žádnou změnu výšky pěny v určeném čase. Na druhou stranu, největší změny byly stanoveny u vzorků Ziaja a Matrix.

Tabulka 8 Pokles pěny roztoků komerčních vzorků

Komerční vzorek	Pokles pěny [ml]
ALVERDE	13 ± 5
LA ROCHE-POSAY	21 ± 6
ZIAJA	27 ± 10
OLD SPICE	0 ± 0
MATRIX	28 ± 17

Výšky počáteční pěny byly porovnány s hodnotami zein čísla roztoků surfaktantů a jejich směsí. Z grafu (Obrázek 26) nelze potvrdit jednotný trend a souvislost mezi výškou pěny a případným iritačním potenciálem zjištěným na základě stanoveného zein čísla.



Obrázek 26 Graf závislosti zein čísla na počáteční výšce pěny roztoků surfaktantů

Pěnovost produktů oplachové kosmetiky představuje významný parametr, který je většinou spotřebiteli příznivě hodnocen. Na druhou stranu je známo, že přípravky s vyšší pěnovostí mohou způsobovat vysoušení pokožky. Z tohoto důvodu jsou hledány možnosti, jak tyto případné iritační projevy zmírnit. Například v práci Draelosové a kol. [37] byl sledován vliv přídavku hydrofobně modifikovaných polymerů do formulace pěnicího přípravku, který pak prokázal při hodnocení zvolenými dobrovolníky, vykazujícími příznaky citlivé pokožky, lepší výsledky ve srovnání s nepěnivým produktem s deklarovanými mírnými účinky na pokožku.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovit iritační potenciál vybraných surfaktantů, jejich směsí a komerčních vzorků oplachové kosmetiky pomocí *in-vitro* metod využívajících proteiny jako modelové látky podobné složkám pokožky. S využitím zeinu bylo vyhodnocení provedeno spektrofotometricky, přičemž iritační potenciál byl vyjádřen formou tzv. zein čísla, udávajícího množství mg dusíku ve 100 ml vzorku, a dále gravimetricky s vyhodnocením procentuálního množství solubilizovaného zeinu v roztoku surfaktantu. Druhým proteinem, zvoleným pro hodnocení iritačního potenciálu, byl hovězí sérový albumin, který slouží ke sledování změny pH v testovaném roztoku vzorku.

V rámci praktické části bylo otestováno celkem 8 surfaktantů, 2 směsné roztoky a 5 komerčních vzorků. Na připravených roztocích byla následně změřena velikost micelárních agregátů a zeta potenciál. Největší rozměry micel vykazovaly roztoky SCS (1068 nm) a SCI (538 nm), zatímco u směsných systémů na jejich bázi s přidavkem neionického surfaktantu byla zjištěná velikost micel výrazně nižší. Synergický účinek se projevil zejména u směsi SCI+CG, kdy došlo k zásadnějšímu poklesu kritické micelární koncentrace v porovnání se samotným anionickým sodium cocoyl isethionátem. Zeta potenciál se pohyboval v záporných hodnotách, a to v rozmezí od -15 do -37 mV, v závislosti na konkrétním vzorku.

Na základě metody s využitím zeinu se z testovaných surfaktantů jako největší iritant projevil SLES s hodnotou zein čísla 290. Vyšších hodnot bylo dosaženo i u dalších klasických anionických tenzidů, u nichž lze zvýšenou iritaci předpokládat. Naopak nejnižší iritační potenciál vykazovaly roztoky neionických surfaktantů, jejichž interakce s proteinem je slabší z důvodu absence náboje v jejich molekule. V rámci komerčních vzorků byl nejvyšší výsledek (215) zaznamenán u roztoku Old Spice, zatímco nejnižší hodnota zein čísla (119) byla prokázána u šamponu Matrix.

