

Kvalitativna analiza dječjih krema i pripravaka primjenom GC-MS metode

Vranješ, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:159666>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Vranješ

**KVALITATIVNA ANALIZA DJEČJIH KREMA I PRIPRAVAKA PRIMJENOM
GC-MS METODE**

Diplomski rad

Akadska godina 2017./2018.

Mentorica:

prof.dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Vranješ

KVALITATIVNA ANALIZA DJEČJIH KREMA I PRIPRAVAKA PRIMJENOM
GC-MS METODE

Diplomski rad

Akadska godina 2017./2018.

Mentorica:

prof.dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018. god.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada prihvaćena je na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.
Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl.ing.

KVALITATIVNA ANALIZA DJEČJIH KREMA I PRIPRAVAKA PRIMJENOM GC-MS METODE

Ivana Vranješ, broj indeksa: 110

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Kvalitativna analiza dječjih krema, usporedba dobivenih rezultata s deklaracijom proizvoda te pronalazak poveznice između cijene proizvoda i prisustva nepoželjnih sastojaka.

Ustroj istraživanja: Eksperimentalna studija

Mjesto istraživanja: Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split

Materijali i metode: Ispitano je 10 uzoraka dječjih krema, raspoređenih u dva cjenovna ranga: 5 proizvoda s cijenom nižom i 5 s cijenom višom od 47,66 kn/100 mL. Za analitičku pripremu 0,1g uzorka ekstrahirano je smjesom otapala: kloroform, etilacetat i N-heksan (v/v/v = 1:1:1). Za usporedbu učinka otapala na ekstrakciju, uzorak br. 1 dodatno je otopljen u samom kloroformu. Kvalitativna analiza provedena je GC-MS metodom.

Rezultati: Ispitivani nepoželjni sastojci su ftalati, parabeni, fenoksietanol, BHA i BHT, lanolin i parfemi. U 80% uzoraka detektiran je barem jedan od traženih nepoželjnih sastojaka dječjih krema, pri čemu u pet proizvoda koji pripadaju skupini nižeg te tri proizvoda koji pripadaju skupini višeg cjenovnog ranga. Odstupanje od deklaracije za detektirane nepoželjne sastojke zabilježeno je za dietilftalat i BHT, i to u skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga. Usporedbom kromatograma uzorka br. 1 pripremljenog na dva načina, prednost je dana smjesi otapala.

Zaključak: Usporedbom cijene proizvoda u kojima su detektirani nepoželjni sastojci nisu dobiveni nedvojbeni rezultati. Utvrđena je povezanost cijene proizvoda i podudaranja detektiranih sastojaka s deklaracijom na ambalaži, odstupanja su prisutna samo u skupini nižeg cjenovnog ranga. Potrebna je provedba daljnjih ispitivanja u cilju detekcije iznimno niskih koncentracija nepoželjnih i nedeklariranih sastojaka.

Ključne riječi: Kozmetički pripravci, dječje kreme, GC-MS metoda

Rad sadrži: 62 stranice, 25 slika, 3 tablice, 66 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Neira Puizina – Ivić	predsjednik
2. doc. dr. sc. Ivana Mudnić	član
3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović	član-mentor

Datum obrane: 26. rujna 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmaceutical toxicology
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.
Technical assistance: Maja Veršić Bratinčević, PhD

QUALITATIVE ANALYSIS OF BABY CREAMS AND PREPARATIONS USING GC-MS METHOD

Ivana Vranješ, index number: 110

Summary:

Objectives: Qualitative determination of ingredients in children skincare products, comparison of the results with the product declaration and finding a correlation between the price of the product and the presence of undesirable ingredients.

Design: Experimental study

Settings: Laboratory of toxicology, Department of pathology, medicine and cytology, University Hospital of Split

Materials and methods: Ten samples of baby creams were analyzed and divided into two price ranges: 5 products with price lower and 5 products with price greater than 47.66 kn/100 mL. 0.1g of each sample was extracted with a mixture of solvents: chloroform, ethylacetate and N-hexane (v/v/v=1:1:1). In order to compare the results of different solvents, sample no.1 was dissolved in chloroform as well. Qualitative analysis was performed by GC-MS method.

Results: Undesirable ingredients investigated in this study are phthalates, parabens, phenoxyethanol, BHA and BHT, lanolin and perfume. In 80% of samples at least one of the tested ingredients was detected, with 5 products belonging to the lower and 3 products belonging to the higher price range group. The deviation from the declaration for these detected undesirable substances was recorded for diethylphthalate and BHT, only in the lower price range product group. By comparing the chromatograms of sample no.1 prepared in two ways, a mixture of solvents was preferred.

Conclusion: Correlation between price of the product and presence of undesirable ingredients was not conclusive. Correlation between the price of the product and deviations from the product declaration is established, with deviations present only in the lower price range group. More thorough studies are required to detect extremely low concentrations of undesirable and undeclared ingredients.

Key words: cosmetic products, children skincare, GC-MS method

Thesis contains: 62 pages, 25 figures, 3 tables, 66 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|-------------|
| 1. Neira Puizina – Ivić - PhD, full prof. | chairperson |
| 2. Ivana Mudnić – PhD, assistant prof. | member |
| 3. Davorka Sutlović – PhD, full prof. | supervisor |

Defence date: September 26th, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

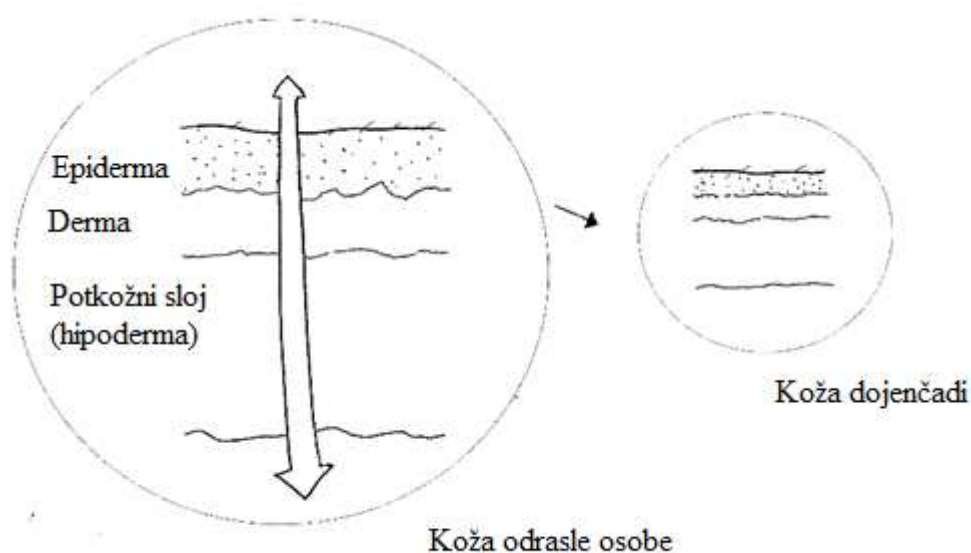
SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Dječja koža	2
1.2. Problemi i njega dječje kože	3
1.3. Parabeni	5
1.4. Ftalati	8
1.5. Alergeni i iritansi	12
1.6. Poželjni sastojci kozmetičkih proizvoda	14
1.7. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa	16
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Kemikalije i uzorci za analizu	21
3.2. Postupak pripreme uzoraka za analizu	23
3.3. Instrumentalna metoda i radni uvjeti GC-MS metode	24
4. REZULTATI	26
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČCI	44
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	46
8. SAŽETAK	53
9. SUMMARY	57
10. ŽIVOTOPIS	61

1. UVOD

1.1. Dječja koža

Koža je multifunkcionalni organ velike važnosti koji kao funkcionalna barijera omogućuje mehaničku zaštitu, termoregulaciju, imunološki nadzor te sprječava gubitak tjelesnih tekućina. Koža dojenčadi u dobi do 24 mjeseca pokazuje znakove funkcionalne nezrelosti. To može dovesti do povećane propusnosti i smanjene sposobnosti za obranu od kemijske i mikrobne agresije (1). Koža dojenčadi ima jednak broj slojeva kao koža odraslih, ali svaki sloj znatno je tanji. Debljina kože dojenčadi iznosi tek jednu petinu debljine kože odraslih (slika 1).



Slika 1. Grafički prikaz razlike debljine kože dojenčadi i odrasle osobe (66)

U odnosu na kožu odraslih koža dojenčadi ima tanji rožnati sloj (vanjski sloj epiderme) te smanjenu koheziju između epidermisa i dermisa zbog čega je karakterizira veća propusnost. Epidermalni lipidi također imaju važnu ulogu u održavanju integriteta i funkcije barijere kože. Međutim, sadržaj lipida kože dojenčadi niži je zbog niske aktivnosti lojnih žlijezda. Kiseli pH površine kože u odraslih i adolescenata ($\text{pH} < 5$) ima zaštitni učinak protiv mikroorganizama. Kod dojenčadi pH površine kože je neutralan, što značajno smanjuje zaštitu od prekomjernog mikrobnog rasta (2). Fiziološki mikrobiom kože doprinosi funkciji barijere onemogućujući kolonizaciju patogena te komunicira s imunološkim stanicama kože, kako bi modulirao lokalni i sistemski imunološki odgovor (3).

1.2. Problemi i njega dječje kože

Kod više od 50% novorođenčadi javljaju se problemi s kožom kao što su pelenski osip, atopijski dermatitis i seboroični dermatitis (slika 2).



Slika 2. Redom slikovni prikaz pelenskog osipa (4), atopijskog dermatitisa (5) i seboroičnog dermatitisa (6)

Kombinacija čimbenika, od kojih je najvažniji dugotrajni kontakt kože s urinom i fecesom, uzrokuje pelenski osip. Okluzija povećava hidrataciju kože i podiže pH kože, dok izloženost probavnim enzimima iz fecesa oštećuje integritet barijere kože i povećava njenu propusnost. Poremećena funkcija barijere čini kožu osjetljivom na iritaciju i mikrobnu invaziju, što dovodi do lokalizirane upale kože. Rani znakovi pelenskog osipa su blago crvenilo preko ograničene površine kože, uz minimalnu maceraciju i ljuškanje. Za liječenje pelenskog osipa, stručnjaci preporučuju minimalno nošenje pelena, često mijenjanje pelena, upotrebu jednokratnih pelena i primjenu topikalnih pripravaka. Za pristupe koji liječe također se pretpostavlja da su učinkovite mjere prevencije. Topikalni pripravci trebali bi pomoći u prevenciji i smirivanju stanja čineći barijeru između kože i nepovoljnog okruženja. Ipak potrebno je provesti randomizirana kontrolirana klinička istraživanja koja bi potvrdila ove preporuke (7).

Atopijski dermatitis (ekcem) najčešći je poremećaj kože, osobito kod djece. Javlja se kod jednog od pet dojenčadi, dok se u odrasloj dobi javlja tek kod jedne od pedeset odraslih osoba. Ekcem je često povezan s astmom, alergijskim rinitisom ili alergijom na hranu. Smatra se da je posljedica povećane propusnosti kožne prepreke, što omogućuje veći gubitak vode. Ovo dovodi do isušivanja i povećane sklonosti iritaciji i upalama pod utjecajem različitih čimbenika okoline. U dojenčadi, ekcem se obično manifestira kao ispupčenje na obrazima. Kod starije djece i odraslih osip se često javlja na koljenima ili laktovima (na pregibu zglobova) te na vlasištu. Osip je praćen svrbežom, crvenilom i ljuškanjem. Za razliku od

urtikarije, svrbež ekcema nije uzrokovan samo histaminom pa antihistaminici ne mogu u potpunosti kontrolirati simptome. Hidratacija kože važna je komponenta za njegu ekcema i prevenciju egzacerbacija. Uporaba hidratantnog pripravka najučinkovitija je neposredno nakon kupanja, nanošenjem na vlažnu kožu kako bi se zarobila voda i na taj se način poboljšala suhoća. Američka akademija za alergiju, astmu i imunologiju (engl. The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, AAAAI) preporučuje primjenu hidratantnog proizvoda najmanje četiri puta dnevno (6). Svakodnevna uporaba hidratantnih pripravaka s neovodnim emolijensima (omekšavanje kože), okluzivnim sredstvima (stvaranje fizičke barijere koja doprinosi zadržavanju vlage) i humektansima (privlačenje vode) doprinosi poboljšanju funkcije barijere, smanjenju egzacerbacija i ublažavanju simptoma atopijskog dermatitisa te smanjenju učestalosti korištenja lokalnih kortikostereoida. Američka agencija za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) je kao medicinski proizvod (manje strog postupak odobravanja u odnosu na kategoriju lijeka) odobrila gliceretiničnu kiselinu, ceramid i palmitoiletanolamid, s namjenom u poboljšavanju funkcije kožne barijere (8).

Seboroični dermatitis posljedica je zajedničkog djelovanja različitih čimbenika. Ti čimbenici mogu uključivati kvasac (*Malassezia spp.*) koji je dio fiziološke flore kože, genetsku podlogu, život u hladnoj i suhoj klimi te ukupno zdravlje osobe. Kod seboroičnog dermatitisa javlja se crvenilo, natečenost, mastan izgled i bijele ili žute ljuške na površini kože. U liječenju najčešće se koriste topikalna antifungalna i protuupalna sredstva. Ostale korištene terapije uključuju litijev glukonat / sukcinat, katran, salicilnu kiselinu, selen sulfid, natrijev sulfatamid, glicerol, benzoil peroksid, aloe vera i fototerapiju (9).

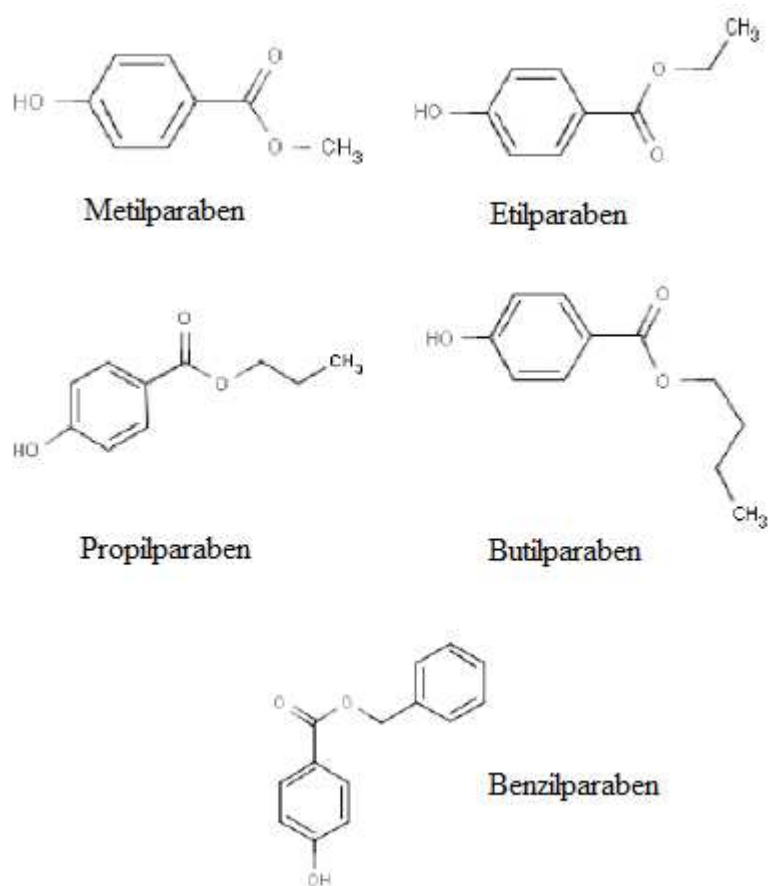
Njega kože novorođenčadi, dojenčadi i djece uporabom kozmetičkih proizvoda trebala bi potpomoći integritet kože, ali je pri tome neophodno spriječiti toksičnost uz minimalnu izloženost kože štetnim kemijskim tvarima. Ipak, uporaba kozmetičkih proizvoda (krema, losiona, parfema) povezana je sa povećanom izloženosti potencijalno štetnim tvarima kao što su ftalati i parabeni. Istraživanja su pokazala da se koncentracija metabolita ftalata i parabena u mokraći povećava s brojem upotrijebljenih proizvoda te većom učestalošću primjene istih (10,11). Također, pokazano je značajno smanjenje koncentracija metabolita ovih spojeva u urinu nakon prestanka korištenja kozmetičkih proizvoda tijekom 3 dana (12). Američko istraživanje pokazalo je da žene reproduktivne dobi i adolescentice imaju veću koncentraciju metabolita ftalata i parabena u urinu u odnosu na mušku populaciju, što upućuje na to da veća učestalost korištenja proizvoda za osobnu njegu može biti važan izvor izloženosti među ženama (11). Isto je utvrđeno i u kohortnoj studiji u populaciji trudnica. Skupina trudnica koja

je koristila kozmetičke proizvode imala je veće koncentracije smjese ftalatnih metabolita i parabena u mokraći u usporedbi s trudnicama koje nisu koristile kozmetičke proizvode (13). Također, nanošenjem kozmetičkih proizvoda na kožu dojenčadi ona je izravno izložena potencijalnim alergenima i iritansima kao što su parfemi, lanolin, antioksidansi i fenoksietanol. Stoga je sastav kozmetičkih proizvoda bitan, posebno u pedijatrijskoj populaciji obzirom na njihovu čestu uporabu, kako bi se izbjegli nepoželjni učinci.

