Određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima primjenom GC-MS metode

Tegeltija, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:711134

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Anamarija Tegeltija

ODREĐIVANJE PARABENA U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA PRIMJENOM GC-MS METODE

Diplomski rad

Akademska godina 2015./2016.

Mentorica:
prof. dr. sc. Davorka Sutlović, dipl. ing.
Komentorica:
dr. sc. Maja Veršić-Bratinčević, dipl. ing.

Split, listopad 2016. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Anamarija Tegeltija

ODREĐIVANJE PARABENA U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA PRIMJENOM GC-MS METODE

Diplomski rad

Akademska godina 2015./2016.

Mentorica:
prof. dr. sc. Davorka Sutlović, dipl. ing.
Komentorica:
dr. sc. Maja Veršić-Bratinčević, dipl. ing.

Split, listopad 2016. 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:
Tema rada je prihvaćena na 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
Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Veršić-Bratinčević

ODREĐIVANJE PARABENA U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA PRIMJENOM GC-MS METODE

Anamarija Tegeltija, broj indeksa: 7

Sažetak:
Ciljevi istraživanja: Kvalitativno određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima primjenom GC-MS metode te usporedba dobivenih rezultata s podatcima deklariranim na proizvodu. Pronaći poveznicu između cijene i prisustva parabena u kozmetičkom proizvodu.

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: Odabrano je 25 kozmetičkih proizvoda za primjenu u pazužnom području, od toga 15 sprejeva s potisnim plinom, 5 roll-onova i 4 sticka. Od kozmetičkog proizvoda broj 5 dobivena su 2 uzorka: uzorak 5 istovjetnog načina pripreme kao i ostali uzorci te uzorak 5(2) koji je dodatno maceriran na magnetskoj miješalici. Sprejevi prethodno naneseni na Petrijevu zdjelicu, ostavljeni su na isparavanje u digestoru te su tako pripremljeni i otpareni otopljeni u kloroformu. Potom je uslijedila filtracija. Naposljetku, pripremljeni su uzorci prebačeni u staklene tubice za kvalitativnu analizu na GC-MS uređaju. Analiza je izvršena metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 – 600 m/z.

Rezultati: Parabeni su detektirani u dvama uzorcima: br. 1 i 4. U uzorku br. 1 pronađeni su: metilparaben, etilparaben, propilparaben i butilparaben od kojih etilparaben nije deklariran. U uzorku br. 4 pronađen je metilparaben koji je u skladu s navedenom deklaracijom. U uzorcima br. 1, 9, 17, 22, 24 pronađen je dietilftalat koji nije deklariran ni na jednom od ovih 5 uzoraka. U uzorku br. 5 nisu pronađeni parabeni (ni ftalati) nakon maceracije. Uvedeni su medijani cijena (Microsoft Excel) cjelokupne skupine proizvoda (14,66 kn), sprejeva (14,35 kn) i roll-onova (43,98 kn). Uzimajući u obzir zbrojni medijan od 14, 66 kn, 50 % proizvoda pozitivnih na parabene i ftalate nalazi se iznad, a 50 % ispod medijana. Kod medijana koji vrijedi za roll-onove oba proizvoda (100 %) pripadaju nižem cjenovnom rangu (ispod medijana). Cijene uzoraka u kojima su identificirani ftalati u iznosu od 60 % pripadaju skupini ispod medijana, odnosno 75 % ne uračunavši uzorak br. 1 zbog karakterističnog odstupanja cijene roll-ona od dezodoransa u spreju.

Zaključak: Kozmetički proizvodi koji sadrže parabene u većini se slučajeva podudaraju s navedenom deklaracijom dok ftalati u potpunosti odstupaju. Prema tome, potrebne su strože kontrole utjecaja ambalaže na proizvode niže cjenovne kategorije kod preparata za osobnu njegu. Kod analize proizvoda u kojima su identificirani parabeni i ftalati, usporedbom s njihovom cijenom, nisu dobiveni nedvojbeni rezultati, stoga je potrebno provesti detaljnije studije.

Ključne riječi: parabeni, kozmetički proizvodi, GC-MS metoda

Rad sadrži: 57 stranica, 26 slika, 4 tablice, 0 priloga, 36 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1.	doc. dr. sc. Ivana Mudnić	predsjednica Povjerenstva
2.	doc. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić	član
3.	prof. dr. sc. Davorka Sutlović	član-mentor

Datum obrane: (28. listopada 2016.)

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:
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. and Faculty Council of School of Medicine, session no.
Mentor: Davorka Sutlović. PhD, full prof.
Technical assistence: Maja Veršić-Bratinčević, PhD

DETERMINATION OF PARABENS IN COSMETIC PRODUCTS USING GC-MS METHOD

Anamarija Tegeltija, index number: 7

Summary:
Objectives: Qualitative determination of parabens in cosmetic products using GC-MS method as well as the comparison of the results with those declared on the products. In addition, another objective was to find a correlation between the price range below the median value and paraben presence in cosmetic products.

Design: Experimental study

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

Materials and methods: In this study 25 underarm cosmetics were chosen, more precisely 15 sprays, 5 roll-ons and 4 sticks. The cosmetic product number 5 was prepared as 2 samples: number 5 was prepared identically to the procedure described, while the 5(2) sample was additionally stirred. Sprays, previously applied to Petri Dishes, were left to volatilize in the digester. Then, all of the 26 samples were prepared by dissolving them with chloroform, and followed by filtration. Finally, the samples were transferred to glass cuvettes for the qualitative analysis using GC-MS method. Analysis was performed by a method that simultaneously records the total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m/z.

Results: Parabens were detected in two samples: number 1 and 4. In sample number 1 methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben and butyl paraben were identified from which ethyl paraben was not printed on the declaration label. In samples number 1, 9, 17, 22 and 24 diethyl phthalate was determined but was not declared anywhere. Sample number 5 was free from parabens before and after it was stirred. The 3 price medians were calculated (Microsoft Excel): for the entire personal care products' group (14.66), only for the sprays (14.35) and roll-ons (43.98). Taking into consideration the 14.66 median, 50 % of the paraben- and phthalate- positive products are above and 50 % below the median. Taking just roll-ons into account, both products (100 %) were classified as the lower price range group. 60 % of the phthalate-positive samples are below price median, or 75 % excluding sample number 1 because of the characteristic price difference between a deodorant and a roll-on.

Conclusion: Cosmetic products identified with parabens were mostly in accordance with the declaration label. On the other hand, opposite results were obtained with phthalates. A more reliable control system of packaging influence on the product itself is highly suggested (especially in the lower price range). The results of the correlation between the prices of the products where parabens and phthalates have been identified are ambiguous, hence more thorough statistical analysis and studies are required.

Key words: parabens, cosmetic products, GC-MS method

Thesis contains: **57** pages, 26 figures, 4 tables, 0 supplements, 36 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivana Mudnić – PhD, assistant prof. — chair person
2. Vedrana Čikeš Čulić – PhD, assistant prof. — member
3. Davorka Sutlović – PhD, full prof. — supervisor

Defence date: (October 28, 2016.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed 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. Fizikalno-kemijske karakteristike parabena 5

1.2. Farmakokinetika parabena 6

1.3. Farmakodinamika parabena 7

1.4. Posljedice korištenja parabena 9

1.4.1. Rak dojke 10

1.5. Zakonska regulativa 11

1.6. Instrumentalne tehnike za određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima 12

1.6.1. Plinska kromatografija 13

1.6.2. Masena spektrometrija 14

1.6.3. Vezana tehnika plinska kromatografija-masena spektrometrija 15

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 17

3. MATERIJALI I METODE 19

3.1. Materijali 20

3.2. Postupak pripreme uzorka za analizu 21

3.3. Instrumentalna analiza 23

3.3.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske metode 23

4. REZULTATI 24

4.1. Kvalitativna identifikacija parabena 26

4.2. Kvalitativna identifikacija ftalata 30

4.3. Kontrola deklaracije sastava 33

4.5. Usporedba rezultata u nemaceriranom i maceriranom uzorku istog proizvoda 34

4.6. Usporedba različitih oblika proizvoda istog proizvođača 35

4.7. Usporedba dobivenih rezultata i cijene uzoraka u kojima su identificirani parabeni i ftalati (obrada podataka) 37

5. RASPRAVA **39**

6. ZAKLJUČCI **44**

7. POPIS CITIRANE LITERATURE **46**

8. SAŽETAK **50**

9. SUMMARY **53**

10. ŽIVOTOPIS **56**

ZAHVALA

Riječi su žilav i snažan korijen razorne moći njihovih vještih manipulatora, a neosvojiva i kamenita utvrda izmanipuliranima riječju. Međutim, postoje trenutci u kojima smo svi jednaki, a to su oni u kojima obje vrste ostaju bez riječi. Za te grandiozne trenutke vrijedi živjeti. Ovo je jedan od tih trenutaka.

Hvala mojoj mentorici profesorici dr.sc. Davorki Sutlović i komentorici dr.sc. Maji Veršić-Bratinčević što su mi svojom pristupačnošću, strpljenjem, povjerenjem i stručnim vodstvom omogućile da ostanem bez riječi.

Hvala svakom onom profesoru iz davnina učeničkih dana čiji plamen ideala tako sigurno tinja još duboko u meni.

Hvala istinskim prijateljima koji u tako surovom današnjem svijetu nikada nisu htjeli oskvrnuti moje ideale, već me nazivaju prijateljicom zbog njih.

I naposljetku, hvala njoj, onoj posebnoj, onoj koja je iznad svih. Znate, kao što Samson ima kosu, Kranjčević Mojsija, tako i ja imam svoju majku... Pa neka ovi stihovi ispričaju sve ono čemu me ona naučila i na čemu joj se divim:

„I tebi baš, što goriš plamenom
Od ideala silnih, vječitih,
Ta sjajna vatra crna bit će smrt,
Mrijeti ti ćeš, kada počneš sam
U ideale svoje sumnjati.“ *S. S. Kranjčević: „Mojsije“*

1. UVOD

Parabeni se u prirodi nalaze u plodovima raznih biljaka, ali i mesu biljojeda kao i slini nekih kukaca, a karakteriziraju ih antifungalna i antimikrobna svojstva (1). Većinom su to ipak sintetičke kemikalije široke potrošnje koje se koriste kao konzervansi u hrani, piću, lijekovima i kozmetičkim proizvodima, a o čijoj uporabi postoje podatci koji datiraju još iz 1920 godine (2). U ulozi konzerviranja hrane dobivaju sekundarnu važnost naspram primjene u preparatima za osobnu njegu iako je apsorpcija probavnim sustavom bolja od transdermalne (1).

Naime, potvrđena je uporaba parabena u više od 13 200 proizvoda u svim vrstama kozmetičkih preparata, a mogu se naći u: šamponima, kremama, pastama za brijanje i zube, antiperspiransima i dekorativnoj kozmetici. Prilikom testiranja 215 kozmetičkih proizvoda, dokazano je da 77 % preparata koji se ispiru i 99 % onih koji ostaju na koži sadrži parabene u koncentracijama od 0,01 do 0,87 % (3).

Svoju široku uporabu duguju niskoj cijeni, učinkovitosti, ali i sigurnosti, odnosno netoksičnosti, koja posljednjeg desetljeća postaje kontroverzna zbog mimetske karakteristike parabena na estrogenske receptore što se smatra ishodištem potencijalne teorije razvoja tumora dojke razmatrane u daljnjem tekstu (3). Poznato je da se istim mehanizmom djelovanja odlikuju i ftalati, omekšivači i plastifikatori ambalaže (4), zbog čega je teško promatrati odvojeno djelovanje parabena i ftalata.

Parabeni predstavljaju sintetičke spojeve koji nastaju esterifikacijom p-hidroksibenzojeve kiseline s odgovarajućim alkoholom u prisutnosti katalizatora, kao što su koncentrirana sumporna ili p-toluensulfonska kiselina (2). Prema strukturi se klasificiraju kao alkilni esteri p-hidroksibenzojeve kiseline (PHBA) (5).

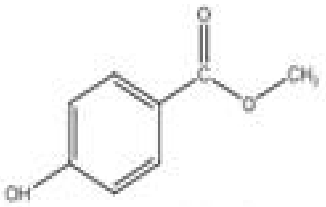
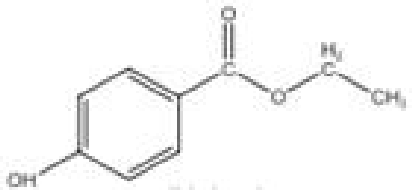
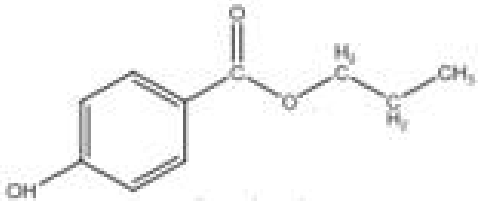
Navedeni supstituenti uvjetuju vrstu parabena (Tablica 1), stoga najčešće razlikujemo:

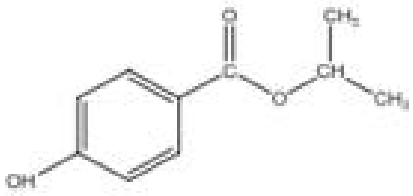
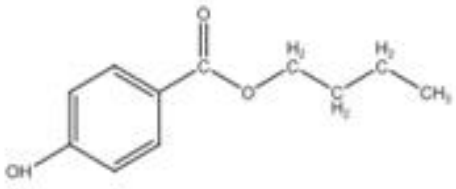
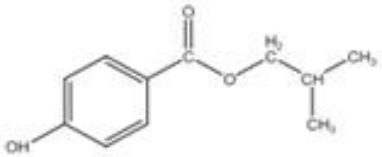
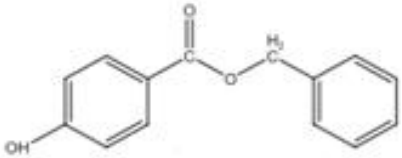
- **metilparaben**
- **etilparaben**
- **propilparaben**
- **butilparaben**
- **izopropilparaben, izobutilparaben, benzilparaben** (rjeđi)

Benzilparaben, za razliku od ostalih parabena, posjeduje arilni lanac u supstituentu, odnosno radi se o esteru benzilnog alkohola i PHBA-e.

Podatci o preostalim kemijskim imenima, strukturama i mogućim registriranim nazivima dani su u tablici 1 (5).

Tablica 1. Popis tehničkih i registriranih imena parabena (5, 6).