Největší množství solubilizovaného zeinu (téměř 75 %) bylo stanoveno pro roztok SCI, jehož zein číslo nepatřilo mezi nejvyšší hodnoty. Nejnižší hodnoty (10 až 16 %) byly prokázány u vzorků amfoterního CAPB a neionických glukosidů. U většiny vzorků byla prokázána přímá souvislost mezi zvýšením kritické micelární koncentrace surfaktantů a odpovídajícími zein čísly vzorků.

Dále byla provedena metoda využívající hovězí albumin, jejíž výsledky opět prokázaly nejvyšší změny pH (a tedy i největší iritační potenciál) u vzorků anionických surfaktantů,

zejména pak SDS, kde došlo ke změně pH o 4 %. K nejnižší změně pH došlo v případě roztoku SCI (0,7 %), což potvrzuje i nižší hodnota zein čísla.

Na závěr byla vyhodnocena pěnivost, přičemž největší stabilita pěny se projevila u směsného roztoku SCI+CG, v jehož případě nedošlo k žádnému poklesu pěny ve sledovaném čase. Porovnáním výsledků testů pěnivosti s hodnotami zein čísla nebyla odhalena přímá souvislost mezi výškou pěny a případnou iritací.

Výsledky bakalářské práce potvrdily vyšší iritační potenciál anionických surfaktantů, které díky svému zápornému náboji snáze interagují s proteiny. Dále poukázaly na vhodnost využívání kombinací anionických a neionických surfaktantů, kdy ve všech případech došlo ke snížení nepříznivých vlastností anionického zástupce. Vzhledem k vyšší citlivosti gravimetrického stanovení a komplikacím při přípravě některých vzorků v případě BSA metody se jako optimální jeví spektrofotometrické vyhodnocení a stanovení zein čísla. Závěrem lze také konstatovat, že metody testování iritačního potenciálu s využitím proteinů poskytují relevantnější výsledky především pro ionické surfaktanty. Přestože nízké hodnoty zein čísla neionických surfaktantů potvrdily jejich mírnější účinek na pokožku, nebyla vždy interpretace získaných výsledků snadná. Důvodem je také nedostatek dat pro srovnání, zejména pokud se právě jedná o neionické povrchově aktivní látky, či konkrétní dostupné produkty oplachové kosmetiky, což činí získané výsledky bakalářské práce cenným podnětem pro další výzkum v této oblasti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ONG, Michal Wen Sheue, F. Anthony SIMION a Howard I. MAIBACH. Methods for Testing Irritation Potential. In: ALIKHAN, Ali, Jean-Marie LACHAPPELLE a Howard I. MAIBACH, ed. *Textbook of Hand Eczema* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, s. 233-246 [cit. 2023-11-29]. ISBN 978-3-642-39545-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-39546-8_22
- [2] ANANTHAPADMANABHAN, K. P., David J. MOORE, Kumar SUBRAMANYAN, Manoj MISRA a F MEYER. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatologic Therapy* [online]. 2004, **17**(s1), 16-25 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1396-0296. Dostupné z: doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04S1002.x
- [3] CASSIDAY, Laura. Surfactants and skin. *INFORM: International News on Fats, Oils, and Related Materials* [online]. 2016, 2016-01-1, **27**(1), 694-699 [cit. 2023-11-29]. ISSN 15289303. Dostupné z: doi:10.21748/inform.01.2016.694
- [4] FREEMAN, Susanne a Howard MAIBACH. Study of irritant contact dermatitis produced by repeat patch test with sodium lauryl sulfate and assessed by visual methods, transepidermal water loss, and laser Doppler velocimetry. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 1988, **19**(3), 496-502 [cit. 2024-03-24]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/S0190-9622(88)70204-2
- [5] ŠMIDRKAL, Jan. *Tenzidy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2020. ISBN 978-80-7592-056-0.
- [6] *Skin Care Forum* [online]. Německo: Henkel KGaA, 1995, č. 12 [cit. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.yumpu.com/en/document/read/7320880/1-apg-innovative-surfactants-made-from-sugar-and-fat-alkyl->
- [7] LI, Zhengyuan. Modern Mild Skin Cleansing. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* [online]. 2020, **10**(02), 85-98 [cit. 2023-11-29]. ISSN 2161-4105. Dostupné z: doi:10.4236/jcdsa.2020.102009
- [8] KLIMASZEWSKA, Emilia, Daria WIECZOREK, Sławomir LEWICKI, Marta STELMASIAK, Marta OGORZALEK, Łukasz SZYMAŃSKI, Ryszard TOMASIUK a Leszek MARKUSZEWSKI. Effect of New Surfactants on Biological Properties of Liquid