1.3. Parabeni

Parabeni su alkil esteri p-hidroksibenzojeve kiseline koji se zbog svojih antimikrobnih svojstava, posebno izraženih protiv plijesni i kvasaca te slabije protiv bakterija, koriste kao konzervansi u hrani (E214-219), proizvodnji lijekova i kozmetičkim proizvodima. Najčešće korišteni esteri su metilparaben, etilparaben, propilparaben i butilparaben (Slika 3). Trećina kozmetičkih proizvoda registriranih pri FDA sadrži parabene (14). Svojstva koja parabenima daju prednost i čine ih čestim izborom među konzervansima su: širok spektar antimikrobne aktivnosti (gljivice, lišajevi i bakterije), kemijska stabilnost u širokom rasponu pH vrijednosti (4,5-7,5), inertnost, niska cijena proizvodnje i nizak utjecaj na konzistenciju ili boju proizvoda (15).

Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje najveća dopuštena koncentracija parabena u proizvodu je 0,1% (16). U Uredbi (EZ) br. 1223/2009 o kozmetičkim proizvodima parabeni su uređeni kao konzervansi pod nazivom 4-hidroksibenzojeva kiselina i njezine soli i esteri.



Slika 3. Strukturne formule parabena (17)

Mogući putevi apsorpcije parabena uključuju ingestiju, inhalaciju i transdermalni način apsorpcije. Parabeni u kozmetičkim formulacijama koje se nanose na kožu prodiru u rožnati sloj kože u obrnuto proporcionalnom odnosu s dužinom esterskog lanca. U koži su prisutne karboksijesteraze koje hidroliziraju parabene (17). Iako je početna pretpostavka bila da se zbog hidrolize estera parabena u koži oni ne akumuliraju u tijelu, kasnije studije dokazale su da dio apsorbiranih parabena izbjegne metabolizam u koži te dolazi do njihove sistemske apsorpcije. Jedna studija pokazala je da metilparaben nije potpuno hidroliziran esterazama ljudske kože. 12 h nakon primjene formulacije koja je sadržavala 0,15% metil parabena, koncentracija u rožnom sloju bila je 10 pmol/cm² (granica detekcije je 0,02 pmol/cm²) ili 0,028 % primijenjene količine. Redovna primjena (dvaput dnevno kroz jedan mjesec) izazvala je akumulaciju metilparabena u rožnom sloju (20 pmol/cm² nakon 1 tjedna i 120 pmol/cm² nakon 4 tjedna). Samo 2 dana nakon prestanka upotrebe razina metilparabena smanjena je na <10 pmol/cm² (18). Ovo je važno pri razmatranju trenutne upotrebe kozmetike gdje se ponavljaju aplikacije proizvoda tijekom dana i / ili je prisutna višestruka primjena različitih proizvoda od kojih svaki sadrži parabene. Druga studija pokazala je sistemske

apsorpciju parabena nakon topikalne primjene kozmetičkih pripravaka kod ljudi, s esterima parabena mjerljivima u krvi 1 sat nakon topikalne primjene (19). Slično je potvrđeno i drugim studijama u kojima su koncentracije parabena u plazmi bile su značajno povezane s upotrebom losiona za kožu, što ukazuje na to da česta (dnevna) uporaba omogućuje povišene koncentracije parabena u plazmi unatoč brzom hidroliziranju i kratkim poluvijekom eliminacije parabena (20). Na temelju učestalosti korištenja i upotrijebljene količine kozmetičkih proizvoda i medijana izmjerenih koncentracija parabena u proizvodima, ukupna doza parabena koja se apsorbira nakon topikalne primjene izračunata je i iznosi 31,0 µg/kg tjelesne težine/dan za odraslu osobu te između 58,6 i 766,0 µg/kg tjelesne težine/dan za dojenčad i malu djecu, sugerirajući da izloženost parabenima, kroz uporabu kozmetičkih proizvoda, za djecu može biti značajna (21). Također, drugi sastojci kozmetičkih formulacija mogu promijeniti farmakokinetiku parabena. Istraživanjima na životinjama pokazano je da alkoholi (česti sastojci kozmetičkih formulacija), a posebno etanol može povećati transdermalnu apsorpciju parabena te inhibirati hidrolizu metilparabena na p-hidroksibenzojevu kiselinu i potaknuti transesterifikaciju metilparabena u butilparaben (22). Parabeni se većinom izlučuju mokraćom u formi glukuronida ili sulfata dok se p-hidroksibenzojeva kiselina kao produkt razgradnje aminokiseline tirozina može naći u mokraći bez izloženosti parabenima.

Uredbom (EZ) br. 1223/2009 propisana je najveća dopuštena koncentracija u kozmetičkim proizvodima od 0,4 % za pojedini ester i 0,8 % za smjesu estera parabena. Izopropilparaben, izobutilparaben, fenilparaben, benzilparaben i pentilparaben zabranjeni su Uredbom Komisije (EU) br. 358/2014. Zaključak je Znanstvenog odbora za zaštitu potrošača (engl. *Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS) da je upotreba butilparabena i propilparabena kao konzervansa u gotovim kozmetičkim proizvodima sigurna za potrošače ako zbroj njihovih pojedinačnih koncentracija nije veći od 0,19 % (kao esteri). Također, SCCS smatra da kada je riječ o butilparabenu i propilparabenu u kozmetičkim proizvodima koji se ne ispiru, a namijenjenima uporabi u području pelena za djecu mlađu od šest mjeseci, nije moguće isključiti opasnost zbog nedovoljno razvijenog metabolizma djece i mogućeg oštećenja kože u tom području (23). Uporaba parabena kontroverzna je zbog njihovog potencijala izazivanja alergijskih reakcija, estrogenskoga i antiandrogenoga djelovanja te opsežne izloženosti ovim spojevima.

Primjenom na kožu parabeni mogu lokalno uzrokovati kontaktni dermatitis, a u velikim koncentracijama mogu izazvati iritaciju kože. Njihov potencijal izazivanja iritirajućih

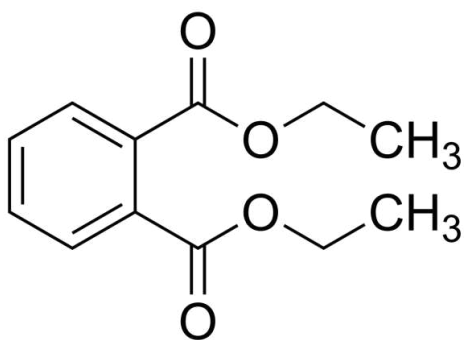
i alergijskih reakcija veći je pri uporabi na kožu oštećenu ulcerom ili ekcemom (14). U koži izloženoj suncu također mogu imati štetan učinak povećavajući oksidacijski stres stanica te se povezuju s nastankom raka kože. *In vitro* istraživanja učinka izloženosti ljudskih keratinocita kože tretiranih metilparabenom UVB zrakama pokazala su značajno povećanje ishoda oksidacijskog stresa, proizvodnje NO, peroksidacije lipida, aktivacije faktora transkripcije i stanične smrti (24).

Parabeni imaju slabo estrogensko i antiandrogeno djelovanje zbog čega se povezuju s nastankom raka dojke i poremećajima muškog spolnog sustava. Estrogena aktivnost parabena prvi put je identificirana 1998. i od tada je potvrđena *in vitro* i *in vivo*. Parabeni se vežu za estrogenske receptore, iako s afinitetom 10 000 do 1 000 000 puta manjim od 17 β -estradiola, glavnog endogenog estrogena. Od četiri najčešće korištenih parabena najveći afinitet ima butilparaben. Njegov afinitet je 5 redova veličine manji nego afinitet dietilstilbestrola koji je usporediv s afinitetom 17 β -estradiola. Obzirom da je dokazana prisutnost estera parabena u tkivu tumora dojki moguća je njihova povezanost s nastankom raka dojke (25). Rezultati studija za ove učinke su konfliktni te nije uspostavljena jasna uzročno posljedična veza (26).

Ipak, obzirom da su dugo u uporabi dostupni su brojni podatci o kroničnoj toksičnosti i sistemskim učincima pa se parabeni smatraju relativno sigurnima u odnosu na novije konzervanse čiji učinci nisu u potpunosti poznati (14).

1.4. Ftalati

Ftalati, diesteri 1,2-benzendikarboksilne kiseline (ftalna kiselina), grupa su kemikalija koje su široko prisutne u čovjekovom okruženju. Najčešće su korišteni u proizvodnji plastike, zbog čega mogu biti prisutni i u dječjim igračkama. Zbog migracije iz ambalaže djeca im mogu biti izložena i kroz hranu te proizvode za osobnu higijenu (losione, kreme, šampone) (27). Ftalati male molekulske mase, uključujući dietil ftalat (DEP, slika 4), di-*n*-butil ftalat (DBP) i di-izobutil ftalat (DiBP), koriste se u proizvodima za osobnu njegu kao nosioci za parfeme i u premazima nekih lijekova. Ftalati visoke molekulske mase, uključujući butil benzil ftalat (BBzP), di (2-etilheksil) ftalat (DEHP) i di-izononil ftalat (DiNP), koriste se za omekšavanje plastike, tj. u svrhu poboljšanja savitljivosti različitih vrsta plastika (30).



Slika 4. Strukturna formula dietilftalata

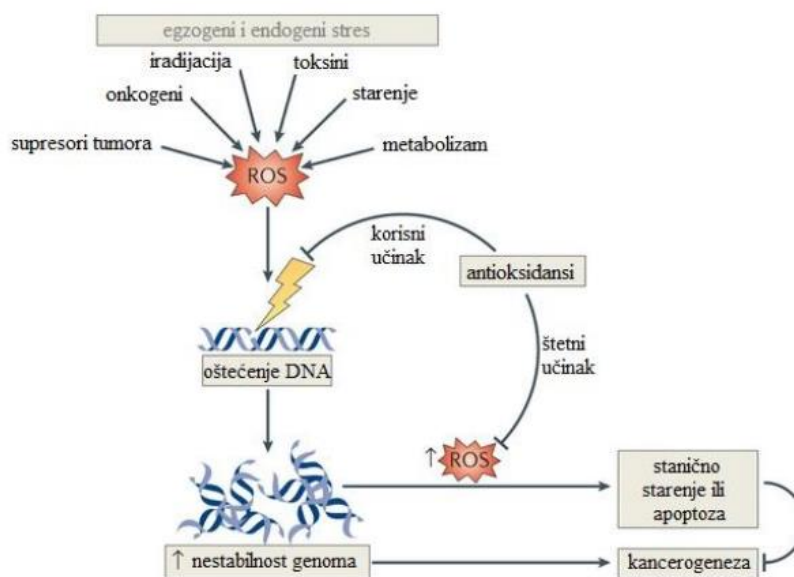
Podaci studija provedenih na ljudima pokazuju da je apsorpcija ftalata moguća nakon oralne, dermalne, inhalacijske i parenteralne primjene (28). Ftalati pokazuju toksični potencijal uglavnom zbog metaboličke transformacije u više toksičnih metabolita. Nakon apsorpcije, ftalatni diesteri brzo se metaboliziraju biotransformacijama (hidroliza i naknadne oksidacijske reakcije) u monoestere (29). Upravo se monoesteri smatraju odgovornima za razne toksične učinke, a mogu se dodatno razgraditi u oblik orto-fosfat ftalata s dužim bočnim lancima (4 ugljikova atoma ili duže) i podliježu oksidativnom metabolizmu. Različiti metaboliti mogu biti prisutni kao slobodni i nepromijenjeni ili konjugirani s glukuronskom kiselinom (30). Primjerice, manje od 10% početne doze DEHP-a izluči se urinom kao monoester mono-(2-etilheksi) ftalat (MEHP), a ostalo se izluči kao sekundarni oksidirani metabolit. Obzirom da se većina unesene količine DEHP-a te nastalih metabolita izlučuje iz tijela u roku od 24 sata urinom i fecesom smatra se da se ftalati ne akumuliraju u tijelu (29). Metabolički putevi ftalata i njihovih metabolita koji se izlučuju urinom su dobro poznati za neke ftalate, ali podaci za metaboličku distribuciju u tijelu i ostalim bioloških tekućinama (žuč, krv, slina), uključujući i majčino mlijeko, vrlo su ograničeni. U odnosu na urin, majčino mlijeko može sadržavati više hidrofobnih ftalata, kao što su DnBP i dugolančani DEHP te DiNP, kao i njihove monoesterske metabolite (31).

Tijekom zadnjih desetak godina, ftalati su u fokusu svjetske javnosti zbog mogućih štetnih učinaka kako na okoliš, tako i na ljudsko zdravlje. Ftalati mogu imati toksičan učinak na jetru, bubrege i reproduktivni sustav te mogu djelovati kao endokrini disruptori. Također mogu oštećivati respiratorni sustav, uzrokujući astmu i rinitis te štetno djelovati na kožu (30).

Ftalati su poznati endokrini disruptori (engl. endocrine-disrupting chemicals, EDC) i povezani su sa smanjenom plodnošću, neželjenim događajima u trudnoći i gubitkom trudnoće, međutim, mehanizmi ovih učinaka nisu u potpunosti poznati. Intrauterina izloženost ftalatima ima duboki negativni utjecaj na buduće zdravlje djeteta povećanjem rizika za razvoj bolesti poput pretilosti, kardiovaskularnih bolesti i raka kasnije u životu. Ftalati prelaze placentarnu barijeru koja opskrbljuje rastući fetus kisikom i hranjivim tvarima i funkcionira kao endokrini organ, stvarajući niz hormona i signalnih molekula koji reguliraju razvoj fetusa (32). Placentarna disfunkcija povezana je s povećanim BMI, opsegom struka i rizikom za pretilost u djetinjstvu. Pokazalo se da ftalati i njihovi metaboliti vežu i aktiviraju receptore za aktivator proliferacije peroksioma-alfa (engl. Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR- α) i -gamma (PPAR- γ), nuklearne receptore uključene u oksidaciju masnih kiselina, adipogenezu i skladištenje masti (33). Utjecaj ftalata na povećanje BMI i opsega struka dokazan je i u populaciji žena starijih od 18 godina (34). Adolescencija može biti osobito kritičan prozor izloženosti endokrinim disruptorima jer djevojke tada prolaze kroz pubertalni i reproduktivni razvoj. U populaciji djevojčica od 6-9 godina longitudinalnom studijom pokazana je pozitivna povezanost biomarkera za ftalate niske molekularne težine i razvoja dojki i stidnih dlaka (35, 36). Dodatan oprez potreban je i kod dojenčadi, koja mogu biti osjetljivija na razvojnu i reproduktivnu toksičnost ftalata obzirom na nezrelost metaboličkog sustava i izloženost visokoj dozi obzirom na jedinicu površine tijela.