SPOJ I STRUKTURA	TEHNIČKA I KEMIJSKA IMENA	REGISTRIRANI NAZIVI
METILPARABEN 	Benzoic Acid, 4-Hydroxy-, Methyl Ester p-Carbomethoxyphenol 4-Hydroxybenzoic Acid, Methyl Ester p-Methoxycarbonylphenol Methyl-4-Hydroxybenzoate Methyl-p-hydroxybenzoate Methyl Parahydroxybenzoate Parahydroxybenzoate Ester	Aseptoform Botanistat MP CoSept M Jeen Methyl Paraben Methyl-4-Hydroxybenzoate Methylparaben NF Methylparaben NF-PC Methyl Parasept Nipagin M NS 3550 Paridol M S&M Methylparaben Solbrol M Unisept M
ETILPARABEN 	Benzoic Acid, 4-Hydroxy-, Ethyl Ester Ethyl p-hydroxy benzoate Ethyl 4-Hydroxybenzoate Ethyl p-Hydroxybenzoate Ethyl Parahydroxybenzoate 4-Hydroxybenzoic Acid, Ethyl Ester Parahydroxybenzoate Ester	CoSept E Ethyl-4-Hydroxybenzoate Ethyl Paraben NF Ethyl Paraben NF-PC Ethyl Parasept Nipagin A S&M Ethylparaben Solbrol A Unisept E
PROPILPARABEN 	Benzoic Acid, 4-Hydroxy-, Propyl Ester 4-Hydroxybenzoic Acid, Propyl Ester Parahydroxybenzoate Ester Propyl p-hydroxybenzoate Propyl p-Hydroxybenzoate Propyl Parahydroxybenzoate	Botanistat PP CoSept P Jeen Propyl Paraben Lexgard P Nipasol M Paridol P Propyl Aseptoform Propylparaben NF Propylparaben NF-PC Propyl Parasept Solbrol M S&M Methylparaben Unisept P

SPOJ I STRUKTURA	TEHNIČKA I KEMIJSKA IMENA	REGISTRIRANI NAZIVI
IZOPROPILPARABEN 	Benzoic Acid,4-Hydroxy-,1-Methylethyl Ester p-Hydroxybenzoic Acid, Isopropyl Ester 4-Hydroxybenzoic Acid, 1-Methylethyl Ester Isopropyl p-Hydroxybenzoate 1-Methylethyl-4-Hydroxybenzoate Parahydroxybenzoic Acid, Isopropyl Ester	
BUTILPARABEN 	Benzoic Acid, 4-Hydroxy-, Butyl Ester Butyl 4-Hydroxybenzoate Butyl p-Hydroxybenzoate Butyl p-hydroxy benzoate Butyl Parahydroxybenzoate Parahydroxybenzoate Ester	Butyl Paraben NF Butylparaben NF-PC Butyl Parasept CoSept B Lexgard B Butyl-4-Hydroxybrnzoate Nipabutyl Paridol B Unisept B
IZOBUTILPARABEN 	Benzoic Acid, 4-Hydroxy-, 2-Methylpropyl Ester 4-Hydroxybenzoic Acid, 2-Methylpropyl Ester Isobutyl p-Hydroxybenzoate Isobutyl Parahydroxybenzoate Parahydroxybenzoic Acid, Isobutyl Ester	
BENZILPARABEN 	Benzoic Acid, 4-Hydroxy-, Phenylmethyl Ester Benzyl p-Hydroxybenzoate Benzyl Parahydroxybenzoate 4-Hydroxybenzoic Acid, Benzyl Ester Phenylmethyl 4-Hydroxybenzoate	Nipabenzyl Unisept BZ

1.1. Fizikalno-kemijske karakteristike parabena

Parabeni formiraju male bezbojne kristale ili bijele kristalinične pudere bez okusa i mirisa. Higroskopni su i imaju visoki particijski koeficijent ulje/voda (5).

Predstavljaju spojeve koji pokazuju stabilnost pri kiselom pH, a pri lužnatom hidroliziraju na PHBA (p-hidroksibenzojevu kiselinu) i odgovarajući alkohol. Svojstva topljivosti parabena u vodi i mikrobiološka aktivnost u obrnuto su proporcionalnom odnosu. Naime, porastom duljine alkilnog lanca opada topljivost parabena u vodi, ali raste njihova mikrobiološka aktivnost. Butilparaben, primjerice, zbog duljine svog lanca, posjeduje 4 puta jači antimikrobni učinak naspram metilparabena. Međutim, u pravilu se dobro otapaju u organskim otapalima kao što su alkohol, aceton, eter, kloroform i propilenglikol. Spojevi parabena s klorom i bromom iz vodovodne vode stabilniji su od ishodnih spojeva, a reakcija je katalizirana povišenjem temperature. Stabilni su na zraku (2, 7).

Svojstva koja parabene čine primarnim kemijskim agensima prilikom odabira odgovarajućih konzervansa u proizvodima za osobnu njegu su:

- široki spektar antimikrobne aktivnosti (gljivice, lišajevi i bakterije)
- kemijska stabilnost u širokom rasponu pH vrijednosti (4,5-7,5)
- inertnost
- mala vjerojatnost sistemske intoksikacije
- mala učestalost senzitizacije
- prikladna topljivost u vodi
- relativno sigurna uporaba
- niska cijena proizvodnje
- bez okusa i mirisa
- ne uzrokuje promjene u konzistenciji ili boji proizvoda (2).

1.2. Farmakokinetika parabena

Mogući putevi apsorpcije parabena uključuju ingestiju, inhalaciju i transdermalni način aplikacije (8). Statistički je dokazano da je najučestaliji način primjene u razvijenim zemljama upravo transdermalni put, a procjenjuje se da dnevna količina unesenih parabena za odrasle iznosi 17,76 g, a kod djece 378 mg.

Klasični tipovi kozmetičkih formulacija u kojima se mogu naći parabeni uključuju U/V i V/U emulzije te hidrofilne gelove. U slučaju korištenja emulzija, dokazana je direktna proporcionalnost difuzije s topljivošću parabena u vodi dok za hidrogelove vrijedi upravo suprotno (Tablica 2) (9).

Tablica 2. Difuzija parabena iz različitih topikalnih formulacija u kojoj su prikazani iznosi normaliziranog toka parabena podijeljenog sa saturacijskom koncentracijom (5).

Formulacija	**Metil-**	**Etil-**	**Propil-**
Voda/ulje	6,96	6,74	2,16
Ulje/voda	9,74	2,80	0,74
Permulen® TR2	1,34	2,54	2,67
Carbopol® 940	7,9	16,94	18,44

Sposobnost penetriranja kroz *stratum corneum* u obrnuto je proporcionalnom odnosu s duljinom alkilnog lanca. Kožne karboksilesteraze vrše hidrolizu te se parabeni posljedično ne bi trebali akumulirati u tijelu. Tvrdnja se potkrjepljuje navodima o vrlo niskoj koncentraciji spojeva čak i nakon intravenske primjene (5).

Oprečne spoznaje donose Darbre i sur. studijom iz 2004. godine gdje je jasno ustanovljena povećana incidencija intaktnih estera akumuliranih u tkivu dojke (10). Nadalje, 1996. godine dokazana je pristunost 4 karboksilesteraze u supkutanom masnom tkivu. Jedan je tip B-karboksilesteraze pokazao najveći afinitet za metilparaben dok je drugi tip preferirao butilparaben kao supstrat. Istovjetna pojava uočena je i kod karboksilesteraze iz transformiranih keratinocita. Naime, hidrolitički potencijal raste s porastom duljine alkilnog lanca parabena. Budući da navedeni B-tipovi karboksilesteraza kataliziraju acilne reakcije transformacije, razmatra se i mogućnost haptenskog karaktera parabena što bi moglo ići u prilog teoriji razvoja kontaktnog alergijskog dermatitisa (11). Davne 1968. godine dokazan je

afinitet vezanja parabena za goveđi albumin, pri čemu je afinitet vezivanja proporcionalan duljini alkilnog lanca estera. Naime, tako vezani paraben lišen je svog primarnog antifungalnog svojstva (5).
Parabeni se većinom izlučuju mokraćom u formi glukuronida ili sulfata za poboljšanje svojstava topljivosti (8) dok se p-hidroksibenzojeva kiselina kao produkt razgradnje aminokiseline tirozina može naći u mokraći bez izloženosti parabenima (1).

1.3. Farmakodinamika parabena

Parabeni se, s farmakodinamičkog gledišta, smatraju kompetitivnim agonistima (mimeticima) estrogenskih receptora, a možemo ih pronaći i pod nazivom „slabi estrogeni“ zbog dokazano niskog afiniteta vezanja za estrogenski receptor (10).

Vrlo su visoke koncentracije parabena potrebne kako bi se stimulirala stanična proliferacija naspram potrebne koncentracije 17 β-estradiola, ali prilikom postizanja dovoljno visoke koncentracije parabena, s jednakom učinkovitošću mogu stimulirati stanični rast, dakle parabeni se smatraju punim agonistima (12).

Estrogeni potencijal raste s porastom duljine alkilnog lanca, stoga butilparaben ubrajamo u „najestrogeniji“ iz skupine (13). Daljnji estrogeni potencijal raste i grananjem alkilnog lanca (izobutilparaben) kao i dodatkom arilne skupine na metilparaben (benzilparaben) (14, 15).

Međutim, doze potrebne za aktivaciju estrogenskog receptora daleko nadilaze koncentraciju parabena koja se može pronaći u tijelu uporabom proizvoda za osobnu njegu (16). Primjerice, supkutana doza od 48 g potrebna za izazivanje minimalnog estrogenskog učinka odgovara količini od 50 kg jednokratno upotrijebljene kreme koja sadrži 0,2 % butilparabena (radi se o osobi od 60 kg), a nakon oralne primjene iste tvari (istraživanje na štakoru), nije dokazan nikakav estrogeni učinak (Slika 1) (17).

TVAR	POTENTNOST/SNAGA	PRIMJER
etinilestradiol (oralni kontraceptiv)	1.000.000	
kumestrol (djetelina)	10.000	
genistein (soja)	37	
butilparaben (konzervans)	0.5	
benzilparaben (konzervans)	0.1	

Slika 1. Razlika u estrogenskoj potentnosti među spojevima (korelacija s konjskim snagama) (17).

Parabeni mogu istisnuti antiestrogene kao što je tamoksifen s veznog mjesta na receptoru čime se dodatno utvrđuje farmakodinamički status kompetitivnog agonizma, ali tek u jako visokim koncetracijama (18).

Istraživanje Zhanga i sur. potvrđuje djelovanje parabena i na estrogen-vezani receptor γ (ERRγ). Naime, paraben se veže na vezno mjesto kao inverzni agonist, dakle mogao bi interferirati ponovno s djelovanjem tamoksifena čiji je pretpostavljeni mehanizam i vezivanje za ERRγ kao i za ERα (estrogenski receptor α) (19).

1.4. Posljedice korištenja parabena

Tijekom posljednjeg desetljeća uvriježena je pretpostavka o parabenima kao jednim od mogućih uzroka razvoja tumora dojke, a temelji se na njihovoj estrogenskoj aktivnosti ustanovljenoj 1998. godine (13) zbog čega ih nazivamo **ksenoestrogenima** (20). Ksenoestrogeni su sintetički spojevi koji oponašaju endogene estrogene vežući se i aktivirajući estrogenske receptore (21), ali i ometajući im normalni metabolizam (22). Trenutno postoji oko 160 ksenoestrogena povezanih s razvojem tumora dojke, a samo neki od njih su aluminijeve soli, već spomenuti ftalati, bisfenol A uz sveprisutne parabene (20).

Stimulacija estrogena i antagonistička aktivnost na androgene hormone mogu izazvati i negativne učinke na reprodukciju u muškaraca kao i činjenica da su metil i propilparaben potentni inhibitori mitohondrijalne funkcije što se smatra okosnicom teorije o muškoj neplodnosti (23).

Jedno od potencijalnih štetnih djelovanja predstavlja i fototoksičnost koja je ispitana izlaganjem ljudskih keratinocita UV zračenju čemu je prethodio dodatak metilparabena. Znanstvenici su zaključili da metilparaben nije imao utjecaja na povećanje nekrotičkih stanica, ali je povećao broj istih stanica nakon izlaganja UV svjetlu. Međutim, smatra se da je jakost UV svjetla korištena u spomenutom eksperimentu bila prejaka te da su parabeni pri normalnim svjetlosnim uvjetima sigurni. Također, potrebno je razmotriti uvjete višegodišnje izloženosti parabenima koja dovodi do njihove akumulacije u organizmu te mogućnosti razvoja melanoma (5).

Parabeni jako rijetko izazivaju simptome kontaktnog alergijskog dermatitisa naneseni na normalnu ljudsku kožu pri koncentracijama koje se standardno nalaze u kozmetičkim preparatima. Zanimljiva je pojava „parabenskog paradoksa“ u kojoj pacijenti koji inače normalno podnose dermalno aplicirane parabene, razviju kontaktni alergijski dermatitis prilikom nanošenja na ekcematoznu i oštećenu kožu. Nikakva alergijska reakcija nije zabilježena aplikacijom parabena na osjetljivu membranu očnog kapka (5).

Genotoksične su studije pokazale da su parabeni generalno nemutageni iako je dokazano da su metil i etilparaben povećali kromosomske aberacije u jajnim stanicama kineskog štakora (5).

1.4.1. Rak dojke

Učestalost tumora dojke u gornjem vanjskom kvadrantu, 60 %-tna, upućuje na vezu između uporabe ispodpazušnih kozmetičkih preparata i razvoja tumora dojke (6). Razlog tome može biti povećana koncentracija ciljnih epitelnih stanica u toj regiji što ipak ne uspijeva razjasniti nagli porast incidencije raka dojke u posljednjem desetljeću (24).

Dvije trećine tumora dojke pokazuju aktivnost na estrogenski receptor α (ERα), a 1998. zapažen je isti mehanizam i kod parabena (opisan u poglavlju 1.3. „Farmakodinamika parabena“) (13). Vezivanje za ERα uzrokuje aktivaciju onkogena c-Myc i cyclina D1 koji olakšavaju staničnu proliferaciju, odnosno ubrzavaju prelazak iz G1 u S fazu.

Proučavan je utjecaj parabena na MCF-7, humane tumorske stanice dojke. Sa sigurnošću je dokazan stimulatorni učinak parabena na proliferaciju MCF-7 stanica, kako nakon jednokratne tako i nakon opetovane primjene. Određene doze butilparabena pokazale su čak i jači učinak od 17β-estradiola (25).