Soaps. *Molecules* [online]. 2022, **27**(17) [cit. 2023-11-29]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27175425

[9] MOORE, Peter N. a kol. Challenging the surfactant monomer skin penetration model: Penetration of sodium dodecyl sulfate micelles into the epidermis. *Journal of Cosmetic Science*. 2003, **54**(1), 29-46. PMID: 12644857.

[10] MORRIS, Stephanie A.V., Kavssery P. ANANTHAPADMANABHAN a Gerald B. KASTING. Anionic Surfactant–Induced Changes in Skin Permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **108**(11), 3640-3648 [cit. 2024-04-29]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1016/j.xphs.2019.06.030

[11] ANANTHAPADMANABHAN, K.P., S. MUKHERJEE a P. CHANDAR. Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2013, **35**(4), 337-345 [cit. 2024-04-29]. ISSN 0142-5463. Dostupné z: doi:10.1111/ics.12042

[12] BUJAK, Tomasz, Zofia NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA a Tomasz WASILEWSKI. Sodium Lauryl Sulfate vs. Sodium Coco Sulfate. Study of the Safety of Use Anionic Surfactants with Respect to Their Interaction with the Skin. *Tenside Surfactants Detergents* [online]. 2019, 2019-03-15, **56**(2), 126-133 [cit. 2024-03-24]. ISSN 2195-8564. Dostupné z: doi:10.3139/113.110599

[13] AGUIRRE, Tanira A.S., Mónica ROSA, Sílvia S. GUTERRES, Adriana R. POHLMANN, Ivan COULTER a David J. BRAYDEN. Investigation of coco-glucoside as a novel intestinal permeation enhancer in rat models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2014, **88**(3), 856-865 [cit. 2024-05-02]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2014.10.013

[14] FROSCH, Peter J. a Albert M. KLIGMAN. The soap chamber test. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 1979, **1**(1), 35-41 [cit. 2024-04-29]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/S0190-9622(79)70001-6

[15] WILHELM, Klaus-P., Günter FREITAG a Helmut H. WOLFF. Surfactant-induced skin irritation and skin repair: Evaluation of a cumulative human irritation model by noninvasive techniques. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 1994, **31**(6), 981-987 [cit. 2024-05-03]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/S0190-9622(94)70268-3