Studije su pokazale kako ftalati pripadaju i skupini kemikalija koje utječu na funkciju štitnjače (engl. thyroid-disrupting chemicals, TDC). To su sintetske kemikalije u svakodnevnom potrošačkim proizvodima koje oponašaju ili antagoniziraju prirodne procese hormona štitnjače. Specifične populacije, kao što su trudnice i djeca, vrlo su osjetljive na izloženost TDC-ima što je izraženo promjenama u koncentracijama hormona štitnjače (disfunkcija štitnjače). Zabilježeni su inverzni odnosi između nekoliko metabolita ftalata i serumske razine T3. Razina faktora rasta slična inzulinu (engl. Insulin-like growth factor, IGF-I) promijenjena je kod djece zbog izloženosti ftalatima, što ukazuje na ulogu IGF-I u utjecaju ftalata na razine T3 u serumu obzirom da je IGF-I uključen u konverziju T4 u biološki aktivan oblik T3 (37).

Ftalati pokazuju genotoksični i kancerogeni potencijal koji se pripisuje njihovoj sposobnosti da proizvode reaktivne oblike kisika (engl. reactive oxygen species, ROS). ROS su slobodni radikali. "Nestabilna" kemijska priroda ovih radikala omogućuje im visoku reaktivnost prema glavnim staničnim makromolekulama poput DNA, RNA, proteina i lipida što dovodi do stanične toksičnosti i genotoksičnosti (slika 5). Kada proizvodnja slobodnih radikala premašuje sposobnost stanica da ih metabolizira i detoksificira, javlja se stanje oksidativnog stresa. Povećano stvaranje ROS-a dovodi do oksidativnog stresa koji može imati mutagene i kancerogene učinke ili uzrokovati gubitak stanične funkcije i staničnu smrt. Na taj način ROS doprinosi patofiziologiji mnogih ljudskih bolesti, uključujući upalne bolesti i rak (38).



Slika 5. Mogućnosti nastanka ROS-a i njihove posljedice (39)

Studija parova (engl. case-control) proučila je i usporedila okoliš djece iz dvije skupine: 198 ispitanika s perzistentnim alergijskim simptomima i 202 zdravih ispitanika, „kontrola“ bez alergijskih simptoma. Klinički i tehnički tim istražili su okolinu svakog djeteta. Pokazala se pozitivna povezanost BBzP iz kućne prašine s rinitisom ($p = 0,001$) i ekcemom ($p = 0,001$), dok je DEHP povezan s astmom ($p = 0,022$). Nadalje, u ovoj studiji pokazana je i ovisnost učinka o dozi. Zaključak studije je da su ftalati, u rasponu koncentracija koje su prisutne u zatvorenom okruženju, povezani s alergijskim simptomima kod djece (40).

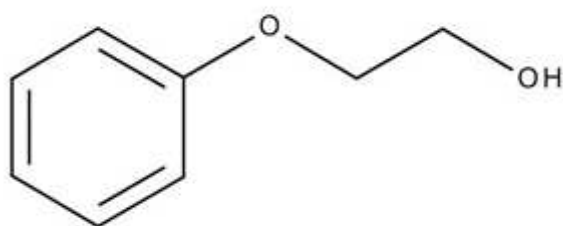
1.5. Alergeni i iritansi

Nadraženu kožu mogu uzrokovati različiti čimbenici. To uključuje poremećaje imunološkog sustava, lijekove i infekcije. Kada je alergen odgovoran za pokretanje odgovora imunološkog sustava, nastaje alergijska reakcija kože. Alergijski kontaktni dermatitis (engl. *Allergic Contact Dermatitis*, ACD) reakcija je preosjetljivosti tipa IV koja se javlja kada koža dolazi u izravni kontakt s alergenom. Na mjestu kontakta može doći do razvoja crvenila, ljuskanja, svrbeža ili natečenosti kože (41). O važnosti kožnih alergija govori podatak da se u Sjedinjenim Američkim Državama u razdoblju od 1997. - 1999. i 2009. - 2011., prevalencija kožnih alergija povećala sa 7,4% na 12,5% u populaciji djece i tinejdžera do dobi od 17 godina (42). Kozmetički proizvodi, lijekovi, bojila za odjeću, kao i hrana, guma i otrovni bršljan najčešći su uzroci ACD-a. Iritirajući kontaktni dermatitis (engl. *Irritant Contact Dermatitis*, ICD) nastaje kada određena tvar ošteti dio kože na mjestu kontakta. Često je izraženija bol nego svrbež. Što je tvar dulje u dodiru s kožom, ili što je tvar koncentriranija i ima veći potencijal izazivanja ICD-a, to će reakcija biti snažnija. Sapuni, deterdženti, kiseline, baze, otapala, urin i stolica najčešći su okidači za ICD (41).

Različite skupine sastojaka kozmetičkih proizvoda imaju potencijal izazivanja alergijske reakcije. Sustavni pregled koji je objedinio rezultate testova kontaktnim načinom (engl. *patch test*) pokazao je da su među 5 najčešćih alergena mješavina parfema (2.) i lanolin (5.) koji se često koriste u proizvodima za njegu kože (43). Mješavina parfema u testu sadrži 8 komponenti u koncentraciji od 1%: cinamaldehyd, cinamol, eugenol, amilcinamaldehyd, hidroksicitronelal, geraniol, izoeugenol i hrastova mahovina. Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje prisustvo ovih tvari mora biti navedeno na pakiranju ako se nalazi u koncentraciji većoj od 0,001% u proizvodima koji ostaju na koži (16). Lanolin čine pročišćene masti dobivene iz vune ovce. Sadrži sterole, kolesterol, triterpene i alifatske alkohole. Precizni senzibilizator lanolina zasada nije poznat, ali smatra se da je to vjerojatno alkoholna frakcija lanolina. Unatoč potencijalu senzitivacije zbog svojih emolijentnih svojstava široko se koristi u proizvodima za zaštitu dječje kože (44).

Antioksidansi korišteni za prevenciju oksidacije nezasićenih masnih kiselina u proizvodima, kao što su butilirani hidroksianisol (engl. *Butylated Hydroxyanisole*, BHA), butilirani hidroksitoluen (engl. *Butylated Hydroxytoluene*, BHT) i tokoferol (vitamin E), povremeno izazivaju alergiju na kozmetiku (14). Iako se vitamin E i njegovi derivati često

upotrebljavaju u mnogim kozmetičkim proizvodima, izvješća o nuspojavama kao što su alergijske ili nadražujuće reakcije kože su rijetka (45). BHA je jedan od primarnih antioksidansa koji se koriste u hrani i kozmetičkim proizvodima, jer usporava oksidaciju vitamina A, masti i biljnih ulja te je učinkovit stabilizator eteričnih ulja, parafina i polietilena (46). Ispitivanja na životinjama pokazala su karcinogeni potencijal BHA i BHT, koji je izraženiji kod BHA. Ipak, ovaj učinak nije ispitan kod ljudi te ne postoji zaključak o mogućem karcinogenom učinku kod ljudi (47). Ispitivanja na životinjama također su pokazala da je BHA potencijalni endokrini disruptor, pri čemu je najizraženiji antiestrogeni učinak. Pokazano je značajno smanjenje relativne i apsolutne težine maternice pri primjeni različitih doza BHA (50, 100, 250 i 500 mg/kg), pri čemu ono nije bilo ovisno o dozi. BHA primijenjen u dozi od 500 mg/kg također značajno smanjuje porast relativne i apsolutne težine maternice i vagine stimuliran 17-estradiolom. Relativna težina jetre i nadbubrežne žlijezde bila je znatno povećana primjenom BHA u dozi 500 mg/kg. Relativna težina bubrega i štitnjače bila je nepromijenjena (48). Dosadašnja ispitivanja na životinjama nisu pokazala isti potencijal za BHT.



Slika 6. Strukturna formula fenoksietanola

Zbog svog antimikrobnog djelovanja fenoksietanol je, uz parabene, najčešće korišteni konzervans, s prisutnošću u 23% kozmetičkih proizvoda (49). Primjena proizvoda koji sadrže fenoksietanol povezana je s alergijskim reakcijama, uz prijavljene slučajeve anafilaksije (50). Studija iz 2015. godine povezala je gel za Doppler ultrazvuk s upalom kože, uz rijetka izvješća o anafilaksiji. Smjese fenoksietanola i parabena pronađenih u gelu mogu dovesti do jačih alergijskih reakcija u odnosu na sam fenoksietanol (51). Ispitivanja pokazuju i potencijalni utjecaj na neurološki razvoj djece prilikom izloženosti u trudnoći. Veće koncentracije metabolita fenoksietanola u urinu trudnica tijekom prvog tromjesečja trudnoće povezane su s nižim rezultatima u domeni verbalnog razumijevanja u dobi od 6 godina (52).

Znanstveni odbor za zaštitu potrošača (engl. *Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS) smatra da je 2-fenoksietanol siguran za upotrebu kao konzervans s maksimalnom koncentracijom od 1,0 % (maksimalna dopuštena koncentracija u kozmetičkim proizvodima propisana Uredbom Europske Komisije br. 1223/2009). Ovo mišljenje ne uzima u obzir izloženost iz drugih izvora, osim kozmetike (53).

1.6. Poželjni sastojci kozmetičkih proizvoda

Emolijensi su emulzije koje sadrže lipide (kolesterol, ceramid, linolat, palmitat), koji omekšavaju kožu i vraćaju elastičnost i homeostazu, sprečavajući transepidermalni gubitak vode. Oni ostavljaju lipidni film koji ispunjava prostore između korneocita, što olakšava njihovu adherenciju za rožnati sloj. Stoga, oni djeluju kao humektans (privlači vodu u kožu) i okluziv (spriječava isparavanje vode). Emolijensi se preporučuju u svakodnevnoj njezi suhe ili ljuškave kože te atopijskog dermatitisa. Učinkovitost bilo kojeg emolijensa povećava se kada se nanosi neposredno nakon kupanja ili na vlažnu kožu (54, 55).

Za liječenje pelenskoga osipa stručnjaci preporučuju uporabu pripravaka koji stvaraju barijeru. To su pripravci koji sadrže cinkov oksid ili vazelin, a koji štite kožu od vlažnosti i iritirajućih čimbenika te mogu umanjiti težinu simptoma (7). Cink oksid anorganski je spoj koji ima antiseptičko, adstringentno, umirujuće i zaštitno djelovanje. Zbog toga se koristi u topikalnim preparatima za smanjenje simptoma kod ekcema, ogrebotina, rana i hemoroida. Također reflektira ultraljubičasto zračenje i može se koristiti u kremama za sunčanje (44). Vazelin se često koristi u prevenciji infekcija kože nakon ambulantnih operacija te za njegu kože kod AD-a i pelenskog osipa zbog toga što poboljšava antimikrobni odgovor i funkciju barijere kože te povećava hidrataciju kože. Molekularni mehanizam učinaka vazelina uključuje značajno povećanje aktivnosti antimikrobnih peptida i ekspresiju urođenih imunogenih gena (posebno vezanih za IL-6, IL-8 i IL-1B). Primjena vazelina također pridonosi ekspresiji ključnih markera diferencijacije barijere i na taj način povećanju debljine rožnatoga sloja (56).

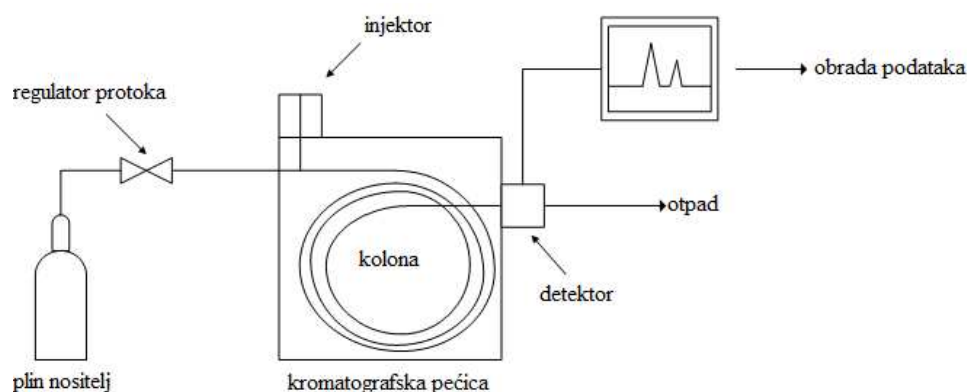
Vitamin E naziv je za skupinu esencijalnih mikronutrijenata sastavljenu od tokoferola i tokoteriola topljivih u lipidima s jakim antioksidativnim djelovanjem koje se očituje u

sprječavanju propagacije slobodnih radikala. Vitamin E acetat koža brzo apsorbira. Ljudska koža ima specifične enzime za transformaciju vitamina E acetata (tokoferil acetata) u vitamin E (tokoferol). Glavna je funkcija vitamina E očuvanje integriteta unutarstanične membrane zaštitom njene fizičke stabilnosti i pružanja zaštite od bilo kakvog oštećenja tkiva uzrokovanog oksidacijom. Vitamin E u topikalnim preparatima ima i emolijentan učinak kojim potpomaže i funkciju barijere kože (57). Kliničko istraživanje u kojemu su pacijenti s atopijskim dermatitisom tretirani s placebom ili oralnim vitaminom E (400 i.j./ dan) tijekom 8 mjeseci pokazalo je poboljšanje i skoro postizanje remisije atopijskog dermatitisa i 62 % -tni pad razine IgE u serumu u skupini koja je tretirana vitaminom E (45). Dodatna istraživanja ukazuju kako topikalno primijenjen vitamin E može biti terapijski dodatak za kontrolu simptoma atopijskog dermatitisa (58). Također, znanstveni dokazi upućuju na fotozaštitnu ulogu vitamina E. Primjena topikalnih formulacija vitamina E prije izlaganja ultraljubičastom zračenju značajno smanjuje akutne reakcije kože, kao što je eritem, edem i peroksidacija lipida te kronične reakcije kože kao što su boranje kože i incidencija tumora kože (45). Uporaba topikalnih preparata s vitaminom E preporučuje se u njezi rana kako bi se ubrzalo zacjeljivanje rana te spriječio nastanak hipertrofiranih ožiljaka, vjerojatno zbog svojstva vitamina E da inhibira sintezu kolagena te smanjuje proliferaciju fibroblasta i upalu. Iako za ove učinke postoje studije sa oprečnim rezultatima, studija provedena isključivo u populaciji djece pokazala je pozitivne učinke vitamina E u sprječavanju nastanka ožiljka u odnosu na kontrolnu skupinu (57).

Pantotenska kiselina (vitamin B5) bitna je za normalnu funkciju epitela. Sastavni je dio koenzima A, koji služi kao kofaktor za različite enzimski katalizirane reakcije. Topikalna primjena dekspantenola, stabilnog alkoholnog analoga pantotenske kiseline, temelji se na dobroj penetraciji kože i visokoj apsorpciji. Topikalno primijenjen dekspantenol djeluje kao humektans, poboljšava hidrataciju rožnatog sloja, smanjuje transepidermalni gubitak vode i održava mekoću i elastičnost kože. Također je vidljivo ubrzana ponovna epitelizacija i protuupalni učinak kod zacjeljivanja rana i eritema. Povoljni učinci dekspantenola opaženi su kod zacjeljivanja rana, presađivanja kože, opekline te raznih dermatoza kože. Stimulacija epitelizacije i granulacije tkiva i ublažavanje svrbeža najistaknutiji su učinci formulacija koje sadrže dekspantenol. Istraživanja su pokazala kako njega kože s dekspantenolom znatno poboljšava simptome iritacije kože, kao što je suhoća kože, hrapavost, ljuskanje, svrbež i eritem tijekom uporabe preparata 3 do 4 tjedna. Topikalna primjena preparata dekspantenola dobro je podnošljiva, uz minimalni rizik nadraživanja kože ili senzibilizacije (59).