S druge strane, objašnjenja dosadašnjih ispitivanja većinom se temelje na ispitivanju i dokazivanju estrogenske aktivnosti dok je studija iz 2013. postavila za cilj istraživanje pravih karcinogenih svojstava kao što je potencijal indukcije rasta MCF-10A stanica u doticaju s parabenima. Radi se o staničnoj liniji imortaliziranih, ali netransformiranih humanih epitelnih stanica dojke. Ispitivana je sposobnost parabena za induciranjem rasta MCF-10A stanica u neadherentim uvjetima. Zabilježen je iznimno mali, gotovo zanemarivi, porast broja i veličine spomenutih stanica u standardnoj polučvrstoj suspenzijskoj kulturi bez dodatka 17β-estradiola. Od ključne je važnosti spoznaja da je dodatak metil, propil i butilparabena doveo do većeg povećanja broja kolonija stanica nego kod 17β-estradiola, a porast prosječne veličine kolonija razmjeran je porastu uz dodatak 17β-estradiola *in vitro*.
Upravo se iz tih podataka izvode zaključci o mogućnosti transformacije nekancerogenih stanica s prediktorskim potencijalom tumorskog rasta *in vivo* (26).

Pan i sur. studijom su iz 2015.godine začeli ideju o potencijalnom porastu potentnosti parabena u doticaju s porodicom receptora epidermalnog staničnog rasta (HER).
BT-474 stanice eksprimiraju i ERα i HER2, stoga predstavljaju prikladni model za istraživanje interakcija između dvaju signalnih puteva. Rezultatima studije dokazano je sinergističko povećanje c-Myc mRNA i razine proteina u BT-474 tumorskim stanicama dojke u kojih je i uočena proliferacija u kombinaciji butilparabena i HER liganda. U prilog ovoj

spoznaji ide i činjenica da je antagonist estrogenskih receptora blokirao sinergističko povećanje razine c-Myc proteina (21).

1.5. Zakonska regulativa

Organizacija „FDA“ (engl. Food and Drug Administration) osigurava informacije o uporabi i dozvoljenoj količini parabena u kozmetičkim proizvodima, a ovdje su razmatrane zaključno s 2006.-om godinom. Tako postoje podatci o 8786 kozmetičkih proizvoda različitih kategorija u kojima je korišten metilparaben. Kod etilparabena uočen je značajni porast korištenja estera p-hidroksibenzojeve kiseline s 139 iz 1981. do 2679 različitih kozmetičkih proizvoda 2002. Isto vrijedi i za butilparaben (sa 704 na 3001 proizvod) dok je mali porast u uporabi zabilježen i kod propilparabena (5).

Europska direktiva 76/768/EC ograničila je uporabu metil, etil, propil i butilparabena kao konzervansa u kozmetičkim proizvodima na maksimalnu dopuštenu koncentraciju od 0,4 % za pojedinačni ester ili 0,8 % za smjesu. Metilparaben i etilparaben prema dosadašnjim se toksikološkim studijama smatraju zakonski sigurnima. Primjerice, kriteriji su se u Danskoj pokazali najstrožima jer je u potpunosti zabranjena uporaba propil i butilparabena u proizvodima za djecu ispod 3 godine dok je u Japanu dopuštena koncentracija pojedinačnog parabena 1 % (4).

1.6. Instrumentalne tehnike za određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima

„Kromatografija“ (grč. *chroma-boja, graphein-pisati*) označava veliki broj različitih analitičkih sustava i tehnika, ali ono što je svima zajedničko postojanje je stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Sastojci smjese se odjeljuju u ovisnosti o brzinama kojima ih plinovita ili tekuća mobilna faza nosi kroz kolonu stacionarne faze. Kromatografiju je izumio ruski botaničar Cvet, u prvoj polovici dvadesetog stoljeća, za odjeljivanje otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila (mobilne faze) prolazom kroz staklenu kolonu napunjenu sitnozrnatim kalcijevim (II) karbonatom (stacionarna faza).
Kromatografske se tehnike smatraju jednima od najmoćnijih i najsvestranijih metoda za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim matricama uzoraka (27).

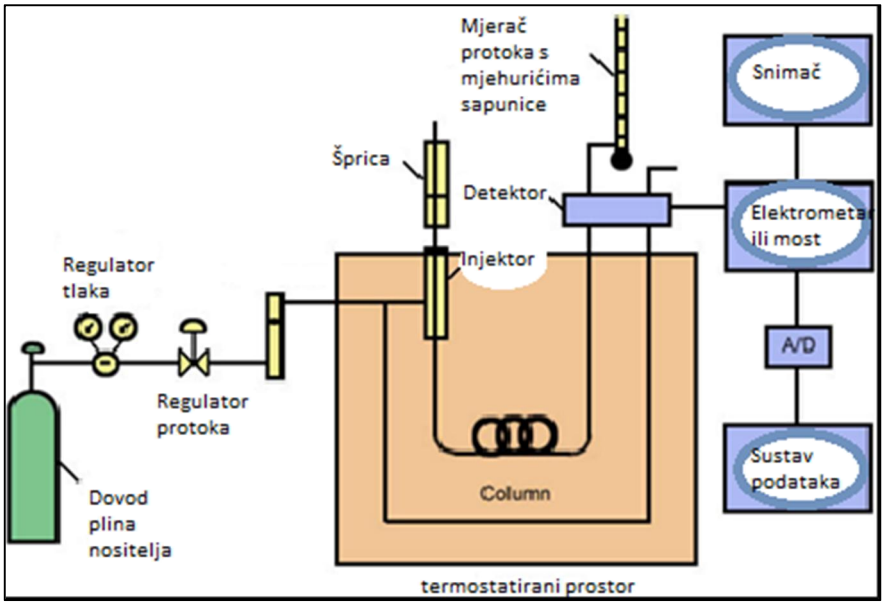
Razlikuju se dvije glavne vrste kromatografskih metoda:

- **kromatografija na stupcu**-stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije
- **plošna kromatografija**- stacionarna je faza nanesena na ravnu plohu ili u pore papira, a mobilna faza prolazi kroz stacionarnu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije.

1.6.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC) obuhvaća sve kromatografske metode u kojima je pokretna faza plin, a stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća. Uzorak koji se analizira potrebno je prevesti u plinovito stanje, te se uz pomoć mobilne faze plina komponente nose kroz stupac kromatografa (28).
Plinska se kromatografija primjenjuje za analizu plinovitih tvari ili lako hlapljivih tvari koje isparavaju na radnoj temperaturi kolone (do 300 °C), a da pritom ne dođe do njihove razgradnje. Budući da je veliki broj tvari koje zadovoljavaju ovaj kriterij, plinska se kromatografija nametnula kao standardna metoda analize u forenzičnim laboratorijima posljednja tri desetljeća (28).

Na slici 2 detaljno je prikazana shema plinskog kromatografa. Glavne sastavnice plinskog kromatografa su injektor, kromatografska kolona i detektor (29).



Slika 2. Shematski prikaz plinskog kromatografa (30).

Kao što je prikazano na slici 2, upareni se uzorak injektira na početak kolone te nošen plinom nosiocem prolazi kroz kolonu. Plin nosilac mora biti kemijski inertan, a najčešće se upotrebljavaju helij, dušik, argon, vodik ili ugljikov dioksid. Zbog različitih fizikalno-

kemijskih svojstava pojedinih sastojaka uzorka spojevi se razdvajaju i u različitom vremenu dolaze do detektora (28).

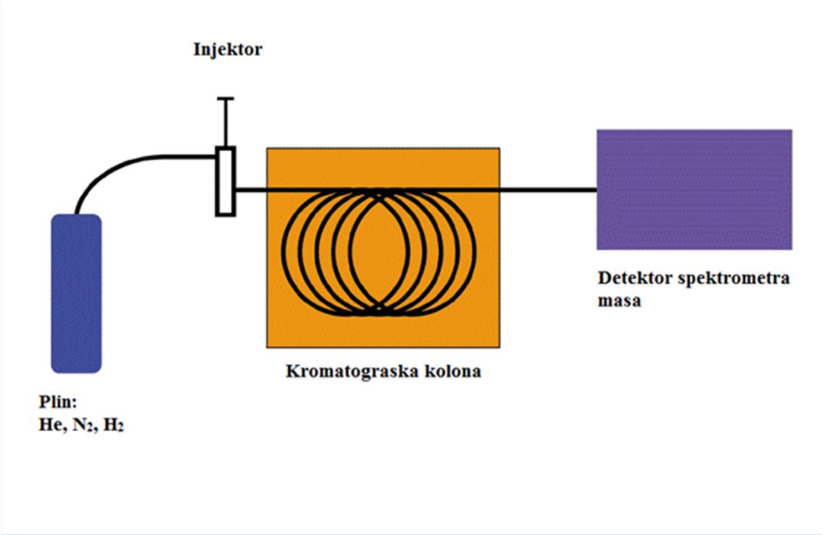
Osjetljivost detektora mjeri se odnosom visine pika-S (engl. *signal*) i visine bazne linije- N (engl. *noise)* i označava omjerom S/N. Svaki detektor ima određeno linearno radno područje u kojem je količina analita razmjerna signalu (30).

1.6.2. Masena spektrometrija

Spektrometrijom se masa mjere molekulske mase uzorka. Spektrometrija masa uključuje dva procesa, ionizaciju uzorka i razdvajanje te određivanje iona (31). Ovaj se analitički postupak primjenjuje za određivanje već spomenutih relativnih molekulskih masa iz kojih proizlaze njihove kemijske formule. Ioni se razdvajaju prema odnosu mase i naboja (m/z) te se detektiraju, a signal se pohranjuje u bazi podataka kao m/z omjer i odgovarajuća relativna abundancija (32).

1.6.3. Vezana tehnika plinska kromatografija-masena spektrometrija

Plinski kromatograf sa spektrometrom masa (Slika 3) predstavlja zlatni standard za identifikaciju supstanci, pogotovo u forenzičnoj toksikologiji. Vrlo je suvremeni i nezaobilazni postupak, u kojem se objedinjuju značajke plinsko-tekućinske kromatografije (razdvajanje smjesa) i spektrometrije masa (analiza pojedinačnih sastojaka) (31, 32).



Slika 3. Shematski prikaz osnovnih dijelova vezane GC-MS tehnike (33).

Razlike u kemijskim svojstvima između različitih molekula smjese omogućuju razdvajanje molekula tijekom putovanja uzorka kroz kolonu. Molekule trebaju različito vrijeme (retencijsko vrijeme) za izlazak (eluiranje) iz plinskog kromatografa što spektrometru masa omogućuje da „hvata“, ionizira, ubrzava, zakreće i detektira ionizirane molekule zasebno (28). Svaki plinski kromatograf ima detektor kojem je svrha mjerenje signala razdvojenih tvari dovedenih na kraju kolone. Rezultat je toga kromatogram na čijoj se apscisi nalazi vrijeme prolaska kemijskog spoja kroz kolonu, a na ordinati signal u obliku vrška proporcionalan koncentraciji određene tvari (34).

Analizom grafičkih prikaza spektrometra masa, na apscisi se označava omjer mase i naboja (m/z) karakterističan za određenu kemijsku skupinu, a na ordinati njihovi relativni intenziteti. Moraju se poklopiti parametri m/z i pripadni im omjeri visina pika na osi y kako bi se ustvrdilo da se radi o istom spoju. Biblioteke nude i vjerojatnost izraženu u postotcima o mogućnosti pronalaska istog spoja. Shodno tome, prilikom identifikacije određenog spoja

karakterističnog retencijskog vremena provjeravaju se i os x i os y na spektrometru masa kao i niže rangirane razine vjerojatnosti pronalaska odgovarajućeg spoja (31).

Idealno je koristiti navedenu metodu u sljedećim slučajevima:

- kvalitativna i kvantitativna analiza hlapljivih organskih sastojaka smjese
- testiranje ostatnih otapala
- identifikacija tragova nečistoća u tekućinama i plinovima
- evaluacija difuzije ekstrakata plastike (npr. ftalati)
- prisutnost i količina zagađivača

Visoka osjetljivost, preciznost, pouzdanost, selektivnost i male količine uzoraka potrebnih za analizu samo su neke od prednosti GC-MS metode (34).

Veliki nedostatak predstavlja visoka temperatura injektora zbog čega se termički labilne tvari mogu razgraditi prilikom prolaska kroz kolonu plinskog kromatografa. Iz tog razloga, ovom se metodom analiziraju spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C, a da se pri tome ne raspadnu. Ti se problemi mogu riješiti i derivatizacijom. Sljedeći nedostatak predstavlja dugotrajan i skup postupak pripreme posebice pri kvantitativnim analizama (34).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada bili su:

1. Kvalitativno odrediti prisutnost parabena u kozmetičkim proizvodima (dezodoransima) primjenom GC-MS metode.
2. Usporediti dobivene rezultate s deklaracijom o prisustvu parabena na ambalaži proizvoda.
3. Usporedba učestalosti pojave proizvoda pozitivnih na prisustvo parabena u cjenovnom rangu ispod vrijednosti medijana.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

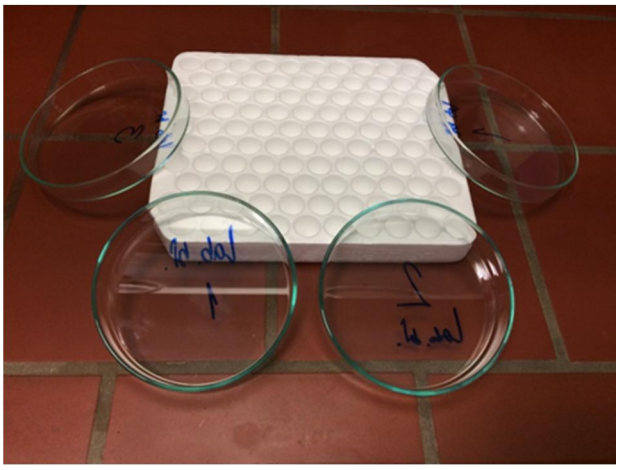
U ovom je istraživanju od kemikalija korišten kloroform (p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka), a ispitivano je 26 uzoraka navedenih u tablici 3 (5 roll-onova, 5 stickova i 16 sprejeva).

Tablica 3. Popis ispitivanih uzoraka.

REDNI BROJ UZORKA	**FORMULACIJA**			**CIJENA (kn) na 100 mL**
	SPRAY	*ROLL-ON*	*STICK*	
1.		✓		33,80
2.		✓		45,80
3.		✓		43,98
4.		✓		35,80
5. i 5(2)			✓	58,75
6.			✓	47,25
7.			✓	54,98
8.			✓	39,75
9.	✓			15,93
10.	✓			14,66
11.	✓			14,07
12.	✓			145,93
13.	✓			14,66
14.	✓			14,66
15.	✓			34,66
16.	✓			12,86
17.	✓			8,00
18.	✓			4,95
19.	✓			14,66
20.	✓			14,66
21.	✓			12,00
22.	✓			10,67
23.	✓			6,66
24.	✓			11,99
25.		✓		128

3.2. Postupak pripreme uzorka za analizu

Svi su uzorci označeni pripadajućim laboratorijskim brojem (Slika 4).



