

# Kvalitativna analiza kozmetičkih priprava primjenom GC-MS metode

---

**Stolica, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:167:941760>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**I  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Martina Stolica**

**KVALITATIVNA ANALIZA KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA PRIMJENOM GC-MS  
METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2016./2017.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Davorka Sutlović**

**Su-mentor:**

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

**U Splitu, 27. rujna 2017.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Martina Stolica**

**KVALITATIVNA ANALIZA KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA PRIMJENOM GC-MS  
METODE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2016./2017.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Davorka Sutlović**

**Su-mentor:**

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

**U Splitu, 27. rujna 2017.**

## 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** je prihvaćena na XX. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na XX sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i XX sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** prof. dr.sc. Davorka Sutlović  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

### **KVALITATIVNA ANALIZA KOZMETIČKIH PRIPRAVAKA PRIMJENOM GC-MS METODE** Martina Stolica, broj indeksa: 70

#### **Sažetak:**

**Ciljevi istraživanja:** Kvalitativna analiza kozmetičkih proizvoda primjenom GC-MS metode, usporedba dobivenih rezultata s podacima navedenim na deklaraciji proizvoda, te pronalazak poveznice između cijene 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 30 uzoraka krema i seruma. Uzorci su prema cjenovnom rasponu, a prema cijenama za pakiranje od 50 ml, raspoređeni u dvije kategorije: skupina 1- 14 proizvoda čija je cijena niža od 200 kn i skupinu 2- 16 proizvoda čija je cijena viša od 200 kn. Za analitičku pripremu uzoraka korišteno je 0,1 g uzorka. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala: kloroforma, etil acetata i N-heksana u jednakom omjeru ( $v/v/v= 1:1:1$ ), te su potom postavljeni u digestor na sušenje u struji zraka. Kvalitativna analiza je izvršena GC-MS metodom (plinska kromatografija sa spektrometrom masa). Za usporedbu dobivenih rezultata, jedan uzorak je otopljen samo u acetonitrilu.

**Rezultati:** Kvalitativnom analizom u uzorcima je identificirano u rasponu 13-35 supstanci po uzorku, dok ih je na pojedinačnim deklaracijama navedeno u rasponu 11-105. Posebno je ispitivano prisustvo 7 štetnih i nepoželjnih sastojaka: butilhidroksitoluena (BHT), ciklopentasiloksana, ciklotetrasiloksana, benzofenona, trietanolamina (TEA) i dietilftalata, te je svaki od njih pronađen u barem jednom ispitivanom uzorku. . Od ukupno 30 ispitivanih uzoraka, u 24 uzorka (80%) je dokazano prisustvo nepoželjnih sastojaka. Ovim istraživanjem u 43% uzoraka dokazano je odstupanje od navedenih deklaracija proizvoda. Usporedbom dobivenih karakterističnih signala kromatograma dokazano je da izbor otapala nije imao veći utjecaj na dobiveni rezultat.

**Zaključak:** Cijena nije bila u korelaciji s podudaranjem deklariranih i detektiranih sastojaka u proizvodu. Potrebno je provođenje detaljnijih studija kojim bi se mogle utvrditi mogućnosti detektiranja iznimno niskih koncentracija istraživanih nepoželjnih sastojaka.

**Ključne riječi:** Kozmetički pripravci, serumi, GC-MS metoda

**Rad sadrži:** 54 stranice, 15 slika, 4 tablice, 47 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. prof.dr.sc. Marija Definis-Gojanović, dr.med. predsjednik
2. prof.dr.sc. Neira Puizina-Ivić, dr.med. član
3. prof.dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing. član mentor

**Datum obrane:** 27. rujna 2017.

**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. XX as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.XX and Faculty Council of School of Medicine, session no.XX  
**Mentor:** Davorika Sutlović. PhD, full prof.  
**Technical assistance:** Maja Veršić Bratinčević, PhD

### QUALITATIVE ANALYSIS OF COSMETIC PRODUCTS BY GC-MS METHOD

Martina Stolica, index number: 70

#### Summary:

#### Diploma Thesis Title:

Qualitative analysis of cosmetic products by GC-MS method.