1.7. Plinska kromatografija sa spektrometrom masa

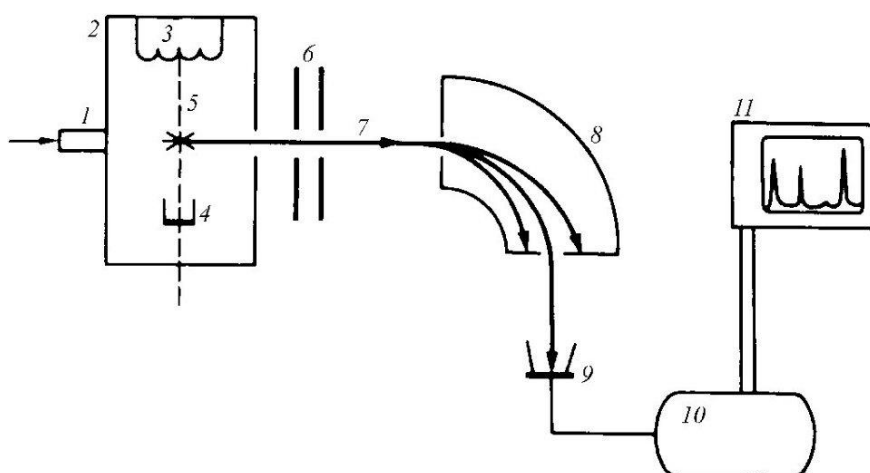
Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) potvrdna je metoda analize koja obuhvaća sve kromatografske metode u kojima je pokretna faza plin, a nepokretna faza tekuća ili čvrsta. Primjenjuje se za analizu plinovitih tvari ili tvari koje lako isparavaju na radnoj temperaturi kolone (do $\approx 300^{\circ}\text{C}$), a da pri tome ne dođe do njihove razgradnje. Budući da velik broj tvari zadovoljava ovaj uvjet, plinska kromatografija postala je standardna metoda analize u toksikološkim laboratorijima (60).



Slika 7. Shematski prikaz plinskog kromatografa (61)

Uzorak otopljen u organskom otapalu se zagrijava i uparen injektira na početak kolone. Uparene sastojke plin nosilac nosi kroz kolonu. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava pojedinih sastojaka uzorka oni se razdvajaju i u različitom vremenu dolaze do detektora (60). Signali na detektoru se zabilježavaju kao pikovi na kromatogramu.

Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) instrumentalna je metoda identifikacije kemijskih struktura kroz dva procesa: ionizaciju uzorka i razdvajanje fragmenata djelovanjem magnetskog polja (62). Spektrometar masa ima tri osnovna dijela: ionizator, analizator i detektor.



Slika 8. Shematski prikaz spektrometra masa : 1. sustav za unošenje uzorka; 2. ionski izvor; 3. katoda; 4. anoda; 5. elektronski snop; 6. električno polje; 7. ionski snop; 8. magnetsko polje; 9. detektor; 10. elektronička obradba signala; 11. zapis spektra (63)

Uzorak se uvodi u ionizator gdje se molekule i/ili fragmenti molekula ioniziraju. Na plinovite ionizirane molekule i ionizirane fragmente molekula koji nastaju cijepanjem molekula djeluje se magnetnim ili elektrostatskim poljem. Ioni se razdvajaju prema odnosu masa i naboja (m/z). Razdvojeni ioni se detektiraju, a signal se pohranjuje u bazi podataka kao m/z omjer i može se prikazati u obliku m/z spektra (60).

Plinska kromatografija sa spektrometrom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) metoda je koja objedinjuje značajke plinsko-tekućinske kromatografije i spektrometrije masa u cilju identifikacije različitih tvari unutar ispitivanog uzorka. Sastoji se od dvije glavne jedinice, plinskog kromatografa (GC) i spektrometra masa (MS) (64). Karakteristični podaci dobiveni plinskom kromatografijom su vrijeme zadržavanja (značajno za identifikaciju sastojka) i površina ispod pika (proporcionalna količini sastojka), a spektrometrom masa dobiva se spektar masa jedinstven za svaku tvar (prikazuje relativnu zastupljenost nastalih fragmenata u ispitivanom spoju). Usporedbom dobivenog spektra fragmentacije s referentnim spektrima koje pružaju baze spektara strukturalna identifikacija određenog sastojka je znatno olakšana (62). Prednosti GC-MS metode su visoka osjetljivost, preciznost, selektivnost i male količine uzorka potrebne za analizu. Nedostatak ove analize je dugotrajan i skup postupak pripreme te visoke radne temperature koje mogu dovesti do degradacije termolabilnih sastojaka uzorka (64).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovoga rada su:

1. Primjenom GC-MS metode odrediti kvalitativni sastav dječjih krema.
2. Usporediti rezultate prisustva nepoželjnih sastojaka s deklaracijom na ambalaži proizvoda.
3. Odrediti moguću povezanost učestalosti prisustva nepoželjnih sastojaka i cjenovnog ranga proizvoda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije i uzorci za analizu

U ovom su istraživanju od kemikalija korišteni:

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka;

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka;

N-heksan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka.



Slika 9. Kemikalije korištene za analizu

Ispitivano je 10 uzoraka, koji su prema cijeni podijeljeni u dva cjenovna ranga (Tablica 1). Cijene uzoraka u rasponu su od 11,98 kn - 255,93 kn na 100 mL. Proizvodi čije su cijene iznad medijana od 47,66 kn svrstani su u viši cjenovni rang, dok su oni cijenom ispod medijana svrstani u niži cjenovni rang.

Tablica 1. Popis analiziranih uzoraka

UZORAK	CIJENA (KN) NA 100 ML	CJENOVNI RANG
1	15,90	Niži
2	46,32	Niži
3	11,98	Niži
4	14,18	Niži
5	104,50	Viši
6	255,93	Viši
7	47,12	Niži
8	130,90	Viši
9	83,34	Viši
10	48,21	Viši

3.2. Postupak pripreme uzoraka za analizu

Svi uzorci označeni su pripadajućim laboratorijskim brojem (slika 10).

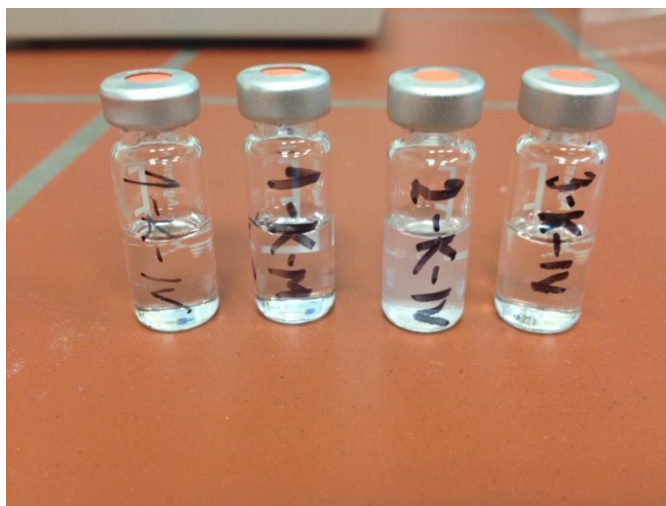


Slika 10. Analizirani uzorci

Za pripremu uzoraka korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak mase 0,1 g (slika 11). Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala kloroforma, etilacetata i N-heksana u jednakom omjeru ($v/v/v = 1:1:1$). Uzorci u Petrijevim zdjelicama su ispirani smjesom otapala do potpunog otapanja uzorka. Nakon otapanja, uzorci otopljeni u 1 mL smjese otapala preneseni su u staklene tubice za GC-MS analizu (slika 12). Uzorak br. 1 istim je postupkom otopljen i u kloroformu kako bi se ispitao utjecaj pripreme uzorka na rezultate.



Slika 11. Vaganje uzorka



Slika 12. Dio uzoraka pripremljenih za GC-MS analizu

3.3. Instrumentalna metoda i radni uvjeti GC-MS metode

Za kvalitativnu analizu ispitivanih uzoraka u ovom istraživanju korišten je plinski kromatograf s masenim spektrometrom: Shimadzu GCMS-QP2010 (slika 13). Kromatografska analiza pripremljenih uzoraka izvedena je metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC) u području od 40 – 700 m/z i snimanje samo odabranih iona (engl. *Single Ion Monitoring*, SIM). Optimiran je temperaturni program.

Optimalni radni uvjeti:

- duljina kolone: 30 m
- promjer kolone: 0,25 mm
- volumen injektiranja: 1 μL (splitless)
- temperatura injektora: 250 °C
- protok plina nosioca: 1,5 mL/min

Ukupno trajanje temperaturnog programa: 50,33 min

1. 90 °C izotermno 3 min
2. 15 °C/min do 270 °C (izotermno 5 min)
3. 15 °C/min do 320 °C (izotermno 27 min)

Kvalitativna analiza izvedena je koristeći spektre masa iz biblioteka referentnih spektara Wiley 9, NIST 14 i NIST 17.

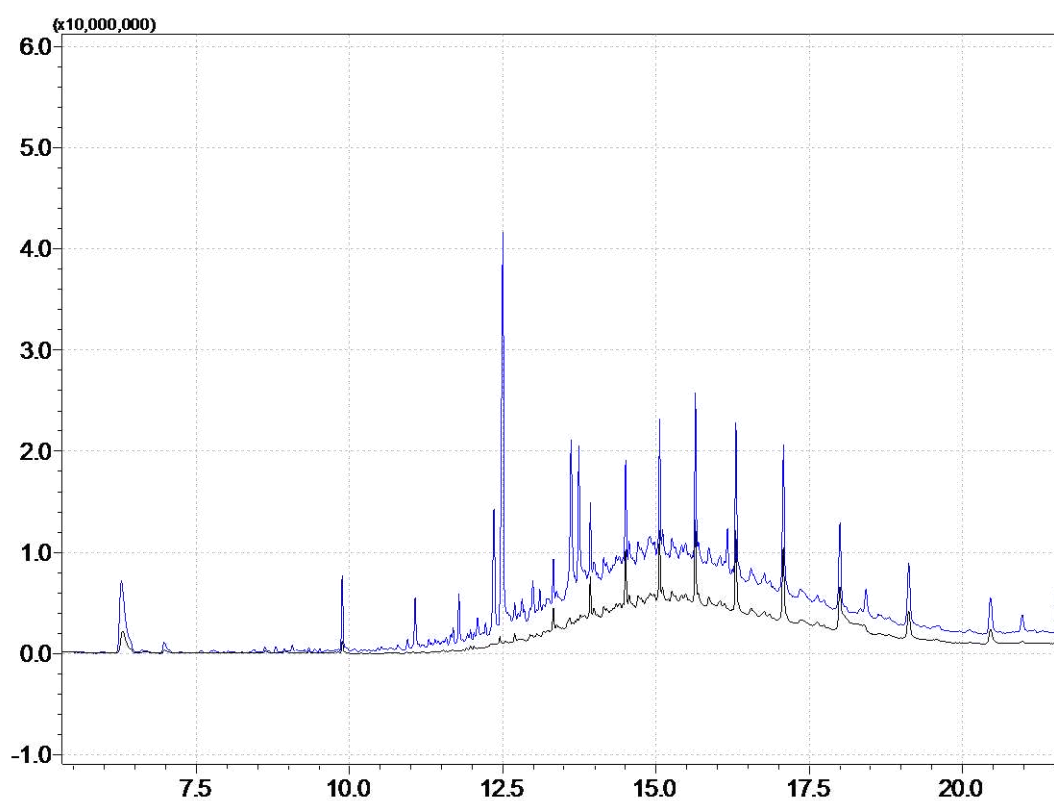


Slika 13. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010 (65)

4. REZULTATI

Rezultati su prikazani kromatogramima na kojima os x prikazuje vrijeme zadržavanja uzorka u koloni u minutama (retencijsko vrijeme, RT) dok os y prikazuje intenzitet tvari proporcionalan koncentraciji tvari.

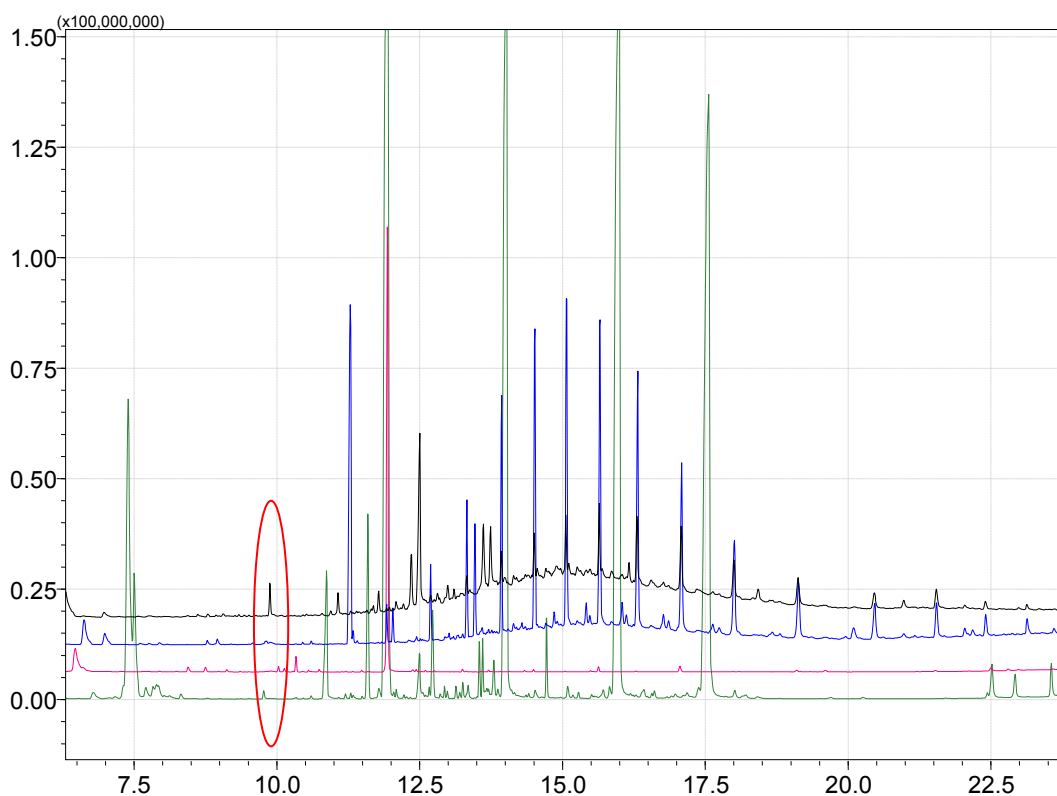
Kako bi se odredilo najpovoljnije otapalo uzorak br. 1 pripremljen je na dva načina: otapanjem u kloroformu i otapanjem u smjesi otapala kloroform:etilacetat:N-heksan (1:1:1), te su oba pripremljena uzorka analizirana GC-MS metodom. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 1 koji je otopljen u smjesi otapala imao je veće odazive pikova u odnosu na ukupni ionski kromatogram uzorka br. 1 koji je otopljen u kloroformu (slika 14) te su ostali uzorci pripremljeni otapanjem u smjesi otapala.