Slika 4. Dio ispitivanih uzoraka.

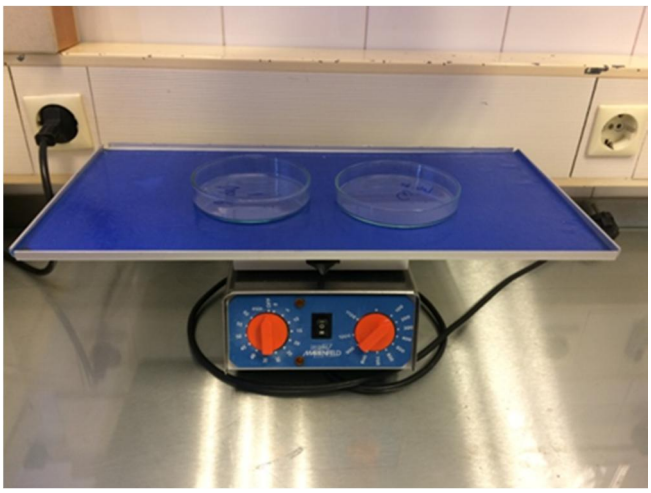
Za pripremu uzoraka korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak jednim potiskom spreja, odnosno raspršivanjem (u slučaju običnih sprejeva i onih s potisnim plinom) ili nanošenjem direktno s roll-ona ili sticka na zdjelicu. Nakon raspršivanja sprejeva na zdjelice, uzorci su postavljeni u digestor na isparavanje (Slika 5).



Slika 5. Priprema uzoraka za GC-MS analizu.

Uzorci u Petrijevim zdjelicama nekoliko su puta ispirani kloroformom kako bi se zahvatio cijeli naneseni sadržaj. Nakon što su otopljeni, uzorci su, još kratko vrijeme, otapani u kloroformu, a potom je izvršena filtracija filter papirom. Na samom kraju, uzorci su preneseni u staklene tubice za GC-MS analizu.

Ispitivan je utjecaj pripreme uzorka tako da je uzorak 5 pripremljen na dva načina. Prvi način pripreme uzorka prethodno je opisani način (otapanje u kloroformu pa filtracija uzorka), a drugi je maceracija nakon filtracije. Maceracija se provodila koristeći magnetsku miješalicu kako je prikazano na slici 6 uz korištenje kloroforma kao otapala.



Slika 6. Maceracija uzorka 5(2) na magnetskoj miješalici

3.3. Instrumentalna analiza

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- plinski kromatograf s masenim spektrometrom: Shimadzu GCMS-QP2010 (Slika 7)
- magnetska miješalica (Marienfeld, Njemačka)

3.3.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske metode

Kromatografska analiza pripremljenih uzoraka izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (engl. *Single ion monitoring*, SIM). Optimiran je temperaturni program.

Optimalni radni uvjeti:

- volumen injektiranja: 1 μL (splitless)
- temperatura injektora 250 ^{0}C
- protok plina nosioca 1,0 mL/min

-ukupno trajanje temperaturnog programa: 29 minuta:

I 100 ^{0}C izotermno 0,5 min

II 5 ^{0}C /min do 220 °C

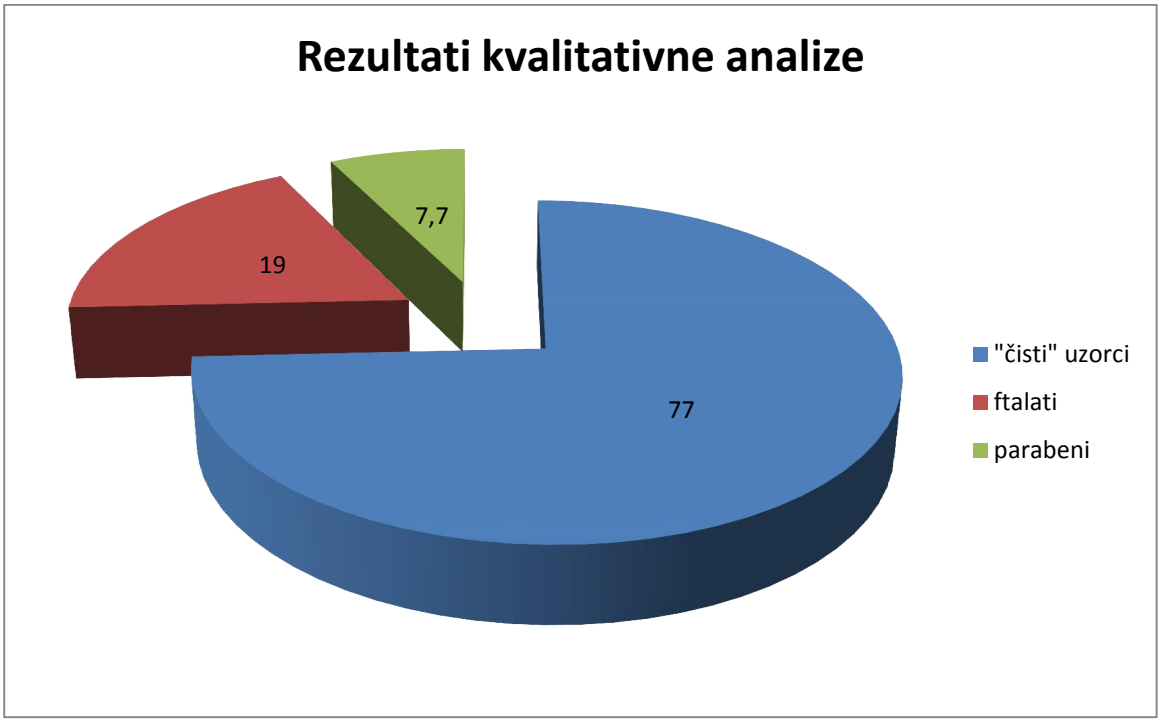
III 275^{0}C izotermno 5 min



Slika 7. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa; Shimadzu GCMS-QP2010 (35).

4. REZULTATI

Analizom 26 uzoraka na GC-MS kromatografu, u dva je uzorka (br. 1 i 4) dokazana prisutnost parabena, a u 5 uzoraka dokazano je i prisustvo dietilftalata (uzorci br. 1, 9, 17, 22, 24). Od svih analiziranih uzoraka, njih je 20 (77 %) dalo rezultat negativan na prisutvo parabena i ftalata, a u 6 je uzoraka kvalitativno dokazano prisustvo parabena i/ili ftalata (Slika 8). Potrebno je uočiti veći postotak uzoraka negativnih na prisustvo parabena i ftalata zbog uzorka br. 1 u kojem su pronađeni i parabeni i ftalati.



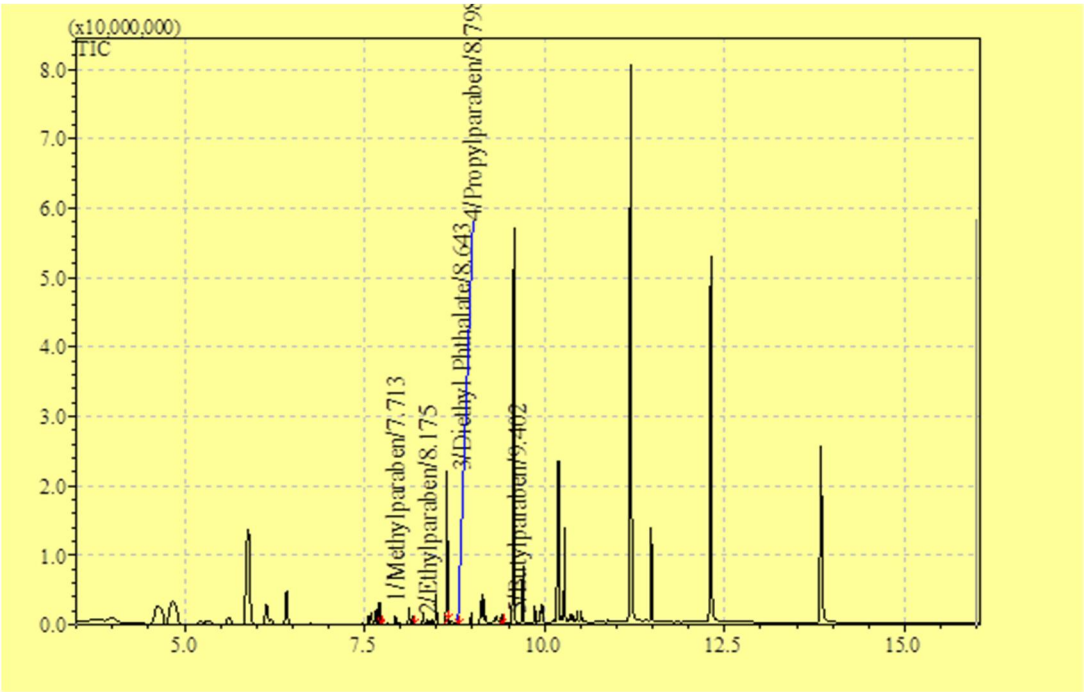
Slika 8. Prikaz rezultata s obzirom na udio parabena i ftalata te udio uzoraka bez prisustva ispitivanih tvari, tzv. *čisti uzorci*.

4.1. Kvalitativna identifikacija parabena

Od 26 ispitanih uzoraka, dva su uzorka dala rezultat pozitivan na prisutnost parabena (uzorci br. 1 i 4).

U narednom tekstu prikazani su kromatogrami dvaju spomenutih uzoraka. S obzirom da se rezultati ove studije baziraju na kvalitativnim analizama, nije promatrana visina pika na kromatogramu već samo karakteristična retencijska vremena kemijskih spojeva koji su uspoređivani s onima iz biblioteke.

U uzorku br. 1 dokazano je prisustvo metilparabena, etilparabena, propilparabena i butilparabena s karakterističnim retencijskim vremenima (RT) prikazanim na slici 9.

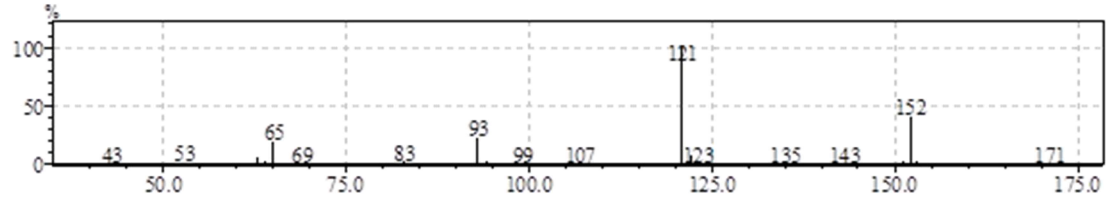


Slika 9. Ukupni ionski kromatogram uzorka br.1 analiziranog GC-MS tehnikom. Os x prikazuje vrijeme zadržavanja uzorka u koloni (retencijsko vrijeme, RT) dok os y prikazuje intenzitet tvari proporcionalan koncentraciji tvari. U ispitivanom je uzorku dokazano prisustvo metilparabena (RT=7,713), etilparabena (RT=8,175), propilparabena (RT=8,798) i butilparabena (RT=9,402) kao i dietilftalata (RT=8,43).

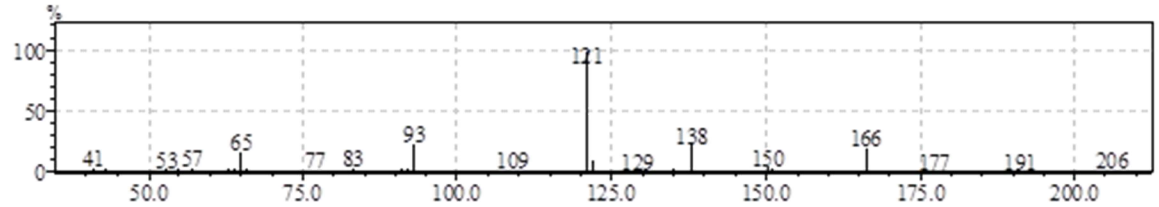
.

Na slikama 10-13 prikazani su spektri masa karakteristični za neke od analiziranih parabena.

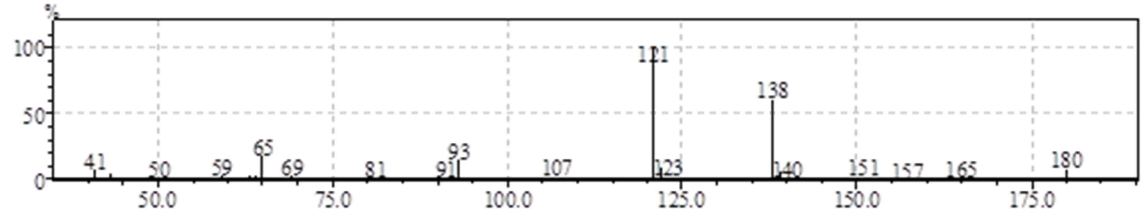
Os x prikazuje vrijednost odnosa mase i naboja dok os y prikazuje njihov intenzitet. Svaka tvar posjeduje karakterističan spektar masa te se taj podatak koristi za njihovo kvalitativno dokazivanje.