**Objectives:** Qualitative determination of ingredients in cosmetic products using GC-MS method, as well as the comparison of the results with those declared on the product. In addition, another objective was to find a correlation between the price range and presence of certain ingredients in cosmetic products.

**Design:** Experimental study

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

**Material and Methods:** In this study, 30 creams and serums were chosen. Samples were divided in two categories according to price range, group 1- 14 products costing less than 200 kn, and group 2 – 16 products costing more than 200 kn. For analytic preparation we used 0,1 g of samples. Samples were extracted with the mix of organic dissolvents (chloroform : ethyl acetate : hexane = 1:1:1) and then were left to volatilize in digester. Analysis was performed by GC-MS method (gass chromatography-mass spectrometry). In order to compare the results, one of the samples was dissolved in pure acetonitrile.

**Results:** Qualitative analysis of samples showed 13-35 ingredients detected by GC-MS method per sample, while individual declarations of products had 11-105 listed ingredients. All seven of the tested, potentially harmful and undesirable ingredients (butylhydroxytoluene, cyclopentasiloxane, cyclotetrasiloxane, benzophenone, triethanolamine and diethyl phthalate), were detected using qualitative analysis by GC-MS method, and all of them were detected in at least one tested sample. In 30 tested samples, 24 of them were positive for at least one tested undesirable ingredient.

Between seven samples which had two or more undesirable ingredients detected, four of them belong to the group 2, and three of them in the group 1. In this work, deviation from declaration on products was proved using GC-MS method in 43% of samples. Comparing characteristic signals of chromatograms, it has been proved that choice of dissolvents does not affect final result.

**Conclusion:** Price didn't show correlation with matched declared and detected ingredients in products. More thorough analysis and studies are required to determine possibilities of detecting extremely low concentrations of the tested undesirable ingredients.

**Key words:** Cosmetic products, serums, GC-MS method

**Thesis contains:** 54 pages, 15 figures, 4 tables, 47 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Marija Definis-Gojanović – PhD, full prof. chairperson
2. Neira Puizina Ivić – PhD, full prof. member
3. Davorka Sutlović – PhD, full prof. supervisor

**Defence date:** 27<sup>th</sup> September 2017

**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 Koža čovjeka .....	3
1.2 Kozmetički proizvodi .....	5
1.2.1 Zakonska regulativa .....	6
1.3 Proizvodi za njegu lica – kreme i serumi .....	7
1.3.1 Farmakokinetika kozmetičkih proizvoda .....	7
1.3.2 Farmakodinamika kozmetičkih proizvoda .....	8
1.4 Sastav i djelovanje krema i seruma .....	8
1.4.1 Najčešći nepoželjni sastojci u kozmetičkim pripravcima .....	12
1.5 Instrumentalna analiza .....	15
1.5.1 Kromatografija .....	15
1.5.1.1. Plinska kromatografija .....	16
1.5.1.2. Spektrometrija masa.....	17
1.5.1.3. Vezana tehnika plinska kromatografija sa spektrometrom masa.....	17
2. CILJEVI.....	19
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1 Kemikalije i uzorci za analizu .....	22
3.2 Postupak pripreme uzorka za analizu .....	22
3.3 Instrumentalna analiza i radni uvjeti GC-MS metode .....	23
4. REZULTATI.....	25
4.1 Ispitivanje navedene deklaracije uzoraka .....	26
4.2 Kvalitativna analiza uzoraka .....	28
4.3 Usporedba dobivenih rezultata i cijene uzoraka.....	37
5. RASPRAVA .....	38
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. LITERATURA .....	43
8. SAŽETAK .....	47
9. SUMMARY .....	50
10. ŽIVOTOPIS .....	53



## ZAHVALA

Hvala mojoj mentorici profesorici dr.sc. Davorki Sutlović i ko-mentorici dr.sc. Maji Veršić-Bratinčević na stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala vam i na savjetima, susretljivosti, vremenu, beskrajnom strpljenju i svesrdnoj pomoći.

Hvala mojim roditeljima, sestri i dečku na brizi, potpori i razumijevanju tijekom studija.

Upravo zbog vas sam sve ono što jesam danas.