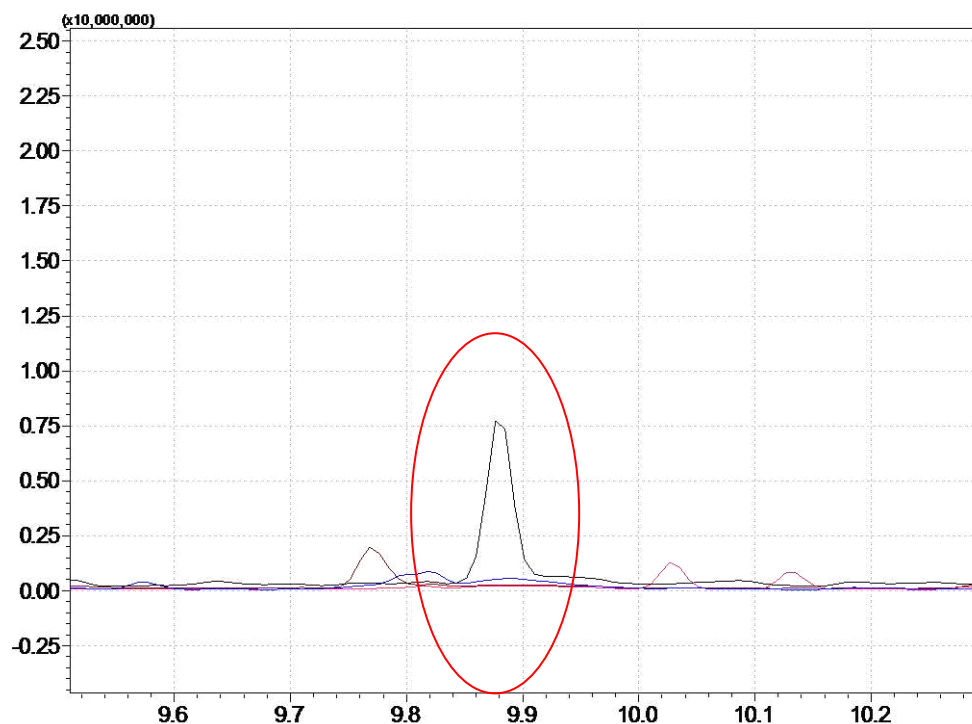
Slika 14. Usporedba rezultata analize uzorka br. 1: otopljen u kloroformu - kromatogram označen crnom bojom i otopljen u smjesi otapala kloroform:etilacetat:N-heksan (1:1:1) - kromatogram označen plavom bojom.

Ukupni ionski kromatogrami uzoraka dobiveni GC-MS metodom analize pretraživani su s ciljem utvrđivanja prisutnosti specifičnih poželjnih i nepoželjnih sastojaka dječjih krema. Nepoželjni sastojci koji su određivani su ftalati, parabeni, fenoksietanol, BHA i BHT, lanolin i tvari prisutne u mješavini parfema koja se koristi u testu kontaktnim načinom. Poželjni sastojci koji su određivani su kolesterol, cink oksid, vitamin E, vazelin i dekspantenol.

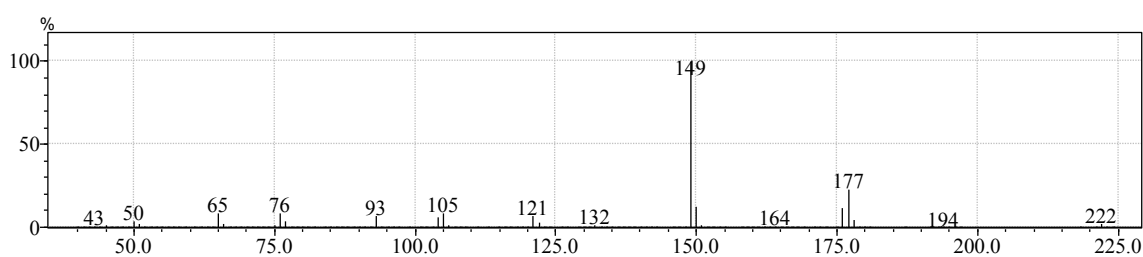
U svim analiziranim uzorcima prisutan je signal za dietil ftalat (RT = 9,87) i diizodecil ftalat (RT=12,5). U 9 uzoraka ovi signali pokazuju minimalan odaziv (visinu pika). U uzorku br. 1 odaziv je minimalan za diizodecil ftalat (RT = 12,5) dok je za dietil ftalat (RT = 9,87) visina pika značajno veća u odnosu na ostale uzorke. Usporedba ukupnih ionskih kromatograma uzoraka br. 1, 2, 7 i 9 prikazana je na slikama br. 15 i 16. Ftalati nisu deklarirani ni na jednoj ambalaži ispitivanih proizvoda. Uzorak br. 1 u kojemu je detektiran značajan signal za dietil ftalat pripada skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga.



Slika 15. Usporedba rezultata analize usporednim prikazom ionskog kromatograma uzoraka označenih: br. 1 - crnom, br. 2 - plavom, br. 7 – roza i br. 9 – zelenom bojom s karakterističnim signalom za dietil ftalat (RT=9,87) detektiranim u uzorku br. 1.



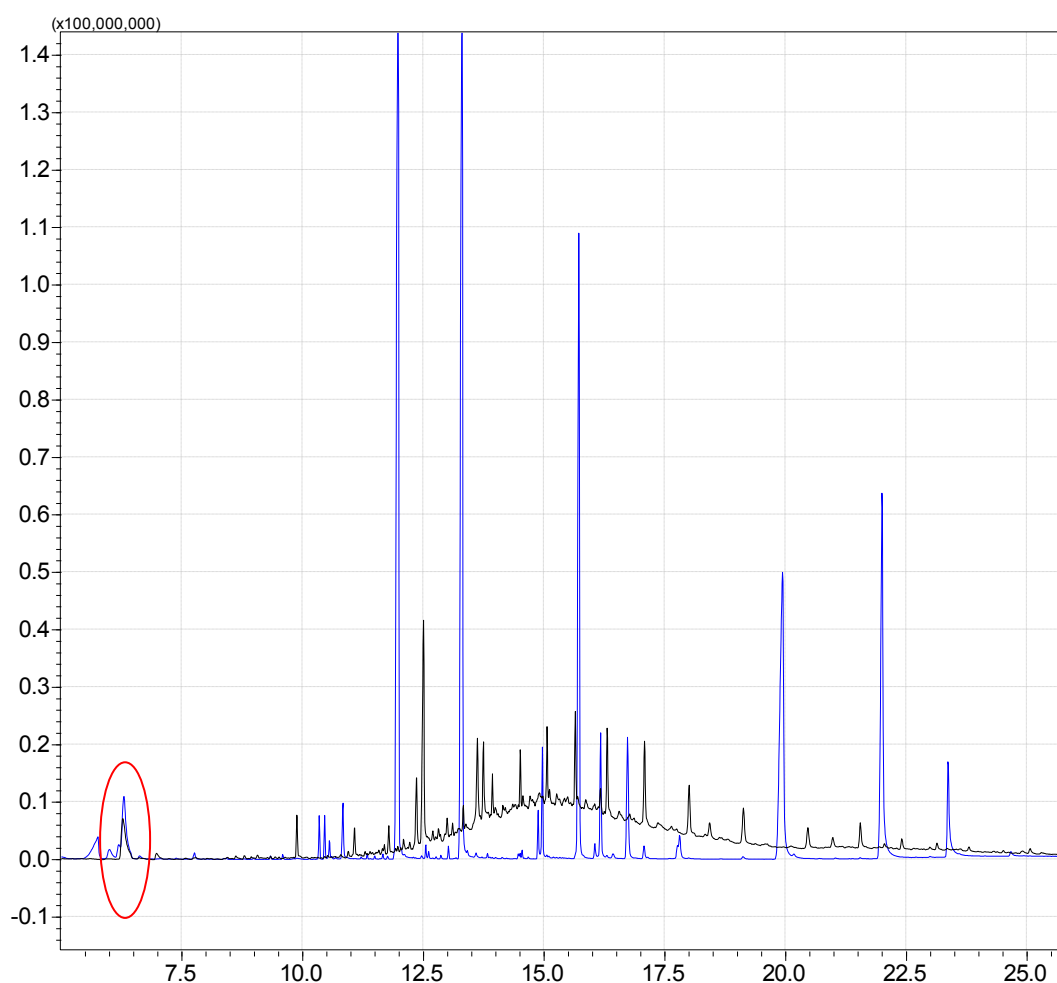
Slika 16. Uvećani prikaz slike br. 15 s fokusom na karakteristično retencijsko vrijeme dietil ftalata ($RT = 9,87$). Usporedba rezultata analize preklapanjem ionskog kromatograma uzoraka označenih: br. 1 - crnom, br. 2 - plavom, br. 7 – roza i br. 9 - smeđom bojom.



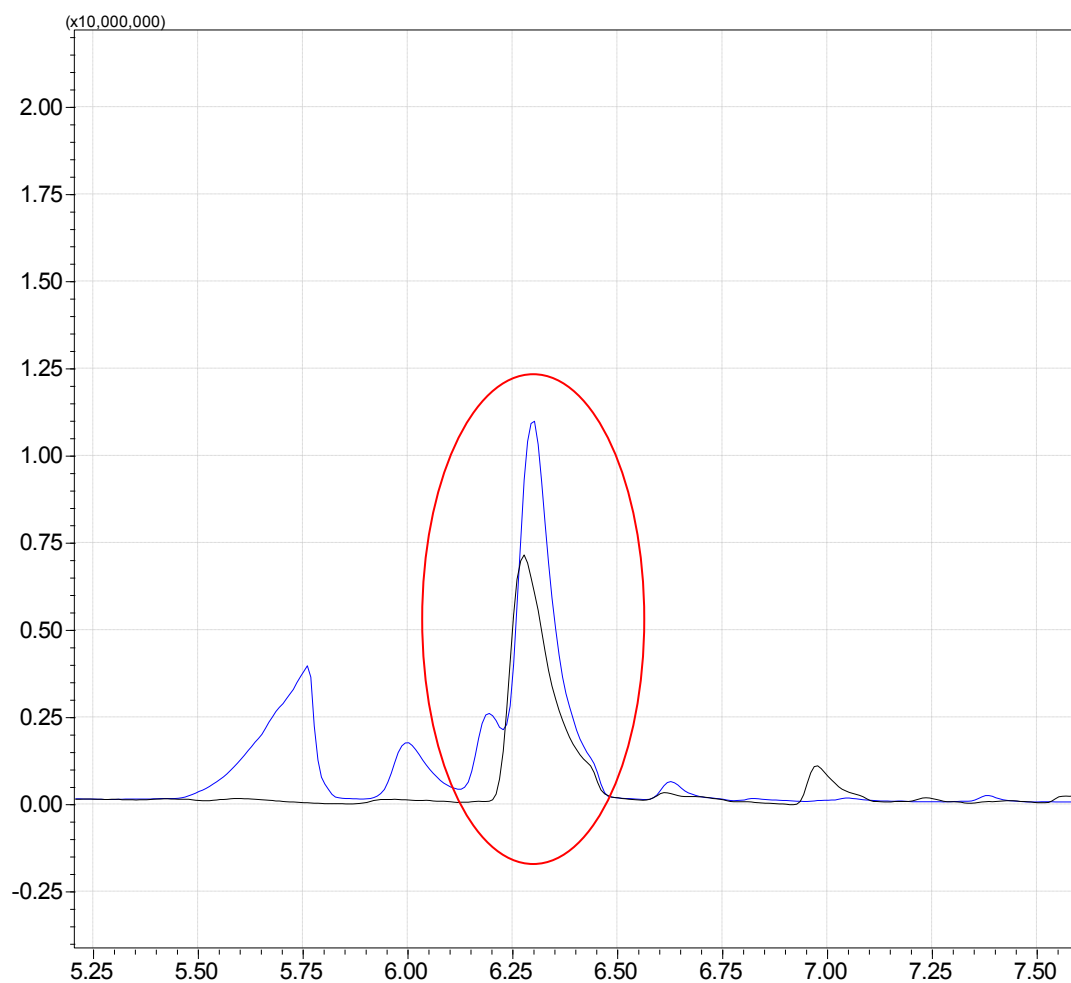
Slika 17. Karakterističan spektar masa za dietilftalat dokazan u uzorku br. 1

Esteri parabena nisu detektirani ni u jednom analiziranom uzorku. Također, parabeni nisu deklarirani ni na jednoj ambalaži ispitivanih proizvoda.

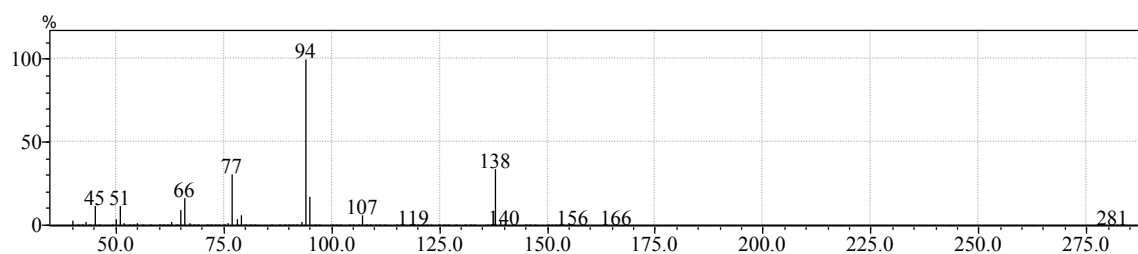
Prisutnost fenoksietanola ($RT = 6,25$) detektirana je u uzorku br. 1 i uzorku br. 8. Na slikama br. 18 i 19 prikazana je usporedba ukupnih ionskih kromatograma uzoraka br. 1 i br. 8. Fenoksietanol je deklariran na ambalažama proizvoda uzoraka br. 1 i br. 8 te nije detektiran u uzorcima proizvoda na čijim ambalažama nije naveden. Uzorak br. 1 pripada skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga dok uzorak br. 8 pripada skupini proizvoda višeg cjenovnog ranga.



Slika 18. Usporedba rezultata analize preklapanjem ionskog kromatograma uzoraka označenih: br. 1 - crnom i br. 8 - plavom bojom s karakterističnim signalom za fenoksietanol ($RT = 6,25$).

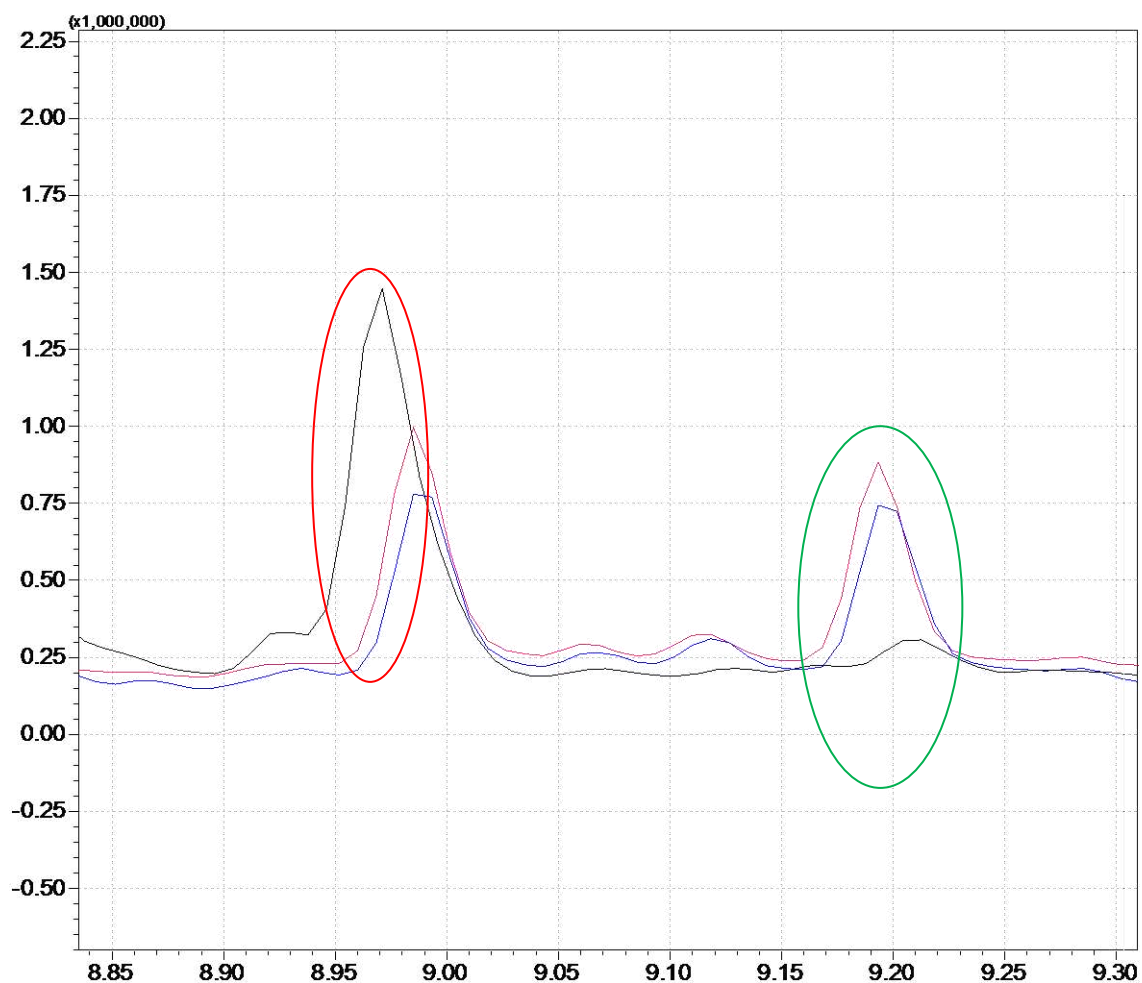


Slika 19. Uvećani prikaz slike br. 18 s fokusom na karakteristično retencijsko vrijeme fenoksietanola ($RT = 6,25$). Usporedba rezultata analize preklapanjem ionskih kromatograma uzoraka označenih: br. 1 - crnom i br. 8 - plavom bojom.