- [16] MA, Xiao, Feifei WANG a Bo WANG. Application of an in vitro reconstructed human skin on cosmetics in skin irritation tests. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2021, **20**(6), 1933-1941 [cit. 2024-05-02]. ISSN 1473-2130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.13789
- [17] DEO, Namita, Steffen JOCKUSCH, Nicholas J. TURRO a P. SOMASUNDARAN. Surfactant Interactions with Zein Protein. *Langmuir* [online]. 2003, 2003-06-01, **19**(12), 5083-5088 [cit. 2023-11-29]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la020854s
- [18] COHEN, Leon, Elsa SANCHEZ, Mariluz MARTIN, Fernando SOTO a Francisco TRUJILLO. Study of the Effects of LAS and Zein Concentrations on Protein Solubilization. *Journal of Surfactants and Detergents* [online]. 2016, **19**(5), 1089-1092 [cit. 2023-11-29]. ISSN 1097-3958. Dostupné z: doi:10.1007/s11743-016-1846-3
- [19] MISRA, Pramila K., Uma DASH a Suprava MAHARANA. Investigation of bovine serum albumin-surfactant aggregation and its physicochemical characteristics. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **483**, 36-44 [cit. 2024-04-21]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2015.06.052
- [20] *Stepan product selection guide* [online]. USA: Stepan Company, 2015 [cit. 2024-05-02]. Dostupné z: <https://www.stepan.com/content/dam/stepan-dot-com/webdam/website-product-documents/literature/household-institutional-industrial-cleaning/StepanHIIPProductSelectorGuide.pdf>
- [21] GUANGXU, Zhang, Qian YUBO a Zhang HONGBO. Synthesis and Property of Sodium Cocoyl Isethionate. *Journal of Wuhan University of Technology* [online]. 2013 [cit. 2024-05-02]. Dostupné z: doi:10.3963/j.issn.1671-4431.2013.01.009
- [22] MEHTA, Krupali, Bhavesh BHARATIYA, Amit PAREKH, Sandip V. BHATT, Vidhi SHAH, Dinesh O. SHAH a Tulsi MUKHERJEE. Submicellar aggregates in aqueous sodium dodecyl sulphate solutions: Investigations by dynamic light scattering and water penetration through porous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2016, **506**, 331-337 [cit. 2024-04-29]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2016.06.045
- [23] MANDAL, Manas Kumar, Manas BARAI, Habiba SULTANA, Emili MANNA, Dulal MUSIB, Dilip Kumar MAITI a Amiya Kumar PANDA. Interfacial and Aggregation Behaviour of Sodium Dodecyl Sulphate Induced by Ionic Liquids. *Journal of Oleo Science*

[online]. 2021, **70**(2), 185-194 [cit. 2024-04-29]. ISSN 1345-8957. Dostupné z: doi:10.5650/jos.ess20303

[24] OUVÉREY FERREIRA, Matheus, Húliana Francisca CÂMARA DE ASSIS a Ana Maria PERCEBOM. Cocamidopropyl betaine can behave as a cationic surfactant and electrostatically associate with polyacids of high molecular weight. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2022, **654** [cit. 2024-04-29]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2022.130123

[25] TĂNASE, Maria Antonia, Andreia Cristina SOARE, Lia Mara DIȚU, Cristina Lavinia NISTOR, Catalin Ionut MIHAESCU, Ioana Catalina GIFU, Cristian PETCU a Ludmila Otilia CİNTEZA. Influence of the Hydrophobicity of Pluronic Micelles Encapsulating Curcumin on the Membrane Permeability and Enhancement of Photoinduced Antibacterial Activity. *Pharmaceutics* [online]. 2022, **14**(10) [cit. 2024-04-29]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14102137

[26] BLAGOJEVIĆ, S. M., N. D. PEJIĆ a S. N. BLAGOJEVIĆ. Synergism and Physicochemical Properties of Anionic/Amphoteric Surfactant Mixtures with Nonionic Surfactant of Amine Oxide Type. *Russian Journal of Physical Chemistry A* [online]. 2017, **91**(13), 2690-2695 [cit. 2024-04-29]. ISSN 0036-0244. Dostupné z: doi:10.1134/S0036024417130064

[27] *Surfactants for Personal Care products* [online]. Polsko: PCC Group, 2023 [cit. 2024-04-29]. Dostupné z: https://www.products.pcc.eu/wp-content/uploads/2023/04/PCC_GROUP_BROCHURE_PERSONAL_CARE_EN.pdf

[28] PEZRON, I., L. GALET a D. CLAUSSE. Surface Interaction between a Protein Monolayer and Surfactants and Its Correlation with Skin Irritation by Surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1996, **180**(1), 285-289 [cit. 2024-04-29]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1006/jcis.1996.0301