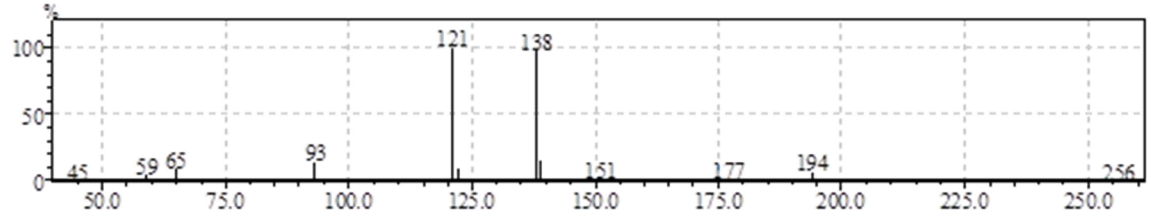
Slika 10. Karakterističan spektar masa za metilparaben dokazan u uzorku br.1 (m/z 121, 152, 93, 65)



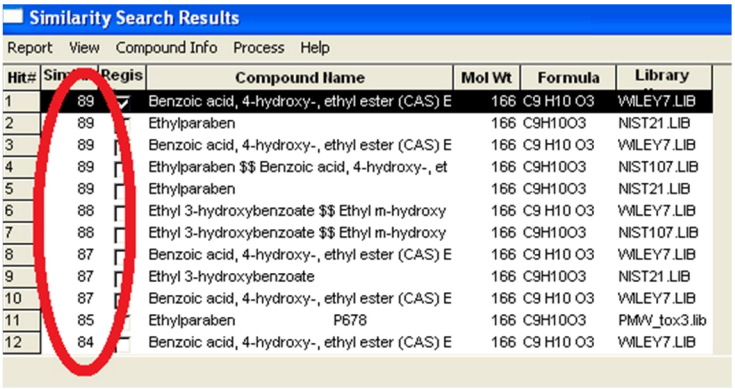
Slika 11. Karakterističan spektar masa za etilparaben dokazan u uzorku br. 1 (m/z 121, 138, 93, 65)



Slika 12. Karakterističan spektar masa za propilparaben dokazan u uzorku br. 1 (m/z 121, 138, 65)



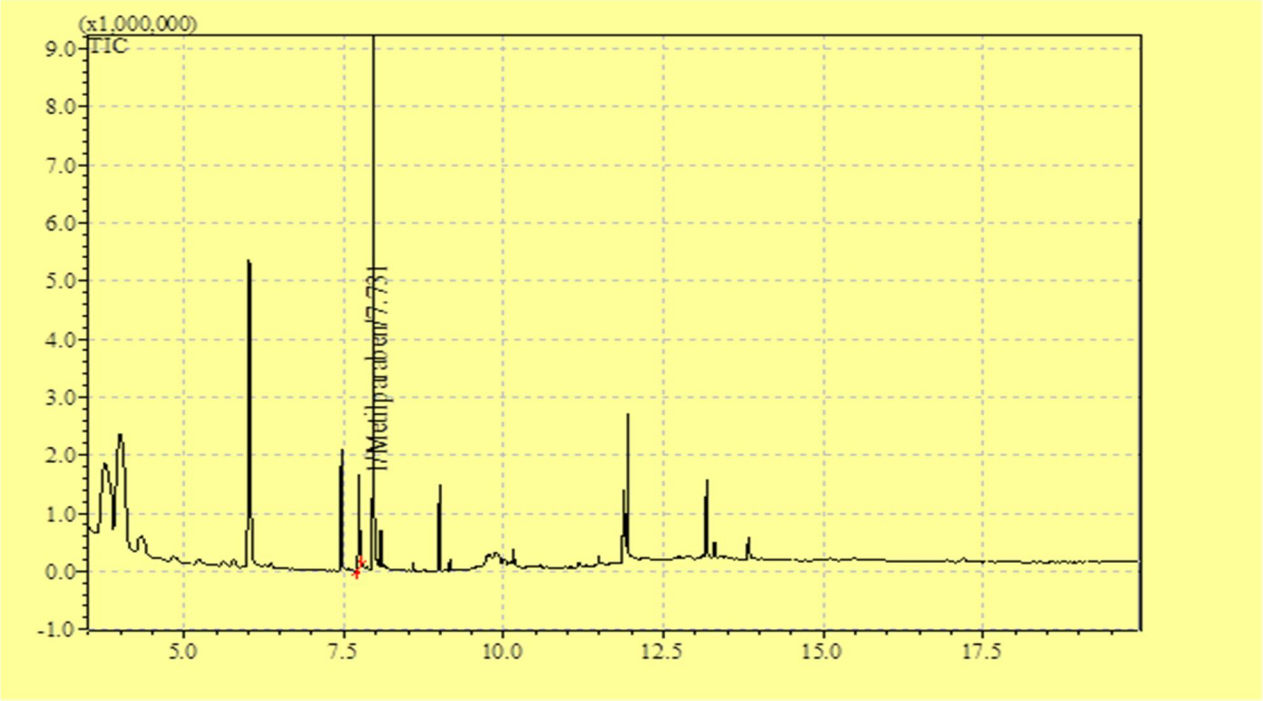
Slika 13. Karakterističan spektar masa za butilparaben u uzorku 1 (m/z 121, 138, 93, 194)



Hit#	Sim...	Regis	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	89		Benzoic acid, 4-hydroxy-, ethyl ester (CAS) E	166	C9 H10 O3	WILEY7.LIB
2	89		Ethylparaben	166	C9H10O3	NIST21.LIB
3	89		Benzoic acid, 4-hydroxy-, ethyl ester (CAS) E	166	C9 H10 O3	WILEY7.LIB
4	89		Ethylparaben $$ Benzoic acid, 4-hydroxy-, et	166	C9H10O3	NIST107.LIB
5	89		Ethylparaben	166	C9H10O3	NIST21.LIB
6	88		Ethyl 3-hydroxybenzoate $$ Ethyl m-hydroxy	166	C9 H10 O3	WILEY7.LIB
7	88		Ethyl 3-hydroxybenzoate $$ Ethyl m-hydroxy	166	C9H10O3	NIST107.LIB
8	87		Benzoic acid, 4-hydroxy-, ethyl ester (CAS) E	166	C9 H10 O3	WILEY7.LIB
9	87		Ethyl 3-hydroxybenzoate	166	C9H10O3	NIST21.LIB
10	87		Benzoic acid, 4-hydroxy-, ethyl ester (CAS) E	166	C9 H10 O3	WILEY7.LIB
11	85		Ethylparaben P678	166	C9H10O3	PMW_tox3.lib
12	84		Benzoic acid, 4-hydroxy-, ethyl ester (CAS) E	166	C9 H10 O3	WILEY7.LIB

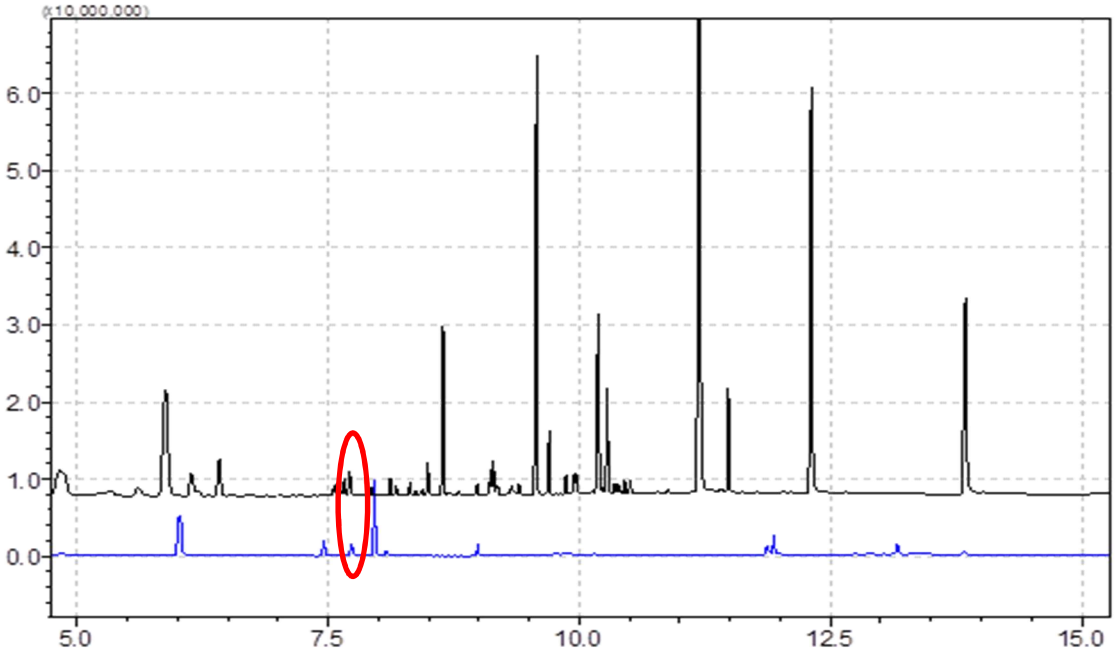
Slika 14. Prikaz rezultata usporedbe kromatograma dobivenog analizom uzorka br. 1 s kromatogramima iz baze podataka za etilparaben.

U uzorku br. 4 dokazano je prisustvo metilparabena prikazano na slici 15.



Slika 15. Ukupni onski kromatogram uzorka br. 4 analiziranog GC-MS tehnikom u kojem je potvrđeno prisustvo metilparabena (RT=7,731).

Usporedba kromatograma uzoraka br. 1 i 4 (Slika 16):



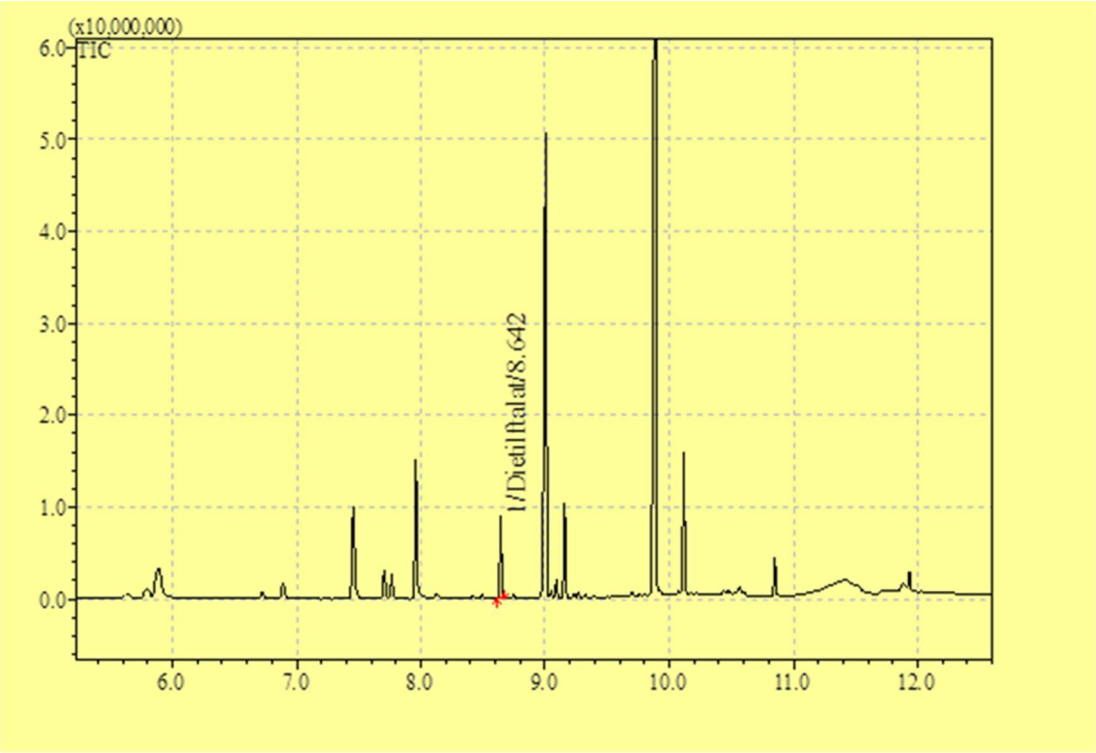
Slika 16. Usporedba rezultata analize uzorka br. 1 (kromatogram označen crnom bojom) i uzorka br. 4 (kromatogram označen plavom bojom) s karakterističnim signalom za metilparaben (RT=7,7) detektiranim u obama uzorcima.

4.2. Kvalitativna identifikacija ftalata

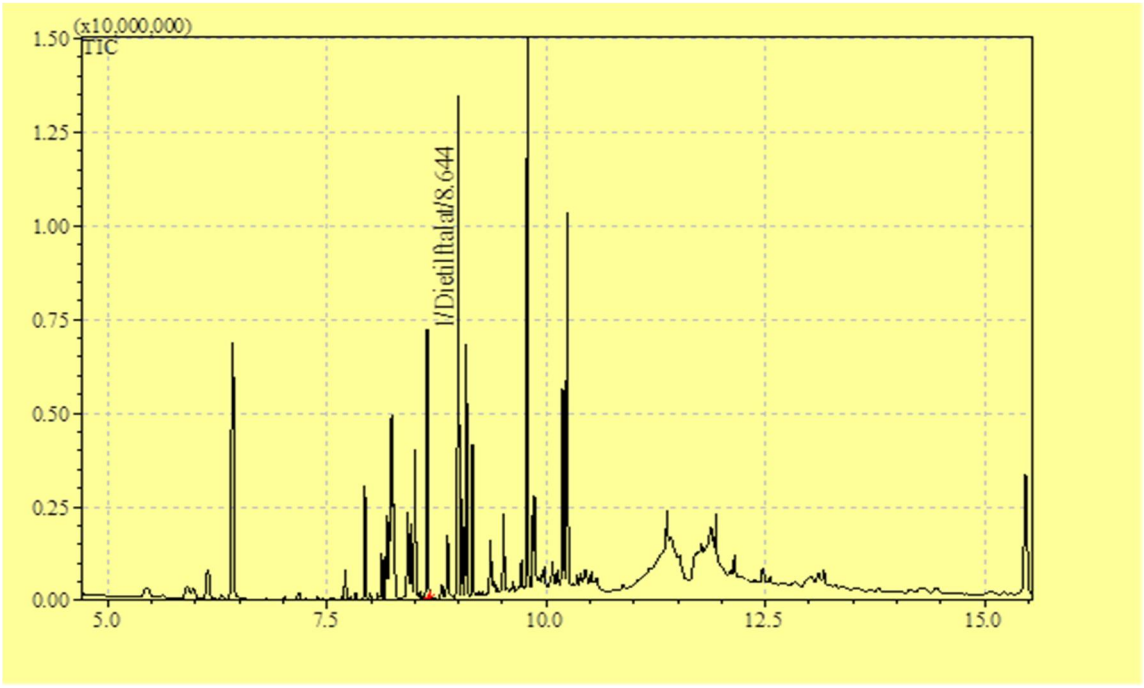
Svi dobiveni kromatogrami analiziranih uzoraka, usporedo s analizom parabena, pretraživani su i za potvrđivanje prisustva ftalata.