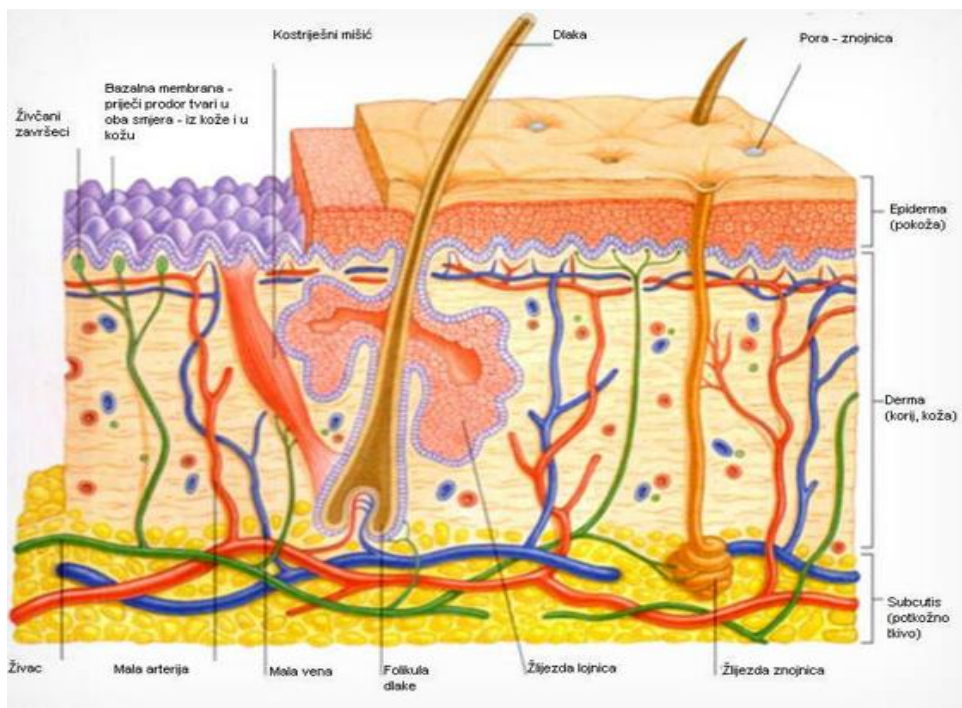
## **1. UVOD**

Kozmetika (grč. κοσμητική) je pojam koji označava umijeće ukrašavanja i njege tijela te pripravke koji se pritom koriste. Arheološki nalazi u Egiptu iz 4200. pr. Kr. pokazuju da su prvi kozmetičari bili svećenici, koji su se bavili i liječenjem. Sumerski ep o Gilgamešu (oko 2000 god. pr. K.) otkriva uporabu pigmenata i mirisnoga bilja, a kasniji egipatski tekstovi (oko 1550. god. pr. K.) donose, uz medicinske savjete, upute za pripremanje kozmetičkih preparata (1). U antičkoj Grčkoj, gdje se kozmetika povezivala s medicinom, kozmetička je sredstva pripremao ljekarnik (farmakopol). U zbirci Corpus Hippocraticum, nastaloj pod utjecajem grčkog liječnika Hipokrata (460.- 377. pr. K.), navode se mnogobrojni kozmetički pripravci, slični egipatskim, za poljepšavanje lica, protiv ispadanja kose i protiv sunčanih pjega, za uklanjanje suvišnih dlaka, masažu i ugodan miris. U doba Rimskoga Carstva nastale su i prve znanstvene rasprave o kozmetici, a najopširnije, sustavno djelo u 4 knjige napisao je Kriton (1. st.), liječnik cara Trajana. U 19. stoljeću kozmetika, već priznata grana medicine, dobila je i znanstvene temelje. Ujedno je započela industrijska proizvodnja kozmetičkih sredstava. U 20. stoljeću kozmetička se industrija naglo razvila, pri tom okupljajući različite stručnjake. Otvoren je velik broj visokih škola za kozmetiku na farmaceutskim fakultetima u SAD-u i Europi. U Hrvatskoj je prije II. svjetskog rata nastava iz područja kozmetologije bila dio programa Medicinskoga fakulteta u Zagrebu. Danas na dermatovenerološkim klinikama Medicinskog i Stomatološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu djeluju odjeli za dermatološku kozmetologiju (1).