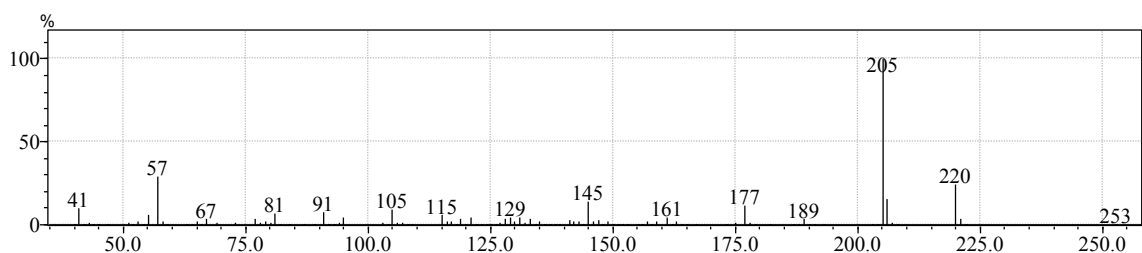


Slika 20. Karakterističan spektar masa za fenoksietanol dokazan u uzorcima br. 1 i 8

Od deset analiziranih uzoraka BHA ($RT = 8,97$) je detektiran u jednom uzorku (uzorak br. 2). U uzorku br. 2, uzorku br. 3 i uzorku br. 4 detektiran je BHT ($RT = 9,2$). Na deklaraciji ambalaže uzorka br. 2 navedeni su BHA i BHT, dok na deklaraciji ambalaže uzoraka br. 3 i 4 nije naveden BHT. Tri uzorka u kojima je detektirana prisutnost BHA i/ili BHT pripadaju skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga. U proizvodima koji pripadaju skupini višeg cjenovnog ranga nisu detektirani ovi antioksidansi.



Slika 21. Usporedba rezultata analize preklapanjem ionskog kromatograma uzoraka označenih: br. 2 – crnom, br. 3 - plavom i br. 4 - roza bojom s karakterističnim signalom za BHA (označen crvenom bojom, $RT = 8,97$) i BHT (označen zelenom bojom, $RT = 9,2$).



Slika 22. Karakterističan spektar masa za BHT dokazan u uzorcima br. 2, 3 i 4

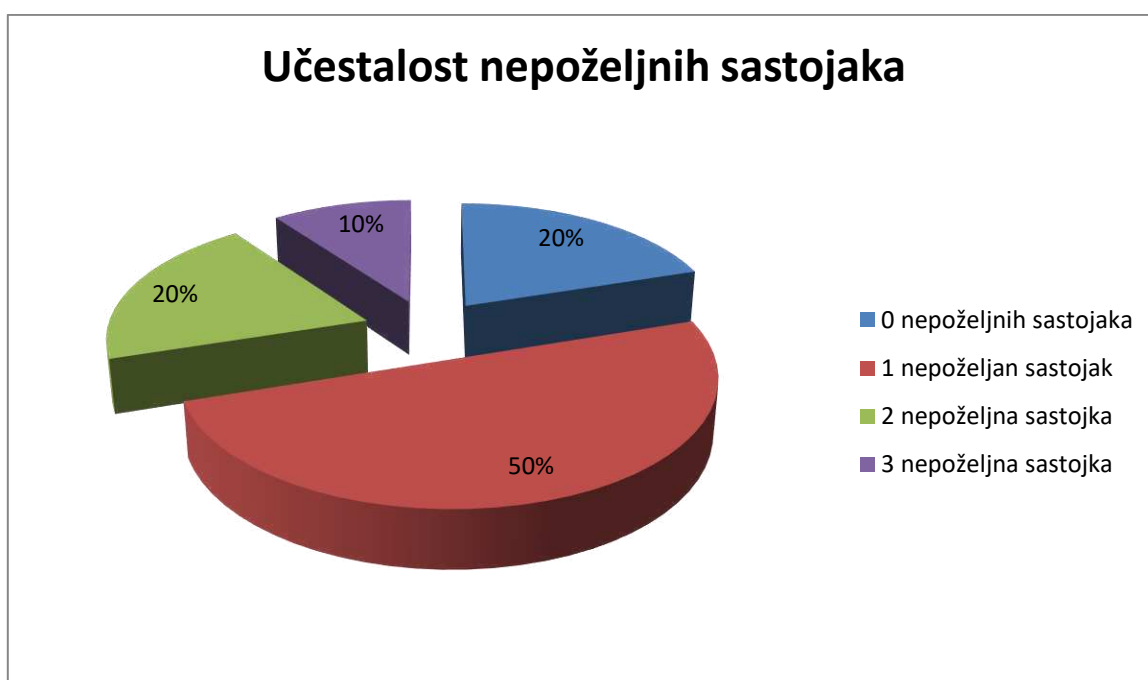
Lanolin je deklariran u sastavu četiri uzorka. Ovi uzorci pripadaju skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga. Ni jedan analizirani proizvod koji pripada skupini proizvoda višeg cjenovnog ranga ne sadrži lanolin.

Na ambalaži pet analiziranih proizvoda deklarirano je prisustvo parfema (označeno kao *Parfum*). Pozitivnim rezultatom u ovom ispitivanju smatran je pronalazak barem jednog parfema koji je sastavni dio mješavine parfema u testu kontaktnim načinom. U četiri uzorka potvrđeno je prisustvo parfema, pri tome tri proizvoda pripadaju skupini nižeg cjenovnog ranga (uzorci br. 1, 2 i 7) te jedan proizvod pripada skupini višeg cjenovnog ranga (uzorak br. 10). U tablici 2 prikazan je odnos uzoraka pozitivnih na prisutnost parfema koji je sastavni dio mješavine parfema u testu kontaktnim načinom i deklaracije na ambalaži odgovarajućih proizvoda. U svim uzorcima u kojima je detektiran parfem pronađen je samo jedan od osam parfema iz mješavine parfema u testu kontaktnim načinom.

Tablica 2. Odnos detektiranih parfema koji su sastavni dio mješavine parfema u testu kontaktnim načinom i deklaracije

REDNI BROJ UZORKA	PARFEM DETEKTIRAN U UZORKU	PARFEM KOJI JE DETEKTIRAN	PARFEM DEKLARIRAN NA AMBALAŽI
1	✓	cinamaldehyd	✓
2	✓	geraniol	✓
3			
4			
5			
6			
7	✓	eugenol	✓
8			✓
9			
10	✓	geraniol	✓

Od deset ispitanih uzoraka u 80% uzoraka detektiran je barem jedan od traženih nepoželjnih sastojaka dječjih krema (slika 23), pri čemu u pet proizvoda koji pripadaju skupini nižeg cjenovnog ranga (uzorci br. 1, 2, 3, 4 i 7) te tri proizvoda koji pripadaju skupini višeg cjenovnog ranga (uzorci br. 5, 8 i 10). U uzorcima br. 3, 4, 5 i 7 detektirano je prisustvo jednog, a u uzorcima br. 2 i 8 prisustvo dva nepoželjna sastojka. Prisustvo tri nepoželjna sastojka detektirano je u uzorku br. 1.



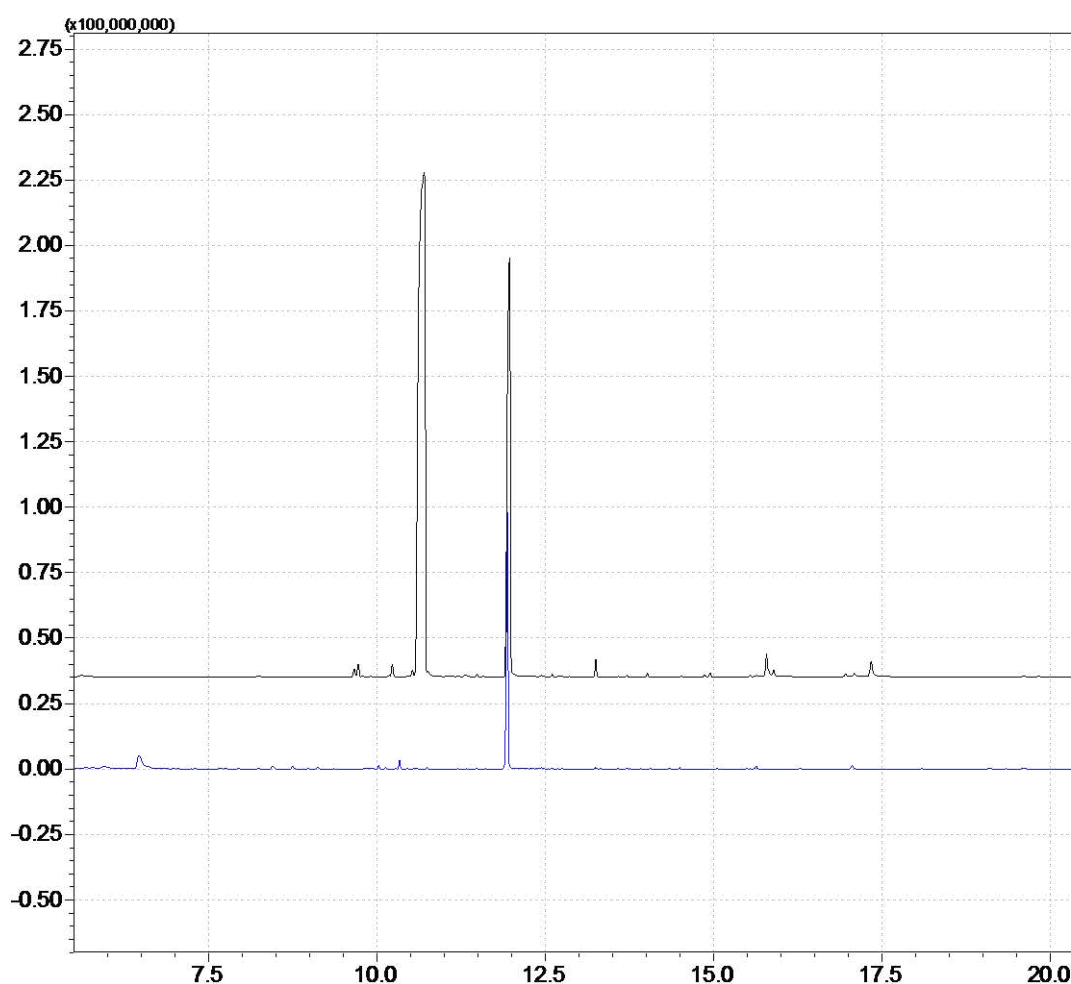
Slika 23. Grafički prikaz učestalosti nepoželjnih sastojaka u ispitanim kozmetičkim proizvodima

U 90% analiziranih uzoraka detektiran je barem jedan od traženih poželjnih sastojaka kozmetičkih proizvoda. Kolesterol je jedini poželjan sastojak koji nije posebno deklariran na ambalaži ispitivanih proizvoda, ostali detektirani poželjni sastojci u skladu su s deklaracijom. Detaljan odnos detektiranih poželjnih sastojaka i deklaracije te popis detektiranih poželjnih sastojaka prikazan je u tablici 3.

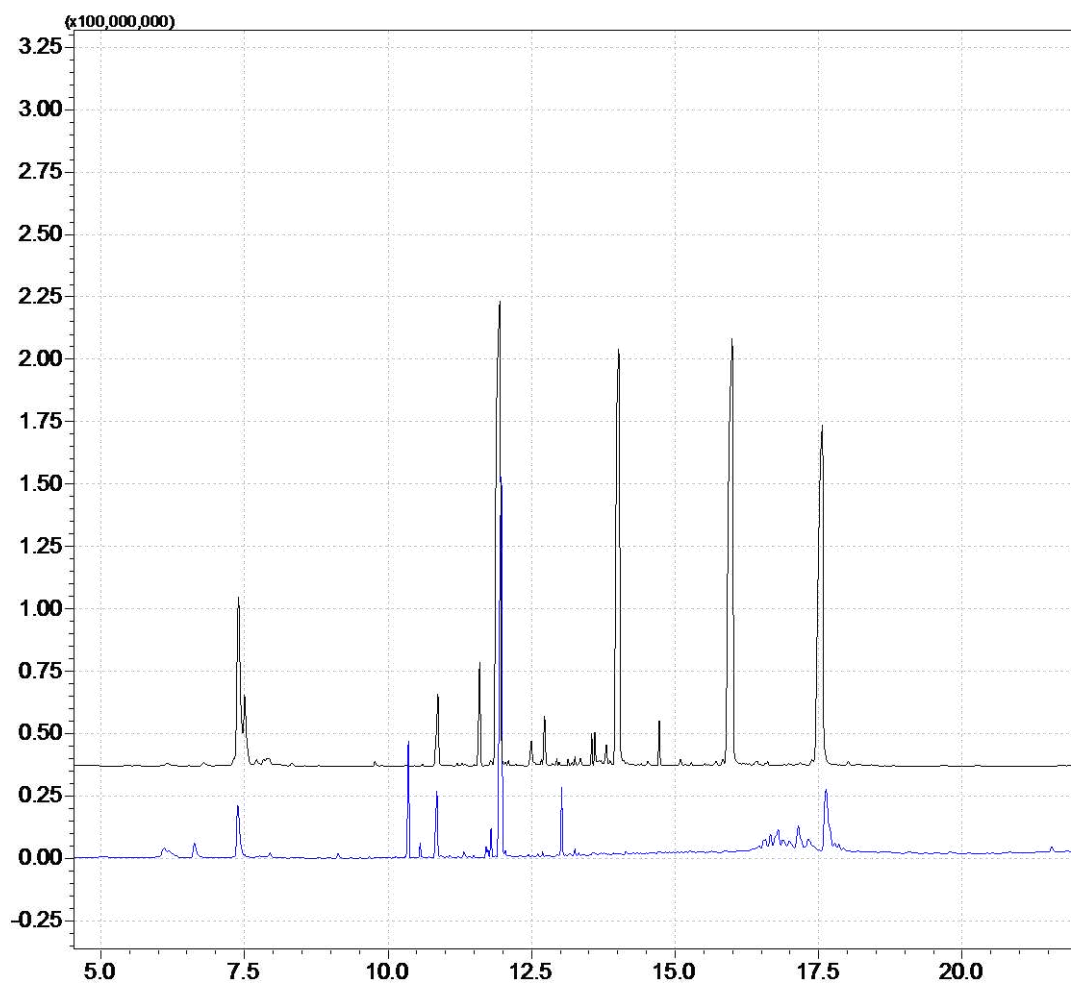
Tablica 3. Odnos detektiranih poželjnih sastojaka i deklaracije

REDNI BROJ UZORKA	POŽELJAN SASTOJAK DETEKTIRAN U UZORKU	POŽELJAN SASTOJAK PARFEM KOJI JE DETEKTIRAN	POŽELJAN SASTOJAK DEKLARIRAN NA AMBALAŽI
1	✓	vazelin	✓
2	✓	cink oksid, kolesterol	✓*
3	✓	vazelin, kolesterol	✓*
4	✓	vazelin, kolesterol	✓*
5	✓	dekspantenol, vazelin, kolesterol	✓*
6	✓	vitamin E, kolesterol	✓*
7	✓	vitamin E, kolesterol	✓*
8			
9	✓	vitamin E	✓
10	✓	vitamin E	✓
*na ambalaži nije naveden kolesterol			

U svrhu usporedbe različitih linija proizvoda istoga proizvođača ispitivani su proizvodi dviju različitih linija (osnovna linija za svakodnevnu njegu kože djece i posebna linija za njegu kože djece sklone alergijskim reakcijama) istoga proizvođača te su uspoređeni njihovi ukupni ionski kromatogrami. Analizirani su uzorci br. 6 i 7 (istog proizvođača) s tim da je uzorak br. 6 dio posebne linije, a uzorak br. 7 dio osnovne linije (slika 24). Jednako tako su ispitivani uzorci br. 9 i 10 (istog proizvođača) s tim da je uzorak br.9 dio posebne linije, a uzorak br. 10 dio osnovne linije (slika 25). U uzorcima br. 6 i 9, uzorcima koji su dio posebne linije, nije detektirano prisustvo parfema koje je detektirano u uzorcima br. 7 i 10, uzorcima koji su dio osnovne linije (tablica 2).