Dokazano je prisustvo ftalata u 5 uzoraka. U svim navedenim uzorcima pronađen je dietilftalat**.**

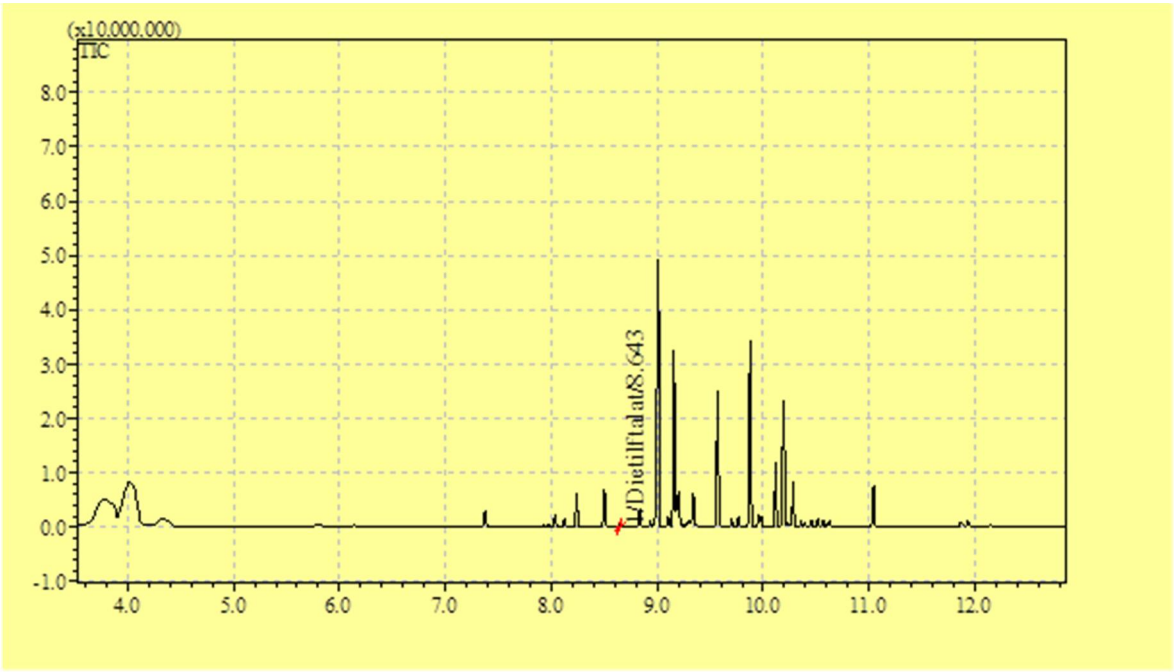
Na narednim slikama (Slike 17, 18, 19, 20) prikazani su ukupni ionski kromatogrami uzoraka br. 9, 17, 22, 24 s karakterističnim retencijskim vremenom za dietilftalat (uzorak br. 1 prikazan je na slici 9).



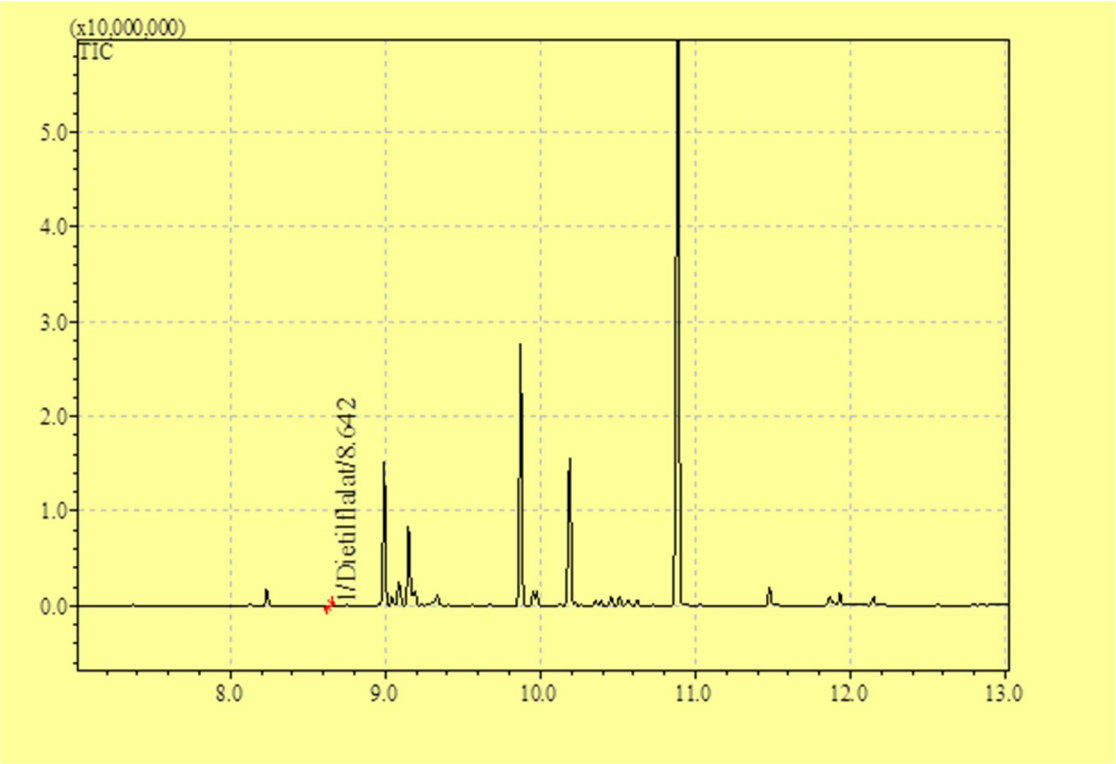
Slika 17. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 9 analiziranog GC-MS tehnikom u kojem je dokazano prisustvo dietilftalata (RT=8,642).



Slika 18. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 17 analiziranog GC-MS tehnikom u kojem je dokazano prisustvo dietilftalata (RT=8,644).

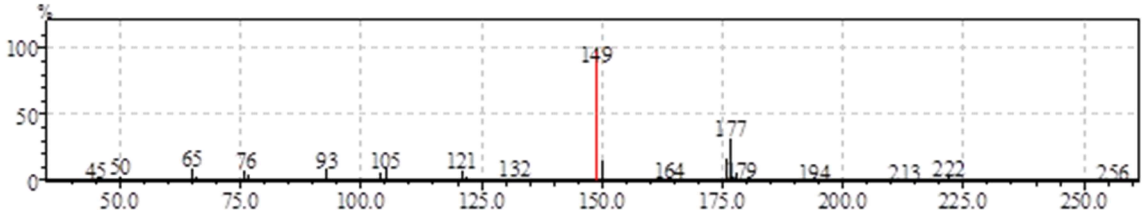


Slika 19. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 22 analiziranog GC-MS tehnikom u kojem je dokazano prisustvo dietilftalata (RT=8,643).



Slika 20. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 24 analiziranog GC-MS tehnikom u kojem je dokazano prisustvo dietilftalata (RT=8,642).

Na slici 21 prikazan je karakteristični spektar masa za dietilftalat pronađen u uzorcima br. 1, 9, 17, 22 i 24..



Slika 21. Karakteristični spektar masa za dietilftalat dokazan u uzorku br. 24 (m/Z 149, 177, 105)

4.3. Kontrola deklaracije sastava

U tablici 4 prikazan je odnos uzoraka pozitivnih na prisustvo parabena i ftalata i pripadne deklaracije na ambalaži. Supstanca mora biti identifcirana GC-MS metodom i deklarirana ili ni identificirana niti deklarirana kako bi bila u skladu s deklaracijom. Sve se ostale mogućnosti smatraju odstupanjem od deklaracije.

Tablica 4. Odnos identificiranih parabena i/ili ftalata i deklaracije

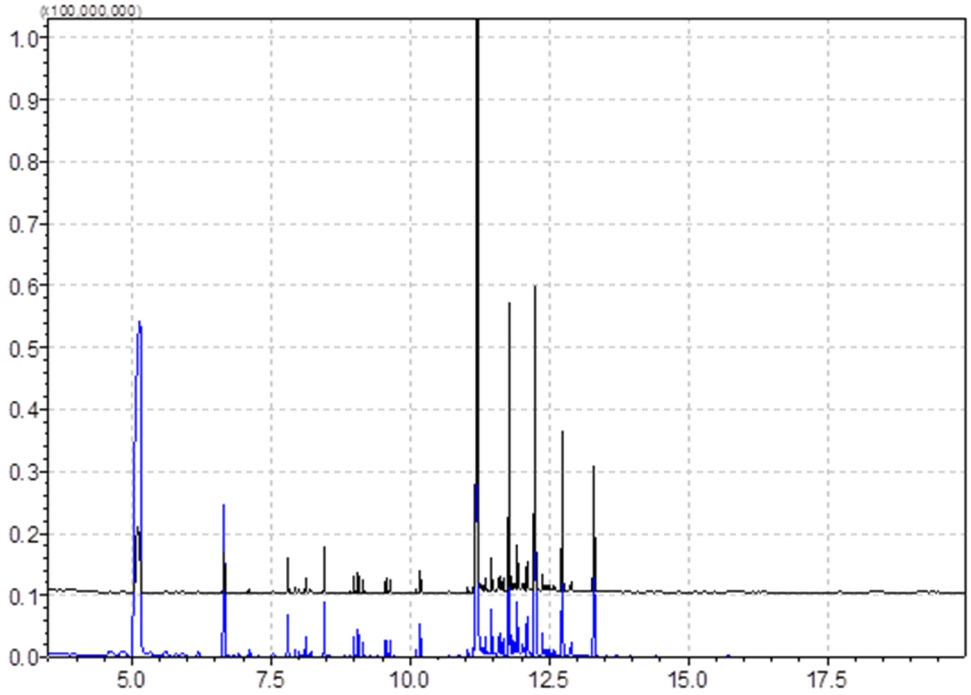
broj uzorka	metilparaben		etilparaben		propilparaben		butilparaben		dietilftalat	
	+*	=**	+	=	+	=	+	=	+	=
1	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	
4	✓	✓								
9									✓	
17									✓	
22									✓	
24									✓	

* Supstanca je pronađena u uzorku.

** Supstanca je deklarirana na ambalaži.

4.5. Usporedba rezultata u nemaceriranom i maceriranom uzorku istog proizvoda

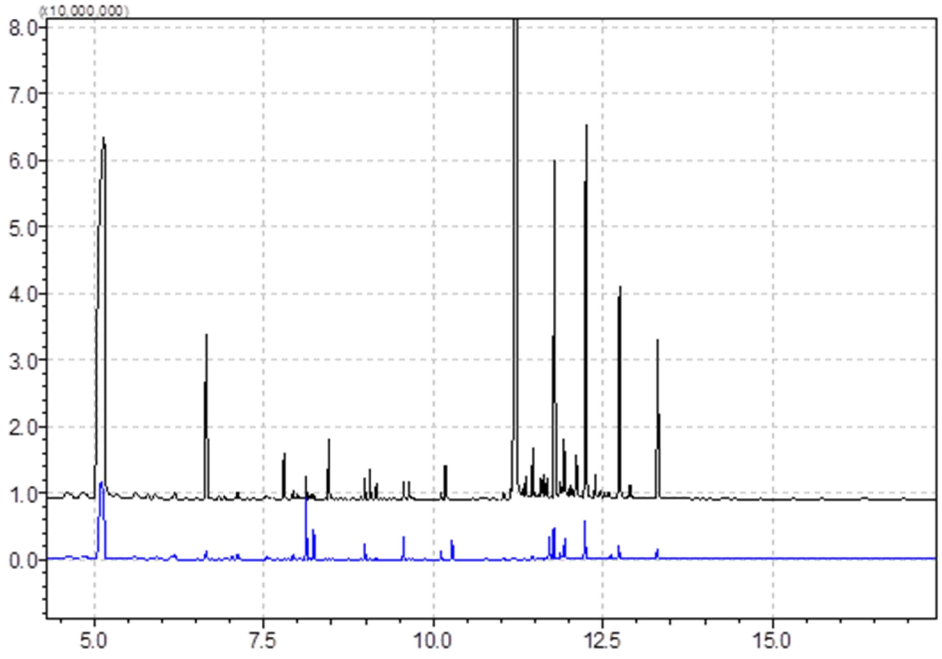
Uzorak 5, za analizu GC-MS metodom, pripremljen je na dva načina - jedan je uzorak prošao postupak maceracije, a drugi nije te su rezultati uspoređeni. Ni u maceriranom uzorku niti u uzorku pripremljenom maceracijom nije potvrđeno prisustvo i/ili ftalata. Usporedbom dobivenih karakterističnih signala, iz kromatograma se može uočiti gotovo potpuno preklapanje, čime je pokazano da način pripreme uzorka nema utjecaj na dobiveni rezultat (Slika 22).



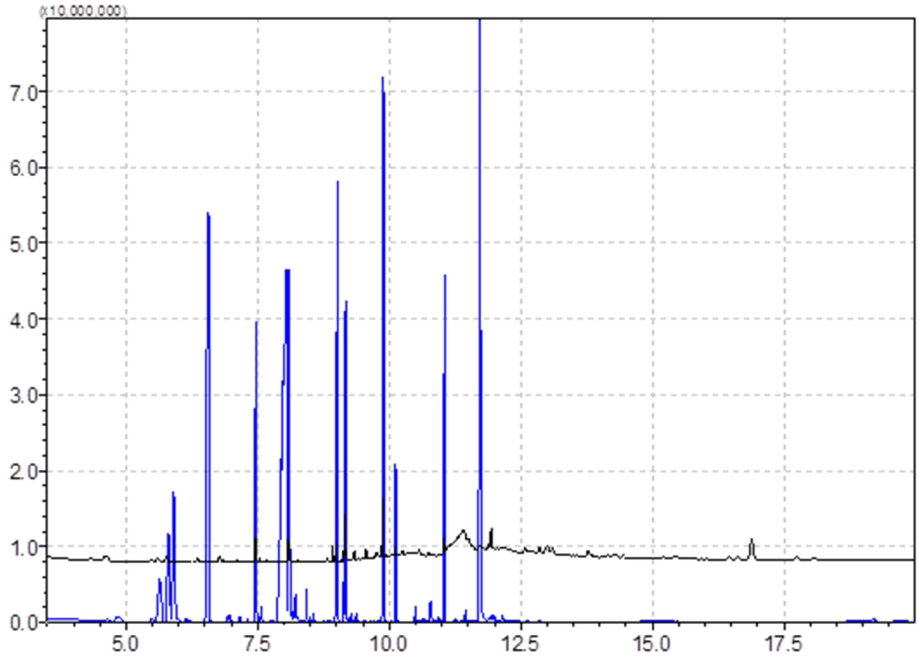
Slika 22. Usporedba rezultata analize istog uzorka br. 5 koji nije prethodno maceriran (kromatogram označen crnom bojom) i uzorka br. 5 koji jest prethodno maceriran (kromatogram označen plavom bojom) u kojima nije dokazano prisustvo ni parabena niti ftalata.

4.6. Usporedba različitih oblika proizvoda istog proizvođača

U ovu svrhu ispitivani su istovrsni proizvodi različitih proizvođača u više različitih oblika. Analizirani su uzorci br. 5 i 13 (istog proizvođača i podvrste) s tim da je uzorak br. 5 bio u sticku, a uzorak br. 13 u obliku spreja s potisnim plinom (Slika 23). Isto su tako ispitivani uzorci br. 3 i 19 (Slika 24), od kojih je uzorak br. 3 roll-on, a uzorak br. 19 sprej s potisnim plinom.



Slika 23. Usporedba rezultata analize uzorka br. 5 u formulaciji *sticka* (kromatogram označen crnom bojom) i uzorka br. 13 u obliku spreja s potisnim plinom (kromatogram označen plavom bojom).