[29] MANZO, Giorgia, Maura CARBONI, Andrea C. RINALDI, Mariano CASU a Mariano A. SCORCIAPINO. Characterization of sodium dodecylsulphate and dodecylphosphocholine mixed micelles through NMR and dynamic light scattering. *Magnetic Resonance in Chemistry* [online]. 2013, **51**(3), 176-183 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0749-1581. Dostupné z: doi:10.1002/mrc.3930

[30] HAN, Weimo, Juan TAN, Liangqiong PENG, Li LIU, Xuan ZHOU, Wenhua ZHANG a Bi SHI. Ecotoxicity and micellization behavior of anionic surfactant sodium

dodecylbenzene sulfonate (SDBS) and its mixtures with nonionic surfactant fatty alcohol-polyoxyethylene ether (AEO). *Aquatic Toxicology* [online]. 2019, **216** [cit. 2024-05-02]. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2019.105313

[31] VENZMER, J. Determination of CMCs. *SOFW Journal* [online]. 2020, **146**(03), 60-64 [cit. 2024-05-02]. Dostupné z: <https://www.tegewa.de/wp-content/uploads/2021/05/CMCs-SOFW-Journal-March-2020-Kopie.pdf>

[32] MATSUMURA, Shuichi, Kazuyasu IMAI, Sadao YOSHIKAWA, Kazuo KAWADA a Tsuyoshi UCHIBOR. Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of n-alkyl glucosides, mannosides and galactosides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1990, **67**(12), 996-1001 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0003-021X. Dostupné z: doi:10.1007/BF02541865

[33] SULEK, Marian W., Tomasz WASILEWSKI a Krzysztof J. KURZYDŁOWSKI. The Effect of Concentration on Lubricating Properties of Aqueous Solutions of Sodium Lauryl Sulfate and Ethoxylated Sodium Lauryl Sulfate. *Tribology Letters* [online]. 2010, **40**(3), 337-345 [cit. 2024-05-02]. ISSN 1023-8883. Dostupné z: doi:10.1007/s11249-010-9668-3

[34] MATEOS, Helena, Alessandra VALENTINI, Giuseppe COLAFEMMINA, Sergio MURGIA, Eric ROBLES, Anju BROOKER a Gerardo PALAZZO. Binding isotherms of surfactants used in detergent formulations to bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, **598** [cit. 2024-05-02]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.124801

[35] JUREK, Ilona, Aleksandra SZUPLEWSKA, Michał CHUDY a Kamil WOJCIECHOWSKI. Soapwort (*Saponaria officinalis* L.) Extract vs. Synthetic Surfactants—Effect on Skin-Mimetic Models. *Molecules* [online]. 2021, **26**(18) [cit. 2024-05-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26185628

[36] KLIMASZEWSKA, Emilia, Artur SEWERYN, Marta OGORZALEK, Zofia NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA a Tomasz WASILEWSKI. Reduction of Irritation Potential Caused by Anionic Surfactants in the Use of Various Forms of Collagen Derived from Marine Sources in Cosmetics for Children. *Tenside Surfactants Detergents* [online]. 2019, 2019-05-15, **56**(3), 180-187 [cit. 2024-05-07]. ISSN 2195-8564. Dostupné z: doi:10.3139/113.110616

[37] DRAELOS, Zoe, Sidney HORNBY, Russel M WALTERS a Yohini APPA. Hydrophobically modified polymers can minimize skin irritation potential caused by

surfactant-based cleansers. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2013, **12**(4), 314-321 [cit. 2024-05-07]. ISSN 1473-2130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12061