Slika 24. Usporedba ukupnih ionskih kromatograma uzoraka označenih: br. 6 (dio posebne linije) - crnom i br. 7 (dio osnovne linije) - plavom bojom.



Slika 25. Usporedba ukupnih ionskih kromatograma uzoraka označenih br. 9 (dio posebne linije) - crnom i br. 10 (dio osnovne linije) - plavom bojom.

5. RASPRAVA

U svim analiziranim uzorcima detektirana je prisutnost dietil ftalata i diizodecil ftalata. Signali za ove ftalate pri tom su bili minimalni u svim uzorcima osim u uzorku br. 1 gdje je signal za dietil ftalat bio značajno veći u odnosu na ostale ispitivane uzorke. Pozitivan rezultat na ftalate nije nužno posljedica dodavanja ftalata u proizvod tijekom proizvodnje, već postoji mogućnost njihovog difundiranja u proizvod iz primarne ambalaže. Također, moguća je kontaminacija uzorka u tijeku pripreme za analizu, to jest migracija ftalata iz korištenog plastičnog posuđa (npr. nastavci za pipete). Stoga su minimalni signali ftalata vjerojatno posljedica kontaminacije tijekom pripreme uzorka te nisu stvarno prisutni u analiziranom proizvodu. Obzirom da je signal za dietilftalat u uzorku br. 1 značajno veći u odnosu na ostale uzorke, a isti je analiziran prvi (isključena mogućnost veće kontaminacije s ponavljanim kontaktom otapala i plastičnog nastavka za pipete), smatramo da je isti stvarno prisutan u analiziranom proizvodu. Uzorak br. 1 pripada skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga te obzirom da ftalati nisu prisutni u proizvodima višeg cjenovnog ranga moguća je povezanost sastava proizvoda sa njegovom cijenom. Ipak, pošto ftalati nisu pronađeni ni u četiri uzorka koja pripadaju skupini nižeg cjenovnog ranga potrebna su daljnja istraživanja za ovaj zaključak. Prisustvo ftalata u ovom proizvodu može biti posljedica difundiranja u proizvod iz primarne ambalaže što upućuje na potrebu za provođenjem strože kontrole sastava proizvoda nakon pakiranja u različitim vremenskim intervalima.

U ovom ispitivanju ni u jednom uzorku nije detektirano prisustvo estera parabena. Ovaj negativan rezultat u svim uzorcima može upućivati na lažno negativne rezultate zbog neodgovarajuće pripreme uzorka ili odabrane metode analize za detekciju ovih spojeva. Odsustvo parabena u analiziranim kozmetičkim proizvodima vjerojatno je rezultat dugogodišnje negativne slike u javnosti o parabenima, što se očituje i brojnim proizvodima koji na ambalaži imaju navode kako ne sadrže parabene (engl. „*paraben free*“).

Fenoksietanol je detektiran u dvama uzorcima (uzorak br. 1 i 8). Obzirom da jedan proizvod pripada skupini višeg cjenovnog ranga a drugi skupini nižeg cjenovnog ranga, tj. raspodjela proizvoda prema cjenovnom rangu je 50% : 50% nije utvrđena povezanost cijene proizvoda i prisustva fenoksietanola. Ispitivanje iz 2017. godine, koje je objedinilo deklaracije široke palete različitih kozmetičkih pripravaka (ukupno 4 737 proizvoda), utvrdilo je prisustvo fenoksietanola u 23% proizvoda te parabena u 20% proizvoda (49). U našem ispitivanju fenoksietanol je imao sličnu učestalost (20%) dok parabeni nisu deklarirani ni detektirani ni u jednom uzorku (0%). Moguće je da je ova razlika u rezultatima, tj. manja učestalost konzervansa u našem ispitivanju, posljedica strukture našeg ispitivanja gdje su

ispitivane isključivo kreme namijenjene njezi dječje kože. Ovo bi moglo upućivati na povećanu svijest javnosti, a potom i industrije o osjetljivosti i potrebama dječje populacije.

Prisustvo BHA i/ili BHT detektirano je u tri uzorka (uzorci br. 2, 3 i 4). Ova tri proizvoda pripadaju skupini nižeg cjenovnog ranga. U proizvodima koji pripadaju skupini višeg cjenovnog ranga nisu detektirani ovi antioksidansi, stoga vjerojatno postoji povezanost uporabe ovih antioksidansa i cijene konačnog proizvoda. Proizvodi koji sadrže ove antioksidanse također sadrže lanolin, što može biti razlog uporabe antioksidansa, obzirom na visok udio nezasićenih masnih kiselina sklonih oksidaciji u lanolinu. U dva uzorka u kojima je detektiran BHT (uzorci br. 3 i 4), isti nije deklariran na ambalaži proizvoda. Moguće je da ovo odstupanje od deklaracije nije posljedica dodavanja BHT-a u proizvod tijekom proizvodnje već da se nalazio u sastavu korištene sirovine kao što je lanolin.

Prisustvo parfema deklarirano je na ambalažama pet proizvoda dok je ovim ispitivanjem ono potvrđeno u četiri uzorka (tablica 1). Razlika između deklaracije i rezultata uzorka br. 8 vjerojatno je posljedica postojanja mnogobrojnih različitih tvari koje se koriste u svrhu poboljšavanja mirisa konačnog proizvoda dok je u našem istraživanju kao pozitivan rezultat smatrano prisustvo jednog od osam parfema iz mješavine parfema za test kontaktnim načinom obzirom da je za njih dokazan potencijal izazivanja alergijske reakcije.

Od deset ispitanih uzoraka u 80% uzoraka detektiran je barem jedan od traženih nepoželjnih sastojaka dječjih krema (slika 23). Dva uzorka (uzorci br. 6 i 9) u kojima nije detektiran niti jedan od traženih nepoželjnih sastojaka pripadaju skupini proizvoda višeg cjenovnog ranga. Ovi rezultati ukazuju na to da su nepoželjni sastojci, unatoč negativnoj slici koja se o njima stvara u javnosti i sve popularnijem pokretu korištenja „prirodnih“ kozmetičkih proizvoda, i dalje razmjerno često korišteni u proizvodnji kozmetičkih proizvoda. Odsustvo parabena, dosada najčešćih konzervansa, a koji su ipak najčešće spominjani u javnosti, ukazuje da postoje promjene u sastavu kozmetičkih proizvoda. Zašto te promjene nisu brže i češće, zašto se iz uporabe odmah ne uklone tvari potencijalno štetnog djelovanja? Odgovor možda leži u činjenici da ne postoji garancija da nove tvari neće imati jednako ili više štetne učinke te da je potrebno vrijeme da se učinci novih tvari pokažu i ispituju.

Kako bi se uočila moguća povezanost između cijene proizvoda i prisutnosti nepoželjnih sastojaka za analizu su odabrani proizvodi šireg cjenovnog raspona. Obzirom na rezultate prikazane u poglavlju 4, viša cijena proizvoda nije jamstvo da u sastav proizvoda nisu uključeni određeni nepoželjni sastojci. Ipak, u skupini proizvoda višeg cjenovnog ranga nije utvrđeno odstupanje od deklaracije, to jest svi detektirani nepoželjni sastojci navedeni su na ambalaži proizvoda. U skupini nižeg cjenovnog ranga odstupanja od deklaracije zabilježena su za dietil ftalat (uzorak br. 1) i BHT (uzorci br. 2, 3 i 4). Odstupanje u slučaju dietil ftalata može biti posljedica migracije ftalata iz ambalaže nakon pakiranja proizvoda. Također, moguće je da BHT nije deklariran jer nije dodan u sastav proizvoda prilikom proizvodnje već se nalazio u sastavu korištene sirovine kao što je lanolin (prisutan u svim proizvodima u kojima je detektiran BHT). Ovi rezultati upućuju na to da kupnjom skupljeg proizvoda kupci s većom sigurnošću znaju koriste li proizvod sa neželjenim sastojkom te mogu izbjeći višestruku izloženost nepoželjnim sastojcima kroz više različitih proizvoda za njegu.

U 90% analiziranih uzoraka detektiran je barem jedan od traženih poželjnih sastojaka kozmetičkih proizvoda. Za poželjne sastojke nije utvrđeno odstupanje od deklaracije osim u slučaju kolesterola koji nije naveden ni na jednoj deklaraciji. Kolesterol vjerojatno nije posebno naveden na deklaracijama jer dolazi u sastavu složenih sastojaka kao što je lanolin.

Usporedba ukupnih ionskih kromatograma uzoraka različitih linija proizvoda istoga proizvođača (osnovna linija za svakodnevnu njegu kože djece i posebna linija za njegu kože djece sklone alergijama) ukazala je na to da proizvodi za osjetljivu kožu nemaju nužno manji broj sastojaka. Naime, ukupni ionski kromatogrami uzoraka br. 7 i 10, uzorci koji su dio osnovne linije, imali su veći broj i odziv pikova na ukupnom ionskom kromatogramu u odnosu na uzorke br. 6 i 9, uzorke istog proizvođača koji su dio posebne linije. Ipak, u uzorcima br. 6 i 9, odnosno proizvodima posebne linije, nije detektirano prisustvo parfema koje je detektirano u proizvodima osnovne linije. Ovi rezultati ukazuju na to da se pri formuliranju proizvoda za njegu osjetljive i reaktivne kože kozmetička industrija ne usmjerava na smanjenje broja sastojaka već na izbjegavanje uporabe najčešćih alergena kao što je mješavina parfema koja je 2. najčešći alergen (43).

Priprema uzoraka za analizu pokazala se razmjerno jednostavnom i dostatnom za identifikaciju ispitivanih spojeva. Korištenjem različitih organskih otapala za ekstrakciju uzorka br. 1 radi usporedbe rezultata dobivenog GC-MS metodom, blaga prednost dana je smjesi otapala kloroform:etilacetat:N-heksan (1:1:1).

Uz učestalost nepoželjnih sastojaka koja je ispitana u ovome istraživanju postoji potreba za provođenjem kvantitativnih analiza jer sama identifikacija nije dostatna kako bi se ustvrdili štetni učinci. Također, potrebne su kontrolirane studije koje bi utvrdile dugotrajan učinak ovih tvari zbog moguće akumulacije u tijelu kada su primijenjene u malim koncentracijama tijekom učestale i dugotrajne primjene.

Iako su za potpuno znanje o učincima ovih nepoželjnih sastojaka potrebne detaljne, kontrolirane kliničke studije u ljudskoj populaciji sam potencijal izazivanja nepoželjnih učinaka je bitan obzirom da je moguć zajednički sinergistički učinak. Ovo je posebno izraženo u pedijatrijskoj populaciji zbog veće izloženosti ovim tvarima kroz uporabu više različitih kozmetičkih proizvoda te izloženost iz drugih izvora (hrana, igračke). Uz to, djeca, za razliku od odraslih osoba, imaju veću površinu tijela u odnosu na masu tijela i veću propusnost kože zbog čega je moguća apsorpcija većih koncentracija nepoželjnih tvari. Također, metabolizam egzogenih tvari u djece je još u razvoju pa je moguće i duže djelovanje i akumulacija nepoželjnih tvari. Sve ovo doprinosi važnosti sastava kozmetičkih proizvoda koji se koriste za njegu kože djece.

6. ZAKLJUČCI

1. Kvalitativnom analizom 10 uzoraka krema namijenjenih njezi kože djece, u 80% uzoraka detektirano je prisustvo barem jednog od traženih nepoželjnih sastojaka: ftalati, parabeni, fenoksietanol, BHA i BHT, lanolin i tvari prisutne u mješavini parfema koja se koristi u testu kontaktnim načinom. Dva uzorka u kojima nije detektirano prisustvo niti jednog nepoželjnog sastojka pripadaju skupini proizvoda višeg cjenovnog ranga.
2. U četiri uzorka utvrđeno je odstupanje od deklaracije (na ambalaži proizvoda nisu navedeni dietil ftalat i BHT koji su u uzorcima detektirani). Svi uzorci za koje je utvrđeno odstupanje od deklaracije pripadaju skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga. U skupini višeg cjenovnog ranga nije bilo odstupanja od deklaracije.
3. Obzirom na detekciju nepoželjnih sastojaka i u skupini proizvoda višeg cjenovnog ranga pretpostavka o niskoj cijeni proizvoda pozitivnih na nepoželjne sastojke nije potvrđena.
4. Potrebno je provođenje detaljnijih ispitivanja koja bi omogućila detektiranje iznimno niskih koncentracija nepoželjnih i nedeklariranih sastojaka
5. Potrebno je provođenje detaljnijih ispitivanja učinaka nepoželjnih sastojaka pri učestalijoj i dugotrajnoj izloženosti niskim koncentracijama.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

- 1 Giusti F, Martella A, Bertoni L, Seidenari S. Skin Barrier, Hydration, and pH of the Skin of Infants Under 2 Years of Age. *Pediatr Dermatol*. 2001;18(2):93-6.
- 2 Fernandes JD, Machado MC, Oliveira ZN. Children and newborn skin care and prevention. *An Bras Dermatol*. 2011;86(1):102-10.
- 3 Lehtimäki J, Karkman A, Laatikainen T, Paalanen L, von Hertzen L, Haahtela T, et al. Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments. *Sci Rep*. 2017;7:45651.
- 4 Trivedi A, Suri V. Rashes in children. *Pharm J*. 2017;7092(298).
- 5 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology [Internet]. Eczema (Atopic Dermatitis) Overview [cited 2018 JUNE 27]. Available from: <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/library/allergy-library/eczema-atopic-dermatitis>
- 6 Eucerin [Internet]. Seborrheic Dermatitis [cited 2018 JUNE 27]. Available from: <https://select.eucerin.com/about-skin/indications/seborrheic-dermatitis>
- 7 Blume-Peytavi U, Hauser M, Lünemann L, Stamatas GN, Kottner J, Garcia Bartels N. Prevention of diaper dermatitis in infants--a literature review. *Pediatr Dermatol*. 2014;31(4):413-29.
- 8 Weidinger S, Beck LA, Bieber T, Kabashima K, Irvine AD. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):1.
- 9 Borda LJ, Perper M, Keri JE. Treatment of seborrheic dermatitis: a comprehensive review. *J Dermatolog Treat*. 2018:1-12. [Epub ahead of print]
- 10 Parlett LE, Calafat AM, Swan SH. Women's exposure to phthalates in relation to use of personal care products. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2013;23(2):197-206.
- 11 Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Bishop AM, Needham LL. Urinary Concentrations of Four Parabens in the U.S. Population: NHANES 2005–2006. *Environ Health Perspect*. 2010;118(5):679-85.
- 12 Harley KG, Kogut K, Madrigal DS, Cardenas M, Vera IA, Meza-Alfaro G, et al. Reducing Phthalate, Paraben, and Phenol Exposure from Personal Care Products in Adolescent Girls:

Findings from the HERMOSA Intervention Study. *Environ Health Perspect.* 2016;124(10):1600-1607.