Slika 24. Usporedba rezultata analize uzorka br. 3 u formulaciji *roll-ona* (kromatogram označen crnom bojom) i uzorka br. 19 u obliku spreja s potisnim plinom (kromatogram označen plavom bojom).

.

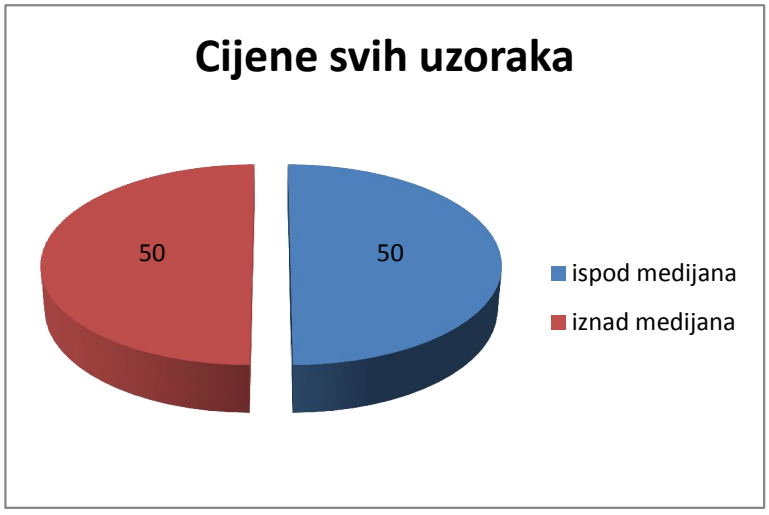
4.7. Usporedba dobivenih rezultata i cijene uzoraka u kojima su identificirani parabeni i ftalati (obrada podataka)

Korištenjem funkcije „Median“ u *Microsoft Excel* proračunskim tablicama izračunate su dvije srednje vrijednosti cijena navedenih u posljednjem stupcu tablice popisa ispitivanih uzoraka opisanih u poglavlju broj 3 „Materijali i metode*“,* a to su redom:

- medijan cijena svih 26 uzoraka iznosi 14,66 kn
- medijan cijena svih dezodoransa iznosi 14, 365 kn
- medijan cijena roll-on uzoraka (5 uzoraka) iznosi 43,98 kn

Vrijednost medijana označava da se 50 % cijena uzoraka nalazi iznad vrijednosti medijana, a 50 % ispod.

Uzevši u obzir medijan cijena svih uzoraka (14,66 kn), ispostavilo se da su od 6 uzoraka koji su dali rezultat pozitivan na parabene i ftalate cijene triju od njih iznad vrijednosti medijana, a triju ispod te vrijednosti. Dakle, 50 % uzoraka pozitivnih na parabene i ftalate spada u kategoriju iznad vrijednosti medijana, a 50 % ispod te vrijednosti (Slika 25)



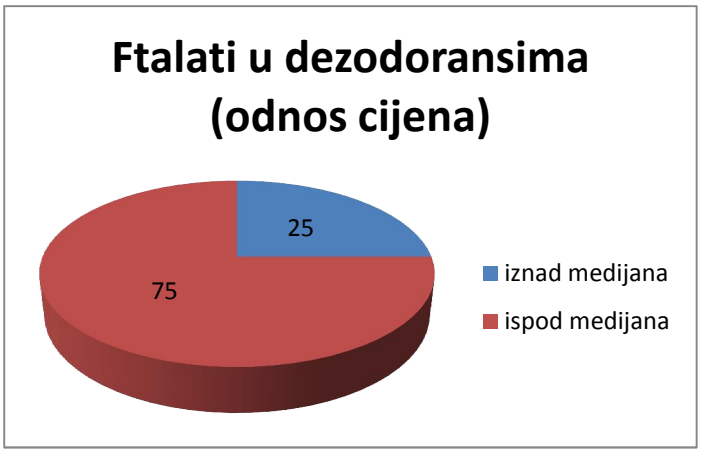
Slika 25. Grafički prikaz raspodijeljenosti cijena uzoraka pozitivnih na prisustvo parabena i ftalata prema medijanu izračunatom na temelju cijena svih uzoraka.

- **PARABENI** (skupina uzoraka pozitivnih na prisustvo parabena)

  Uzevši u obzir medijan cijena roll-on uzoraka, ispostavilo se da su oba roll-ona u cjenovnom rangu ispod medijana, dakle 100 % uzoraka pozitivnih na parabene spada u kategoriju jeftinijih proizvoda.

- **FTALATI** (skupina uzoraka pozitivnih na prisustvo ftalata)

  Među uzorcima pozitivnima na prisustvo ftalata prevladavaju sprejevi s potisnim plinom, odnosno dezodoransi, u obzir se uzeo samo medijan sprejeva (14,365 kn). Budući da ne odstupa značajno od vrijednosti medijana cijena svih uzoraka koji iznosi 14,66 kn, može se računati i tom cijenom zato što se dobiju istovjetni rezultati.
  Od 5 uzoraka pozitivnih na prisustvo ftalata, 3 cjenovnog ranga ispod medijana, a 2 iznad, dakle 60 % cijena uzoraka pozitivnih na ftalate spadaju u kategoriju jeftinijih. Ako bi se isključili roll-on zbog velike razlike u cijenama s obzirom na dezodoranse, 75% cijena svih uzoraka našlo bi se ispod medijana.



Slika 26. Grafički prikaz odnosa cijena ispod i iznad vrijednosti medijana za dezodoranse pozitivne na prisustvo ftalata.

5. RASPRAVA

Zaokupljenost znanosti posljednjeg desetljeća potencijalnom štetnošću parabena na ljudsko zdravlje i uvođenje stroge zakonske regulative o istima, zasigurno je doprinijela rezultatima ove eksperimentalne studije: među 26 testiranih uzoraka primjenom GC-MS metode, samo su 2 uzorka (br. 1 i 4) bila pozitivna na prisutnost parabena pri čemu u uzorku br. 1 jedino etilaparaben nije bio označen na deklaraciji, dok svi ostali odgovaraju deklaraciji. Navedenu tvrdnju potkrjepljuje činjenica iz siječnja 2013. godine gdje je pretraga baze TOXLINE pod nazivom „Endokrini disruptori" iznjedrila vrtoglavih 4278 različitih članaka, a na bazi MEDLINE 33 publikacije u 1992. do 290 publikacija u 2011. godini (17).

Sveprisutnost raznih negativnih konotacija o uporabi parabena kao i obilje reklamnih natpisa koji navode da niz proizvoda za osobnu njegu ne sadrži parabene (engl. *„paraben free"*), daje ovom eksperimentalnom postupku kontrole metodički odabranih kozmetičkih proizvoda, suvislu i opravdanu svrhu.

Ovo je istraživanje provedeno s ciljem objedinjenja činjenica o navodnim štetnim čimbenicima identifikacije parabena u samim kozmetičkim preparatima iz odabranih uzoraka. Naime, vidljivo je iz popisa uzoraka (opisanih u u poglavlju *Materijali i metode)* da su korišteni samo oni proizvodi za osobnu njegu koji se primjenjuju u aksilarnom području kao što su stickovi, sprejevi (obični i s potisnim plinom) i roll-on dezodoransi. Razlog tome je karcinogeni potencijal pojave intaktnih estera parabena u epitelnim stanicama dojke (u daljnjem tekstu) za koje se sumnja da se prenose transdermalnim putem korištenjem antiperspiransa u pazušnoj regiji. Također, odabrani su proizvodi širokog cjenovnog raspona, od najjeftinijih (5 kn) do najskupljih (145 kn) te različitih brendova (od nepoznatih do najpoznatijih i najkorištenijih) kako bi se uočila moguća korelacija između cijena i brendova, odnosno potvrdila ili opovrgnula pretpostavka da će oni najjeftiniji i „najnepoznatiji" obilovati parabenima.

Za zaključke koji slijede iz obrade podataka prikazanih u rezultatima (Poglavlje 4. 6.) postoji mogućnost dvojake interpretacije. Izračun vrijednosti medijana karakterističan samo za roll-onove, u potpunosti potvrđuje pretpostavku o niskoj cijeni proizvoda u kojima su detektirani parabeni, dok medijan temeljen na čitavoj skupini uzoraka daje 50 %-tni rezultat. Rezultat proračuna medijana na razini cijele skupine mogao bi se ispostaviti manjkavim budući da roll-onove (uzorci br. 1 i 4 jedini su u kojima su pronađeni parabeni, a radi se o roll-on obliku) karakterizira značajno viša cijena naspram sprejeva s potisnim plinom, stoga bi

njihov cjenovni položaj, iznad vrijednosti medijana, mogao prividno dati krivu interpretaciju rezultata. Slijedom toga dolazi se do zaključka da bi u zasebnoj skupini roll-onova trebalo povećati broj uzoraka kako bi konačni rezultat bio od višeg statističkog značaja. Ni u jednom se od grafičkih prikaza medijana ne može pronaći udio parabena i ftalata veći od 50 %, među kojima uzorci pozitivni na parabene i ftalate, čija je prisutnost također kontrolirana (opisano u Poglavlju 4. 2.), spadaju u cjenovnu skupinu iznad medijana, što je sukladno očekivanjima.

Ukoliko se promatraju pojedinačni pripadnici skupine, može se doći do oprečnog rezultata. Primjerice, uzorci br. 18 i 23 spadaju u niski cjenovni rang, a ne sadrže potencijalne ksenoestrogene, dok uzorak br. 9 pripada skupini proizvoda iznad medijana, a daje rezultat pozitivan na ftalate. Uzorci br. 18 i 23 izvorni su proizvodi lokalnih drogerija, što može biti razlog niže cijene. Neki uvozni proizvodi čija se cijena nalazi ispod medijana (uzorci br. 1, 4, 17, 22, 24) pokazali su se pozitivnim na prisustvo parabena i ftalata. Uzorak br. 9 nije komplementaran prethodnom zaključku. S druge strane, u uzorcima br. 11, 16 i 21 nije potvrđeno prisustvo parabena i ftalata, a uvozni su i spadaju u cjenovni rang ispod medijana. S obzirom da su rezultati dvojaki i da nema jasne poveznice javlja se potreba za proširenjem studije. U budućim istraživanjima trebao bi se koristiti veći broj uzoraka svih cjenovnih kategorija, relevantniji statistički parametar izračuna srednje vrijednosti spomenutih proizvoda kao i detaljnija statistička obrada podataka.

Isto tako, „poznati“ brendovi (oni koji su u velikoj mjeri zastupljeni na tržištu) pokazali su ispravnost i podudarnost s navedenom deklaracijom, a oni manje korišteni i anonimniji pokazali su određene nepravilnosti. Objašnjenje tog zapažanja leži u činjenici što veliki i renomirani brendovi očito prolaze strože kontrole kvalitete.

Hao Yu Shen i suradnici su u studiji iz 2007. među 15 testiranih uzoraka pronašli samo jedan „slobodan“ od parabena i ftalata (4) što je u suprotnosti sa 77 % uzoraka koji su se u ovoj eksperimentalnoj studiji pokazali negativnima na njihovo prisustvo. Parabeni se svrstavaju u kategoriju „nepoželjnih“ sastojaka unatoč nedovoljno čvrstim znanstvenim dokazima o njihovom štetnom učinku, stoga nije čudo da je u posljednje vrijeme primijećen znatan pomak u ukidanju i zamjeni parabena drugim konzervansima kako proizvođači ne bi izgubili svoje tržište.

Samoj raspravi o štetnosti parabena, trebala bi prethoditi zapažanja o ispravnosti primijenjene metode za njihovu identifikaciju. Priprema uzorka za analizu pokazala se razmjerno jednostavnom i dostatnom za identifikaciju parabena. Ispravnost pripreme testirana je kod uzoraka 5 i 5(2) gdje je uzorak dodatno maceriran radi usporedbe dobivenih rezultata.

Međutim, GC-MS analizom i usporedbom dobivenih kromatograma nije dokazana značajna razlika. Sukladno tome, priprema ostalih uzoraka provedena je samo u dvjema spomenutim fazama prije GC-MS analize. Zbog svojstva niske hlapljivosti parabena, priprema uzorka za analizu trebala bi sadržavati veliku količinu samog uzorka i korak derivatizacije (4). Lako je zaključiti da je priprema uzoraka bila ispravna zato što su 2 uzorka dala rezultat pozitivan na prisutnost parabena koji je naveden i u deklaraciji.
Isto tako, valja se i zapitati: Je li moguće detektirati iznimno niske koncentracije parabena jer postoji mogućnost preuranjenog hlapljenja pa sami signal nikada neće ni stići na detektor? Odgovore na ta pitanja mogle bi dati potencijalne buduće studije.

Prilikom analize parabena u proizvodima nemoguće je izostaviti i određivanje prisustva ftalata. Naime, ftalati su nezaobilazna stanica uz parabene kad se spominju pojmovi „ksenoestrogeni“ i endokrini disruptori (ometači)“. S obzirom da im se pretpostavlja sličan mehanizam estrogene aktivnosti kao i parabenima u mnoštvu se radova razmatraju zajedno (17, 22, 23). Međutim, ftalati su primarnim mehanizmom jedna od glavnih sastavnica PVC-a, omekšivači i plastifikatori, odnosno mogu difundirati u proizvod iz same ambalaže (23). Važno je istaknuti kako nijedan od uzoraka pozitivnih na prisustvo ftalata nije iste imao otisnute na deklaraciji što govori u prilog navedenoj teoriji. Njihova identifikacija u kozmetičkim proizvodima upućuje na potrebu za provođenjem strože kontrole sastava proizvoda nakon samog pakiranja.

Zanimljive informacije daje kritički osvrt iz 2013. koji opovrgava insinuacije o štetnosti parabena i ftalata. Primjerice, navodi podatak da je dietilftalat (pronađen u 5 uzoraka u ovom radu), jedini siguran pripadnik ftalatne skupine među kojima su ostali štetni. Navodno, standardne toksikološke studije nisu dokazale nikakve neočekivane neželjene reakcije organizma (17).
Razne su studije dokazale štetan utjecaj parabena i ftalata. Naime, dokazan je štetni utjecaj dugolančanih ftalata (npr.dietilheksil ili butilftalat) na mušku plodnost štakora prilikom ingestije visokih oralnih doza (17) čiji se mehanizam prema većini studija (5) ekstrapolira i na parabene. U tom svjetlu, važno je i razmotriti inhalacijski put primjene parabena (36) moguć kod aplikacije običnih sprejeva i onih s potisnim plinom.

Nadalje, većina istraživanja promatra transdermalnu apsorpciju parabena preko intaktne kože, posebice kod ozljeda nastalih brijanjem i depiliranjem, stoga se rezultatima studije Darbrea i Harveyja iz 2014. savjetuje razmatranje djelovanja parabena i ftalata preko oštećene kože (12).