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

a	plocha připadající na jednu molekulu surfaktantu
AO	Lauramin oxid
BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
c	koncentrace
CAPB	Cocamidopropyl betaine
CG	Coco glucoside
CI	Colour index
CMC	Critical micelle concentration (kritická micelární koncentrace)
DLS	Dynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)
EO	Ethylenoxid
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnovážná konstanta
HRIPT	Human Repeated Insult Patch Test
INCI	International nomenclature of cosmetic ingredients
IL	ionická kapalina
LG	Lauryl glucoside
N_A	Avogadrova konstanta
m	hmotnost
M	molární hmotnost
NMF	Natural moisturizing factors (přirozené hydratační faktory)
PdI	index polydisperzity
PEO	Polyethylenoxid
R	molární plynová konstanta
SCS	Sodium coco sulfate
SDBS	Sodium dodecylbenzene sulfonate
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SCI	Sodium cocoyl isethionate
SLES	Sodium laureth sulfate
SLS	Sodium lauryl sulfate
T	termodynamická teplota
TEWL	Transepidermal water-loss (transepidermální ztráta vody)
V	objem
ZČ	zein číslo
Γ	koncentrace surfaktantů na rozhraní
ΔG_m	Gibbsova micelizační energie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Graf znázorňující Maltenův teoretický model iritace, upraveno dle [1]	13
Obrázek 2 Odezvy kůže na působení kosmetického přípravku, upraveno dle [1]	14
Obrázek 3 Zjednodušené znázornění molekuly s amfifilní strukturou, vlastní zdroj	15
Obrázek 4 Strukturní vzorec SDS, vlastní zdroj	19
Obrázek 5 Strukturní vzorec SLES, vlastní zdroj	19
Obrázek 6 Strukturní vzorec SDBS, vlastní zdroj	20
Obrázek 7 Strukturní vzorec SCI, vlastní zdroj	21
Obrázek 8 Strukturní vzorec CAPB, vlastní zdroj	21
Obrázek 9 Strukturní vzorec LG, vlastní zdroj	21
Obrázek 10 Interakce molekul SDS s řetězcem zeinu, upraveno dle [17]	27
Obrázek 11 a) Alverde sprchový gel relax, b) Ziaja Cocoa Butter krémové sprchové mýdlo, c) La Roche-Posay Effaclar čistící gel pro mastnou citlivou pleť, d) Matrix Food For Soft hydratační šampon, e) Old Spice sprchový gel a šampon	35
Obrázek 12 Kalibrační přímka zeinu	38
Obrázek 13 Zein test roztoku SLES	39
Obrázek 14 Ross-Millesova metoda	42
Obrázek 15 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci SCS+CG	43
Obrázek 16 Graf závislosti povrchového napětí na přirozeném logaritmu koncentrace směsi SCS+CG	44
Obrázek 17 Velikost částic a PdI roztoků surfaktantů a jejich směsí	46
Obrázek 18 Graf distribuce velikosti částic vzorků SCS, CG a směsi SCS+CG	46
Obrázek 19 Graf distribuce velikosti částic SCI, CG a směsi SCI+CG	46
Obrázek 20 Zeta potenciál a pH roztoků surfaktantů a jejich směsí	47
Obrázek 21 Zein čísla roztoků surfaktantů a jejich směsí	49
Obrázek 22 Zein čísla roztoků komerčních vzorků oplachové kosmetiky	50
Obrázek 23 Závislost zein čísla na kritické micelární koncentraci surfaktantů a jejich směsí	51
Obrázek 24 Množství solubilizovaného zeinu v roztocích surfaktantů a jejich směsí	52
Obrázek 25 Množství solubilizovaného zeinu v roztocích komerčních vzorků	52
Obrázek 26 Graf závislosti zein čísla na počáteční výšce pěny roztoků surfaktantů	56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Testované vzorky surfaktantů.....	33
Tabulka 2 Testované komerční vzorky oplachové kosmetiky.....	34
Tabulka 3 Micelární parametry směsných roztoků.....	44
Tabulka 4 Porovnání zein čísla roztoku SDBS.....	49
Tabulka 5 Změny pH roztoků surfaktantů a jejich směsí	54
Tabulka 6 Změny pH roztoků komerčních vzorků.....	54
Tabulka 7 Pokles pěny roztoků surfaktantů a jejich směsí.....	55
Tabulka 8 Pokles pěny roztoků komerčních vzorků.....	56