Prema EU kozmetičkoj direktivi (76/768/EEC) (2), a i po propisima Republike Hrvatske (3), kozmetički proizvod je svaka tvar ili pripravak namijenjen za stavljanje u doticaj s različitim vanjskim dijelovima ljudskog tijela (koža, kosa, nokti, vanjski spolni organi) ili sa zubima i sluznicom usne šupljine, i to isključivo ili pretežito poradi njihova čišćenja, parfimiranja, mijenjanja njihova izgleda i/ili korekcije tjelesnih mirisa i/ili njihove zaštite i održavanja u dobrom stanju.

## 1.1 Koža čovjeka

Koža je najveći čovjekov organ koji prekriva površinu cijelog tijela. Kod odrasle osobe, koža zauzima površinu od 1,2–2,3 m<sup>2</sup>, s težinom od oko 2 kilograma, i debljinom od 1,5 mm do 4 mm, ovisno o starosti i lokalizaciji na tijelu (7,8). Slobodna joj je površina prošarana tankim ukrštenim brazdama koje čine rombični crtež (9). Uloga kože je višestruka. Oblažuci cijelo tijelo ima važnu zaštitnu ulogu očuvanja tkiva i organa od traume, ultraljubičastog zračenja (UV), promjena temperature te djelovanja toksina i bakterija. Druge važne funkcije su sinteza vitamina D<sub>3</sub>, percepcija osjeta, imunološka obrana, termoregulacija i kontrola gubitka tekućine (7,10). Rođenjem su koža i njezini derivati u potpunosti formirani, a započinje kontinuirani ciklus obnove kože koji traje cijeli život (9).

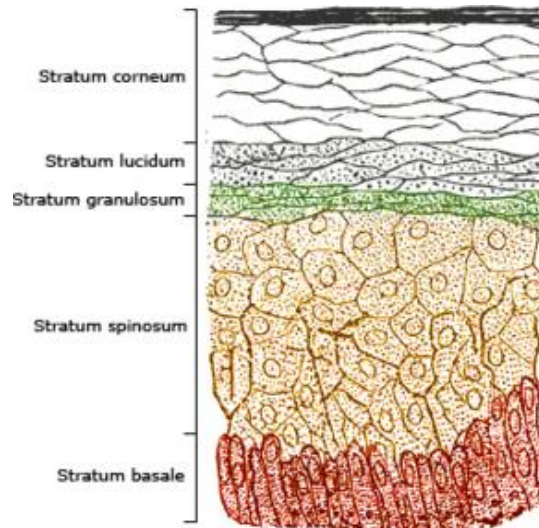


Slika 1. Shematski prikaz građe kože (11)

Dva sloja čine kožu, epidermis i dermis (slike 1, 2) koji se nalaze na potkožnom masnom tkivu (*lat.* tela subcutanea) (9).

Epidermis ne sadrži krvne žile, te je potpuno je ovisan o dermisu zbog prehrane i opskrbe kisikom koja se odvija difuzijom kroz dermoepidermalnu granicu. Epidermis se sastoji od nekoliko slojeva, a to su: temeljni sloj (stratum basale), nazubljeni sloj (stratum spinosum), zrnati sloj (stratum granulosum), svijetli sloj (stratum lucidum) i površinski, rožnati sloj (stratum corneum, SC). Keratinociti nastaju sazrijevanjem stanica iz temeljnog sloja te diferencijacijom izbijaju u površinske slojeve. Tako su keratinociti, u rožnatom sloju bez

jezgara te se tijekom vremena oljušte. Stanice rožnatog sloja najbrojnije su u epidermisu, a ovisno o dijelu tijela, taj sloj može sadržavati 10–100 slojeva stanica.