Ipak, postoji i potreba za pridavanjem veće pažnje provođenju kvantitativnih analiza parabena jer sama identifikacija nije dostatna kako bi se ustvrdila estrogena aktivnost s obzirom na izdašne koncentracije estrogenski najpotentnijih parabena, potrebne za oponašanje učinka endogenog estradiola. Potrebne su duge, kontrolirane studije koje bi razotkrile učinak parabena u malim koncentracijama prilikom učestale i dugotrajne primjene te se moraju precizno ustanoviti sva ograničenja takvih studija.

Budući da su se deklaracije kozmetičkih proizvoda s parabenima pokazale prilično ispravnima, odnosno da je njihova prisutnost većinom uredno deklarirana, znanstveni bi se fokus mogao proširiti i na dokazivanje prisustva ftalata, kao i na benzil salicilata, benzil benzoata, butilfenil metilpropionala, bisfenola A te na sve potencijalne endokrine disruptore koji su nedovoljno istraženi, a koji se mogu redovito pronaći u sprejevima, roll-onovima i stickovima protiv znojenja.

6. ZAKLJUČCI

1. Od 26 uzoraka, samo su u uzorcima br. 1 i 4 identificirani parabeni. U uzorku br. 1 pronađeni su metiparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben, a u uzorku br. 4 dokazano je prisustvo metilparabena.

2. U uzorku br. 1 svi su detektirani parabeni deklarirani na proizvodu osim etilparabena dok je prisustvo metilparabena u uzorku br. 4 uredno deklarirano na ambalaži.

3. Od 26 uzoraka u 5 je uzoraka (br. 1, 9, 17, 22 i 24) potvrđeno prisustvo dietilftalata koji nije deklariran ni na jednoj ambalaži pripadnih proizvoda (najvjerojatnije zbog mogućnosti „curenja“ ftalata iz sastava ambalaže u sami proizvod).

4. Potrebne su detaljne studije koje bi utvrdile mogućnost detektiranja iznimno niske koncentracije parabena zbog sumnje na preuranjeno hlapljenje što može rezultirati da sami signal ne stigne na detektor.

5. Pretpostavka o niskoj cijeni preparata pozitivnih na parabene i ftalate nije ni potvrđena ni opovrgnuta. Za bolje razumijevanje i interpretaciju rezultata potrebno je obaviti daljnje studije.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Plavšić F. P-Hidroksi-benzojeva kiselina i njezini esteri zvani PARABENI (E214-E219). [cited 2016. 8. listopada]. Available from: http://www.otrovno.com/news_13.html.
2. Bledzka D, Gromadzinska J, Wasowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. Environ Int. Jun;67:27-42.
3. Wang PG, Zhou W. Rapid determination of parabens in personal care products by stable isotope GC-MS/MS with dynamic selected reaction monitoring. Journal of Separation Science.36(11):1781-7.
4. Shen HY, Jiang HL, Mao HL, Pan G, Zhou L, Cao YF. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. J Sep Sci. 2007 Jan;30(1):48-54.
5. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. Int J Toxicol. 2008;27 Suppl 4:1-82.
6. Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. J Appl Toxicol. 2008 Jul;28(5):561-78.
7. The Merck Index; 2006. izdanje
8. Genuis SJ, Birkholz D, Curtis L, Sandau C. Paraben levels in an urban community of Western Canada. ISRN Toxicol. Dec 17;2013:507897.
9. Esposito E, Bortolotti F, Nastruzzi C, Menegatti E, Cortesi R. Diffusion of preservatives from topical dosage forms: a comparative study. J Cosmet Sci. 2003 May-Jun;54(3):239-50.
10. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumours. J Appl Toxicol. 2004 Jan-Feb;24(1):5-13.
11. Lobemeier C, Tschoetschel C, Westie S, Heymann E. Hydrolysis of parabenes by extracts from differing layers of human skin. Biol Chem. 1996 Oct;377(10):647-51.
12. Darbre PD, Harvey PW. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. J Appl Toxicol. Sep;34(9):925-38.
13. Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. Toxicol Appl Pharmacol. 1998 Nov;153(1):12-9.
14. Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Hall S, Coldham NG, Pope GS, et al. Oestrogenic activity of benzylparaben. J Appl Toxicol. 2003 Jan-Feb;23(1):43-51.

15. Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Horton RA, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. J Appl Toxicol. 2002 Jul-Aug;22(4):219-26.
16. Pugazhendhi D, Pope GS, Darbre PD. Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. J Appl Toxicol. 2005 Jul-Aug;25(4):301-9.
17. Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: fact or urban legend? Toxicol Lett. Dec 16;223(3):295-305.
18. Goodson WH, 3rd, Luciani MG, Sayeed SA, Jaffee IM, Moore DH, 2nd, Dairkee SH. Activation of the mTOR pathway by low levels of xenoestrogens in breast epithelial cells from high-risk women. Carcinogenesis. Nov;32(11):1724-33.
19. Zhang Z, Sun L, Hu Y, Jiao J, Hu J. Inverse antagonist activities of parabens on human oestrogen-related receptor gamma (ERRgamma): in vitro and in silico studies. Toxicol Appl Pharmacol. Jul 1;270(1):16-22.
20. Konduracka E, Krzemieniecki K, Gajos G. Relationship between everyday use cosmetics and female breast cancer. Pol Arch Med Wewn.124(5):264-9.
21. Pan S, Yuan C, Tagmount A, Rudel RA, Ackerman JM, Yaswen P, et al. Parabens and Human Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Cross-Talk in Breast Cancer Cells. Environ Health Perspect. May;124(5):563-9.
22. Macon MB, Fenton SE. Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease. J Mammary Gland Biol Neoplasia. Mar;18(1):43-61.
23. Crinnion WJ. Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. Altern Med Rev. Sep;15(3):190-6.
24. Barr L, Metaxas G, Harbach CA, Savoy LA, Darbre PD. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. J Appl Toxicol. Mar;32(3):219-32.
25. Wrobel A, Gregoraszczuk EL. Effects of single and repeated in vitro exposure of three forms of parabens, methyl-, butyl- and propylparabens on the proliferation and estradiol secretion in MCF-7 and MCF-10A cells. Pharmacol Rep.65(2):484-93.
26. Khanna S, Darbre PD. Parabens enable suspension growth of MCF-10A immortalized, non-transformed human breast epithelial cells. J Appl Toxicol. May;33(5):378-82.
27. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. Osnove analitičke kemije: Školska knjiga; 1999. p. 645.-74.
28. Sutlović D. Potvrdne metode analize. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 109.-11.

29. Sutlović D i sur. Potvrdna analitička metoda, plinska kromatografija-spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 394.-5.
30. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Plinsko-tekućinska kromatografija.Osnove analitičke kemije: Školska knjiga; 1999. p. 674.-92.
31. H.Pine S. Organska kemija. In: al. IBe, editor. 3. ed. Zagreb: Školska knjiga; 1994. p. 1130.-2.
32. Sutlović D. Spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 355.-7.
33. GC-MS scheme. [cited 2016. 2. listopada]. Available from: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b9/Gcms_schematic.gif.
34. Sutlović D i sur. Plinska kromatografija-spektrometrija masa.Osnove forenzične toksikologije. Split: Tisak; 2011. p. 335.-48.
35. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa; Shimadzu GCMS-QP2010 [cited 2016. 29. rujna]; Available from: http://www.shimadzu.com/an/gcms/qn50420000005ykm-img/qn50420000005yll.jpg
36. Liao C, Kannan K. Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. Sci Total Environ. Mar 15;475:8-15.

8. SAŽETAK

NASLOV RADA:

Određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima primjenom GC-MS metode.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Kvalitativno određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima primjenom GC-MS metode te usporedba dobivenih rezultata s podatcima deklariranim na proizvodu. Pronaći poveznicu između cijene i prisustva parabena u kozmetičkom proizvodu.

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:

Odabrano je 25 kozmetičkih proizvoda za primjenu u pazužnom području, od toga 15 sprejeva s potisnim plinom, 5 roll-onova i 4 sticka. Od kozmetičkog proizvoda broj 5 dobivena su 2 uzorka: uzorak 5 istovjetnog načina pripreme kao i ostali uzorci te uzorak 5(2) koji je dodatno maceriran na magnetskoj miješalici. Sprejevi prethodno naneseni na Petrijevu zdjelicu, ostavljeni su na isparavanje u digestoru te su tako pripremljeni i otpareni otopljeni u kloroformu. Potom je uslijedila filtracija. Naposljetku, pripremljeni su uzorci prebačeni u staklene tubice za kvalitativnu analizu na GC-MS uređaju. Analiza je izvršena metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 – 600 m/z.

REZULTATI:

Parabeni su detektirani u dvama uzorcima: br. 1 i 4. U uzorku br. 1 pronađeni su: metilparaben, etilparaben, propilparaben i butilparaben od kojih etilparaben nije deklariran. U uzorku br. 4 pronađen je metilparaben koji je u skladu s navedenom deklaracijom. U uzorcima br. 1, 9, 17, 22, 24 pronađen je dietilftalat koji nije deklariran ni na jednom od ovih 5 uzoraka. U uzorku br. 5 nisu pronađeni parabeni (ni ftalati) nakon maceracije. Uvedeni su medijani cijena (Microsoft Excel) cjelokupne skupine proizvoda (14,66 kn), sprejeva (14,35 kn) i roll-onova (43,98 kn). Uzimajući u obzir zbrojni medijan od 14, 66 kn, 50 % proizvoda pozitivnih na parabene i ftalate nalazi se iznad, a 50 % ispod medijana. Kod medijana koji vrijedi za roll-onove oba proizvoda (100 %) pripadaju nižem cjenovnom rangu (ispod medijana). Cijene uzoraka u kojima su identificirani ftalati u iznosu od 60 % pripadaju skupini ispod vrijednosti medijana, odnosno 75 % ne uračunavši uzorak br. 1 zbog karakterističnog odstupanja cijene roll-ona od dezodoransa u spreju.

ZAKLJUČAK:

Kozmetički proizvodi koji sadrže parabene u većini se slučajeva podudaraju s navedenom deklaracijom dok ftalati u potpunosti odstupaju. Prema tome, potrebne su strože kontrole utjecaja ambalaže na proizvode niže cjenovne kategorije kod preparata za osobnu njegu. Kod analize proizvoda u kojima su identificirani parabeni i ftalati, usporedbom s njihovom cijenom, nisu dobiveni nedvojbeni rezultati, stoga je potrebno provesti detaljnije studije.

9. SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE:

Determination of parabens in cosmetic products using GC-MS method

OBJECTIVES:

Qualitative determination of parabens in cosmetic products using GC-MS method as well as the comparison of the results with those declared on the products. In addition, another objective was to find a correlation between the price range below the median value and paraben presence in cosmetic products.

DESIGN:

Experimental study

SETTINGS:

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

MATERIALS AND METHODS:

In this study 25 underarm cosmetics were chosen, more precisely 15 sprays, 5 roll-ons and 4 sticks. The cosmetic product number 5 was prepared as 2 samples: number 5 was prepared identically to the procedure described, while the 5(2) sample was additionally stirred. Sprays, previously applied to Petri Dishes, were left to volatilize in the digester. Then, all of the 26 samples were prepared by dissolving them with chloroform, and followed by filtration. Finally, the samples were transferred to glass cuvettes for the qualitative analysis using GC-MS method. Analysis was performed by a method that simultaneously records the total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m/z.

RESULTS:

Parabens were detected in two samples: number 1 and 4. In sample number 1 methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben and butyl paraben were identified from which ethyl paraben was not printed on the declaration label. In samples number 1, 9, 17, 22 and 24 diethyl phthalate was determined but was not declared anywhere. Sample number 5 was free from parabens before and after it was stirred. The 3 price medians were calculated (Microsoft Excel): for the entire personal care products' group (14.66), only for the sprays (14.35) and roll-ons (43.98). Taking into consideration the 14.66 median, 50 % of the paraben- and phthalate- positive products are above and 50 % below the median. Taking just roll-ons into account, both products (100 %) were classified as the lower price range group. 60 % of the phthalate-positive samples are below price median, or 75 % excluding sample number 1 because of the characteristic price difference between a deodorant and a roll-on.

CONCLUSION:

Cosmetic products identified with parabens were mostly in accordance with the declaration label. On the other hand, opposite results were obtained with phthalates. A more reliable control system of packaging influence on the product itself is highly suggested (especially in the lower price range). The results of the correlation between the prices of the products where parabens and phthalates have been identified are ambiguous, hence more thorough statistical analysis and studies are required.

10. ŽIVOTOPIS

Anamarija Tegeltija rođena je 23. rujna 1991. godine u Splitu.

Osnovnu školu „Blatine-Škrape“ u Splitu pohađala je od 1998. do 2006. godine. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja osvaja 3. mjesto na Državnom natjecanju iz geografije 2004.godine kao i 4. te 6. mjesto 2005. i 2006. godine na Državnom natjecanju u poznavanju hrvatskog jezika. Također, kontinuirano sudjeluje na županijskim natjecanjima iz matematike.

Treću gimnaziju u Splitu upisuje 2006. godine gdje nastavlja nizati uspjehe na dvama državnim natjecanjima u poznavanju hrvatskog jezika (7. mjesto 2007. i 8. mjesto 2008.), a sudjeluje i na natjecanjima iz latinskog jezika.

Ostvarivši odličan uspjeh tijekom sve 4 godine srednjoškolskog obrazovanja, 2010. godine upisuje Studij farmacije u Splitu. Nakon učlanjenja u Udrugu studenata farmacije (CPSA) 2013. godine, 2015. godine imenuje se generalnim kontaktom i voditeljem javnozdravstvenih kampanja podružnice u Splitu. U travnju 2016. godine osvaja priznanje Međunarodne federacije studenata farmacije (IPSF) kao najaktivniji pojedinac PCE Online (Patient Counselling Event) natjecanja. Jedan je od četiriju članova Organizacijskog odbora CSE-a (Clinical Skills Eventa) u Splitu održanog u lipnju 2016. godine. U veljači 2016. godine sudjelovala je u vođenju vježbi iz kolegija Biokemija lijekova. Od ožujka do rujna 2016. godine odrađuje stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Grad s odličnim preporukama. Sudjelovala je na raznim kongresima iz struke, a također je i aktivni volonter u projektu prevođenja Cochrane sažetaka.

Tečno govori engleski (*Certificate in Advanced English (CAE), University of Cambridge*), talijanski (*Diploma avanzato di lingua italiana „Firenze“ –DALI (C1), Accademia Italiana di lingua*) i španjolski jezik. Služi se i francuskim (*DELF B1*) te portugalskim (A2) jezikom.