13 Braun JM, Just AC, Williams PL, Smith KW, Calafat AM, Hauser R. Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2014;24(5):459-66.

14 Rycroft RJG, Menne T, Frosh PJ, Lepoittevin JP. Textbook of contact dermatitis. 3rd ed. p.619-622, 630-631, 675.

15 Bledzka D, Gromadzinska J, Wasowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int.* 2014;67:27-42.

16 Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi [Internet]. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje (NN 125/2009) [cited 2018 JUNE 29]. Available from: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3093.html

17 Cashman AL, Warshaw EM. Parabens: A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties. *Dermatitis.* 2005;16(2):57-66.

18 Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshinl S, Matsukuma S, Tsuji T. 2007. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol.* 2007;27:1–9.

19 Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol.* 2007;41:5564-5570

20 Sandanger TM, Huber S, Moe MK, Braathen T, Leknes H, Lund E. Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2011;21(6):595-600.

21 Guo Y, Kannan K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 2013;47(24):14442-9.

22 Oh SY, Fujii M, Takeda Y, Yoda K, Utogochi M, Matsumoto M, Waranabe Y. The effect of ethanol on the simultaneous transport and metabolism of methyl p-hydroxybenzoate in excised skin of Yucatan micropig. *Int J Pharm.* 2002;236:35–42.

- 23 Službeni list Europske unije [Internet]. UREDBA KOMISIJE (EU) br. 1004/2014 od 18. rujna 2014. o izmjeni Priloga V. Uredbi (EZ) br. 1223/2009 Europskog parlamenta i Vijeća o kozmetičkim proizvodima [cited 2018 JUNE 29]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R1004&from=HR>
- 24 Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology*. 2006;227(1-2):62-72.
- 25 Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004;24(1):5-13.
- 26 Kirchhof MG, de Gannes GC. The health controversis of parabens. *Skin Therapy Lett*. 2013;18(2):5-7
- 27 Moreno M. Phthalate Exposure and Health Risks. *JAMA Pediatr*. 2014;168(1):96.
- 28 U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry [Internet]. Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate [cited 2018 JULY 2]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>
- 29 Albro PW, Thomas RO. Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by Lipases. *Biochim Biophys Acta*. 1973;360:380–390.
- 30 Hrvatska agencija za hranu [Internet]. Znanstveno mišljenje o prisutnosti ftalata u hrani [cited 2018 JULY 2]. Available from: https://hah.hr/upisnik_z_m.php?preuzmi_misljenje=41
- 31 Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(7):899-911.
- 32 Grindler NM, Vanderlinden L, Karthikraj R, Kannan K, Teal S, Polotsky AJ, et al. Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. *Sci Rep*. 2018;8(1):6086.
- 33 Harley KG, Berger K, Rauch S, Kogut K, Claus Henn B, Calafat AM, et al. Association of prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and childhood BMI and obesity. *Pediatr Res*. 2017;82(3):405-415.

- 34 Yaghjyan L, Sites S, Ruan Y, Chang SH. Associations of urinary phthalates with body mass index, waist circumference and serum lipids among females: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(6):994-1000.
- 35 Wolff MS¹, Teitelbaum SL, Pinney SM, Windham G, Liao L, Biro F, et al. Investigation of relationships between urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols and pubertal stages in girls. *Environ Health Perspect*. 2010;118(7):1039-46.
- 36 Colón I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect*. 2000;108(9):895-900.
- 37 Andra SS, Makris KC. Thyroid disrupting chemicals in plastic additives and thyroid health. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2012;30(2):107-51.
- 38 Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B. Genotoxicity of phthalates. *Toxicol Mech Methods*. 2014;24(9):616-26.
- 39 Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(6):411-21.
- 40 Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, et al. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health Perspect*. 2004;112(14):1393-7.
- 41 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology [Internet]. Contact Dermatitis Overview [cited 2018 JUNE 27]. Available from: <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/library/allergy-library/contact-dermatitis>
- 42 Food, Skin Allergies Have Increased in US Children. *JAMA*. 2013;309(22):2319.
- 43 Rodrigues DF, Goulart EM. Patch-test results in children and adolescents: systematic review of a 15-year period. *An Bras Dermatol*. 2016;91(1):64-72.
- 44 Garg T, Rath G, Goyal AK. Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery. *Drug Deliv*. 2015;22(8):969-987.

- 45 Thiele JJ, Ekanayake-Mudiyanselage S. Vitamin E in human skin: organ-specific physiology and considerations for its use in dermatology. *Mol Aspects Med.* 2007;28(5-6):646-67.
- 46 U.S. Department of Health and Human Services [Internet]. Report on Carcinogens, Fourteenth Edition, Butylated Hydroxyanisole [cited 2018 JULY 5]. Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/butylatedhydroxyanisole.pdf>
- 47 International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations[Internet]. Butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) [cited 2018 JULY 5]. Available from: <http://www.inchem.org/pages/iarc.html>
- 48 Kang HG, Jeong SH, Cho JH, Kim DG, Park JM, Cho MH. Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. *Toxicology.* 2005;213(1-2):147-56.
- 49 Beene KM, Scheman A, Severson D, Reeder MJ. Prevalence of Preservatives Across All Product Types in the Contact Allergen Management Program. *Dermatitis.* 2017;28(1):81-87.
- 50 Bohn S, Bircher AJ. Phenoxyethanol-induced urticaria. *Allergy.* 2001;56(9):922-3.
- 51 Chasset F, Soria A, Moguelet P, Mathian A, Auger Y, Francès C, et al. Contact dermatitis due to ultrasound gel: A case report and published work review. *J Dermatol.* 2016;43(3):318-20.
- 52 Béranger R, Garlantézec R, Le Maner-Idrissi G, Lacroix A, Rouget F, Trowbridge J, et al. Prenatal Exposure to Glycol Ethers and Neurocognitive Abilities in 6-Year-Old Children: The PELAGIE Cohort Study. *Environ Health Perspect.* 2017;125(4):684-690.
- 53 Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Lilienblum, W., Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*(2016), doi: 10.1016/j.yrtph.2016.11.007.
- 54 Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics.* 2005;115(2 Suppl):519-617.

- 55 Purnamawati S, Indrastuti N, Danarti R, Saefudin T. The Role of Moisturizers in Addressing Various Kinds of Dermatitis: A Review. *Clin Med Res*. 2017;15(3-4):75-87.
- 56 Czarnowicki T, Malajian D, Khattri S, Correa da Rosa J, Dutt R, Finney R, et al. Petrolatum: Barrier repair and antimicrobial responses underlying this "inert" moisturizer. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1091-1102.e7.
- 57 Zampieri N, Zuin V, Burro R, Ottolenghi A, Camoglio FS. A prospective study in children: Pre- and post-surgery use of vitamin E in surgical incisions. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(9):1474-8.
- 58 Maarouf M, Vaughn AR, Shi VY. Topical micronutrients in atopic dermatitis-An evidence-based review. *Dermatol Ther*. 2018;e12659.
- 59 Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3(6):427-33.
- 60 Sutlović D et al. Osnove forenzične toksikologije: Analiza bioloških uzoraka. Split: Redak; 2011.
- 61 Wikimedia Commons [Internet]. File:Gas chromatograph.png [cited 2018 JULY 23]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph.png
- 62 Vlašić H. Dokazivanje THC-a u medicinskim pripravcima i u biološkim uzorcima. Diplomski rad. Split: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu; 2017.
- 63 Leksikografski zavod Miroslav Krleža [Internet]. Masena spektrometrija [cited 2018 JULY 23]. Available from: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=39268>
- 64 Sutlović D et al. Osnove forenzične toksikologije: Testiranje uzorka dlake. Split: Redak; 2011.
- 65 Shimadzu [Internet]. GCMS-QP2010 SE [cited 2018 OCT 14]. Available from: <https://www.shimadzu.com/an/gcms/qp2010se.html>
- 66 Daisy Rivas [Internet]. Adult skin vs. Baby skin [cited 2018 SEP 19]. Available from: <https://www.pinterest.com/pin/345299496401269798/>

8. SAŽETAK

NASLOV RADA:

Kvalitativna analiza dječjih krema i pripravaka primjenom GC-MS metode

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Kvalitativna analiza kozmetičkih proizvoda za njegu dječje kože primjenom GC-MS metode, usporedba dobivenih rezultata s podacima navedenim na deklaraciji proizvoda te pronalazak moguće poveznice između cijene proizvoda i prisustva određenih nepoželjnih sastojaka.

USTROJ ISTRAŽIVANJA:

Eksperimentalna studija

MJESTO ISTRAŽIVANJA:

Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

MATERIJALI I METODE:

Ispitano je 10 uzoraka dječjih krema širokog cjenovnog raspona (11,98 kn - 255,93 kn na 100 mL). Uzorci su raspoređeni u dva cjenovna ranga obzirom na vrijednost medijana raspona cijena: 5 proizvoda čija je cijena niža od 47,66 kn/100 mL i 5 proizvoda čija je cijena viša od 47,66 kn/100 mL. Za analitičku pripremu uzoraka 0,1g uzorka nanesen je na staklene Petrijeve zdjelice. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala kloroforma, etilacetata i N-heksana u jednakom omjeru ($v/v/v = 1:1:1$). Nakon otapanja uzorci su preneseni u staklene tubice za GC-MS analizu. Za usporedbu učinka otapala na ekstrakciju, uzorak br. 1 dodatno je otopljen u samom kloroformu. Za kvalitativnu analizu korištena je GC-MS metoda koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 - 700 m/z.

REZULTATI:

Nepoželjni sastojci ispitivani u ovom istraživanju su ftalati, parabeni, fenoksietanol, BHA i BHT, lanolin i tvari prisutne u mješavini parfema koja se koristi u testu kontaktnim načinom. Poželjni sastojci koji su ispitivani su kolesterol, cink oksid, vitamin E, vazelin i dekspantenol.

Od deset ispitanih uzoraka u 80% uzoraka detektiran je barem jedan od traženih nepoželjnih sastojaka dječjih krema, pri čemu u pet proizvoda koji pripadaju skupini nižeg cjenovnog ranga te tri proizvoda koji pripadaju skupini višeg cjenovnog ranga. Dva uzorka u kojima nije detektirano prisustvo nepoželjnih sastojaka pripadaju skupini uzoraka višeg cjenovnog ranga. U 4 uzorka detektirano je prisustvo jednog, a u 2 uzorka prisustvo dva nepoželjna sastojka. Prisustvo tri nepoželjna sastojka detektirano je u 1 uzorku. Parabeni su jedini nepoželjni sastojak koji nije detektiran niti u jednom uzorku. Odstupanje od deklaracije za ove detektirane nepoželjne sastojke zabilježeno je za dietil ftalat i BHT, i to samo u skupini proizvoda nižeg cjenovnog ranga.

U 90% analiziranih uzoraka detektiran je barem jedan od traženih poželjnih sastojaka kozmetičkih proizvoda.

Usporedbom različitih linija proizvoda istoga proizvođača (osnovna linija za svakodnevnu njegu kože djece i posebna linija za njegu kože djece sklone alergijskim reakcijama) utvrđeno je da uzorci koji su dio osnovne linije imali manji broj i odziv pikova na ukupnom ionskom kromatogramu u odnosu na uzorke istog proizvođača koji su dio posebne linije. Pri tome u proizvodima posebne linije nije detektirano prisustvo parfema koje je detektirano u proizvodima osnovne linije.

Usporedbom ukupnih ionskih kromatograma uzorka br. 1 pripremljenog na dva načina prednost je dana smjesi otapala kloroform:etilacetat:N-heksan (1:1:1) zbog većih odziva pikova u odnosu na uzorak otopljen u kloroformu.

ZAKLJUČAK:

Usporedbom cijene proizvoda u kojima su detektirani nepoželjni sastojci nisu dobiveni nedvojbeni rezultati. Ipak, utvrđena je povezanost cijene proizvoda i podudaranja detektiranih sastojaka s deklaracijom na ambalaži, pri čemu su odstupanja prisutna samo u skupini nižeg cjenovnog ranga. Potrebno je provođenje detaljnijih ispitivanja koja bi omogućila detektiranje iznimno niskih koncentracija nepoželjnih i nedeklariranih sastojaka.

9. SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE:

Qualitative analysis of baby creams and preparations using GC-MS method.

OBJECTIVES:

Qualitative determination of ingredients in children skincare products using the GC-MS method, comparison of the obtained results with the data stated on the product declaration and finding a possible correlation between the price of the product and the presence of certain undesirable ingredients.

DESIGN:

Experimental study.

SETTINGS:

Laboratory of toxicology, Department of pathology, medicine and cytology, University Hospital of Split.

MATERIALS AND METHODS:

In this study, ten samples of baby skin care products were analyzed. Samples were divided into two price ranges with regard to the value of the median of price range: 5 products whose price is lower than 47.66 kn / 100 mL and 5 products whose price is greater than 47.66 kn / 100 mL. In preparation for analysis, 0.1g of the sample was applied to Petri Dishes. Samples were extracted with a mixture of organic solvents: chloroform, ethyl acetate and N-hexane (v / v / v = 1: 1: 1). After dissolution, samples were transferred to a glass cuvettes for qualitative analysis by GC-MS method (gass chromatography-mass spectrometry). In order to compare the results of different solvents, sample number 1 was dissolved in chloroform as well. Analysis was performed by a method that simultaneously records the total ion chromatogram (TIC) in the area of 40 - 700 m/z.

RESULTS:

Undesirable ingredients investigated in this study are phthalates, parabens, phenoxyethanol, BHA and BHT, lanolin and substances present in a perfume mix used in the patch test. Preferred ingredients investigated are cholesterol, zinc oxide, vitamin E, vaseline and dexpanthenol.

Of the ten tested samples, in 80% of samples at least one of the tested undesirable ingredients of baby creams was detected, with five products belonging to the lower price range group and three products belonging to the higher price range group. Two samples in which the presence of undesirable ingredients was not detected belong to the higher price range group. In 4 samples, the presence of one, and in 2 samples, the presence of two undesirable constituents was detected. The presence of three undesirable components was detected in 1 sample. Parabens are the only undesirable ingredient that is not detected in either sample. The deviation from the declaration for these detected undesirable substances was recorded for diethyl phthalate and BHT, only in the lower price range product group.

In 90% of the analyzed samples, at least one of the desirable ingredients of cosmetic products was detected.

By comparing the different product lines of the same manufacturer (the basic line for daily skin care of children and the special line for skin care of children prone to allergic reactions) it was found that the samples that were part of the basic line had a smaller number and response of the peaks on the total ion chromatogram in comparison to the samples of the same manufacturer which are part of a special line. However, in the products of the special line the presence of perfumes, which was detected in the products of the basic line, was not detected.

By comparing the total ion chromatograms of sample number 1 prepared in two ways, a mixture of chloroform: ethyl acetate: N-hexane (1: 1: 1) was preferred because of higher peak responses in comparison to the sample dissolved in chloroform.

CONCLUSION:

In this study, correlation between price of the product and presence of undesirable ingredients was not conclusive. However, the correlation between the price of the product and deviations from the declaration on the packaging is established, with deviations only present in the lower price range group. More thorough studies are required to detect extremely low concentrations of undesirable and undeclared ingredients.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivana Vranješ

Datum rođenja: 17.06.1994.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Ulica Petra Krešimira IV 58 A, 21210 Solin

Obrazovanje: - ožujak 2018. – rujan 2018.

Stručno osposobljavanje u ljekarničkoj jedinici SDŽ „Solin“

- listopad 2013.–danas

Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet, studij
Farmacija

Šoltanska 2, 21000 Split (Hrvatska)

- rujan 2009.–svibanj 2013.

IV. gimnazija Marko Marulić

Zagrebačka 2, 21000 Split (Hrvatska)

▪program opće gimnazije

▪položena državna matura:Hrvatski jezik (A razina), Engleski jezik (A razina), Matematika (A razina), Biologija, Kemija

Školski uspjesi: - Dekanova nagrada Medicinskog fakulteta Split za akademsku godinu 2016./2017.