Slika 2. Građa epidermisa (12)

Stanice rožnatog sloja od velikog značaja su melanociti, Langerhansove stanice i Merkelove stanice. Melanociti proizvode pigment melanin koji je potreban kako bi se koža zaštitila od štetnog ultraljubičastog zračenja. Langerhansove stanice su imunosne stanice koje predočuju antigene limfocitima, a Merkelove stanice služe za percepciju nježnog dodira (9).

Funkcija dermisa je potpora epidermisu. Dermis se sastoji od 2 sloja: papilarnog i retikularnog. Papilarni dermis je smješten ispod epidermisa, a ispod njega retikularni dermis. Papilarni dermis je tanji, a sastoji se od rahlog veziva u kojem se nalaze kapilare, elastična i retikularna vlakna te nešto kolagena. Retikularni dermis je građen od gustog vezivnog tkiva. U njemu se nalaze kapilare, isprepletana elastična vlakna te deblje nakupine kolagenih vlakana. U retikularnom sloju nalaze se fibroblasti, mastociti i derivati epidermisa (7,8,9). Derivati epidermisa u dermisu važan su izvor epitelnih stanica koje mogu biti centar epitelizacije u slučajevima kada je epidermis uklonjen, primjerice kod opekline. Derivati epidermisa su apokrine žlijezde, žlijezde znojnice, žlijezde lojnice i folikuli dlaka koji se nalaze u dubokom sloju dermisa, a na licu se mogu nalaziti i u potkožnom tkivu. Bazalna membrana je dermoepidermalna granica epidermisa i dermisa. Obzirom da je dermoepidermalna granica vrlo neravna, tako se povećava površina kroz koju difuzijom prolaze hranjive tvari i kisik potrebni za metabolizam epidermisa.

## 1.2 Kozmetički proizvodi

Pod pojmom “kozmetički proizvodi“ podrazumijevaju se kreme, emulzije, losioni, gelovi i ulja za kožu, maske za lice, obojene podloge (tekućine, paste, prah), puderi za šminkanje, puderi za poslije kupanja, higijenski puderi, toaletni sapuni, sapuni za dezodoriranje, parfemi, toaletne vodice i kolonjske vode, pripravci za kupanje i tuširanje (soli, pjene, ulja, gelovi), depilatori, dezodoransi i sredstva protiv znojenja, bojila za kosu, proizvodi za kovrčanje, ravnanje i fiksiranje kose, proizvodi za pranje kose (losioni, suhi šamponi, šamponi), regeneratori (losioni, kreme, ulja), proizvodi za oblikovanje frizura (losioni, lakovi, briljantini), proizvodi za brijanje (kreme, pjene, losioni), šminka i proizvodi za skidanje šminke, proizvodi za njegu zuba i usta, proizvodi za njegu i bojenje noktiju, proizvodi za vanjsku intimnu higijenu, proizvodi za sunčanje i samotamnjenje, proizvodi za izbjeljivanje kože i proizvodi protiv bora (5).

Sredstva koja se nazivaju kozmeceuticima sadrže biološki aktivne sastojke kao što su peptidi, antioksidansi, vitamini te biljni ekstrakti (13). Riječ je o heterogenoj skupini bezreceptnih topikalnih (lokalnih) preparata, za koje se pretpostavlja da imaju pozitivan učinak na kožu (14). Najčešći sastojci kozmeceutika su tvari za ovlaživanje kože, retinoidi, antioksidansi i tvari za izbjeljivanje kože. Poput kozmetičkih proizvoda, kozmeceutici se također primijenjuju topikalno, ali se razlikuju u tome što sadrže potentne tvari koje mogu utjecati na biološku funkciju kože i dostavu nutrijenata u svrhu promicanja zdravlja kože (15).

Europska komisija odredila je Smjernice za deklariranje trajnosti kozmetičkih proizvoda. Prema smjernicama potrebno je navesti i popis sastojaka kao jedne od podataka istaknutih na ambalaži kozmetičkih proizvoda ispisan neizbrisivim, jasno čitljivim i vidljivim slovima. Sastojci se navode prema INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) nazivlju – Međunarodnom nazivlju sastojaka kozmetičkih proizvoda. Popis sastojaka navodi se silaznim redoslijedom s obzirom na njihovu masu u vrijeme kada su dodani kozmetičkom proizvodu. Sastojci u koncentracijama manjim od 1% mogu se navesti bilo kojim redoslijedom nakon sastojaka u koncentracijama većim od 1% (16). Europska komisija je, putem CosIng (Cosmetic Ingredient) baze, objavila popis tvari i sastojaka koji se mogu nalaziti u kozmetičkim proizvodima (17).

### 1.2.1 Zakonska regulativa

U našem je zakonodavstvu jedino mjesto za kozmetičke pripravke bilo u okviru predmeta opće uporabe kao posebna cjelina, s time da je propisana njihova kontrola (zdravstvena ispravnost) i obvezna registracija pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi putem posebnog povjerenstva. Tako je 2004. godine osnovano Povjerenstvo za kozmetiku s posebnom namjenom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi, koje broji 11 članova, pretežito farmaceuta raznih specijalnosti i dva dermatologa. Povjerenstvo razmatra svaki pojedini pripravak i temeljem dostavljene, i eventualno dodatno tražene dokumentacije, te stručnih i znanstvenih spoznaja o sastavnicama i mogućem djelovanju odobrava, ili ne odobrava, registraciju, odnosno izdavanje Rješenja za uvoz i/ili stavljanje pripravka u promet kao kozmetike s posebnom namjenom, uz točno određene uvjete i na određeno vrijeme (4).

U smislu kontrole kozmetičkih proizvoda, na snazi je Uredba EZ br. 1223/2009, od 30. studenog 2009., o kozmetičkim proizvodima koja je u Republici Hrvatskoj u primjeni od 11.07.2013. (5). Dokumentacija o podacima kozmetičkih proizvoda mora sadržavati sljedeće informacije i podatke:

1. opis kozmetičkog proizvoda koji omogućuje da se dokumentacija s podacima o proizvodu jasno poveže s kozmetičkim proizvodom,
2. izvješće o sigurnosti kozmetičkog proizvoda,
3. opis proizvodne metode i izjavu o sukladnosti s dobrom proizvodnom praksom,
4. ako je to opravdano zbog prirode ili učinka kozmetičkog proizvoda, dokaz o učinku za koji se tvrdi da ga posjeduje kozmetički proizvod,
5. podatke o bilo kakvim ispitivanjima na životinjama koje su izvršili proizvođač, njegovi zastupnici ili dobavljači u vezi s razvojem ili procjenom sigurnosti kozmetičkog proizvoda ili njegovih sastojaka, uključujući bilo koje ispitivanje na životinjama izvršeno kako bi se ispunili zakonski ili regulatorni zahtjevi trećih zemalja.

Dokumentaciju s podacima o proizvodu odgovorna osoba čuva deset godina od datuma kada je posljednja serija kozmetičkog proizvoda stavljena na tržište (14).

U Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ analiziraju se kozmetički proizvodi. Radi se provjera zdravstvene ispravnosti pri čemu se provjerava sastav (ograničeno dozvoljene i zabranjene tvari), sadržaj teških metala, mikrobiologija, stabilnost proizvoda, test učinkovitosti konzervansa, pH vrijednost i deklaracija. Također, i kvaliteta sirovina prolazi dodatnu provjeru (6).

### 1.3 Proizvodi za njegu lica – kreme i serumi

Kreme, masti i gelovi su, prema Ph.Eur.6 (Europska farmakopeja, 6.izdanje), vrste polu-čvrstih preparata za primjenu na koži. (*lat. praeparationes molles ad usum dermicum*) (18). Prema njihovoj namjeni, kreme su raznolika skupina kozmetičkih pripravaka. Njima se koža može čistiti i njegovati; one su kreme posebne namjene i mogu štititi kožu od vanjski učinaka, izbjeljivati je, dezodorirati, liječiti i uljepšati. Tehnološki su, najčešće, emulzije dviju tekućina koje se ne miješaju, poput vode i ulja, prevedene u stabilne disperzije. Polu-čvrste su i stabilnije od losiona. Općenito, osnovna namjena krema jest njega kože održavanjem vlažnosti i opskrbljenosti vodom, humektansima i uljima (19). Prema djelovanju, serumi su preparati za njegu kože, koji sadrže visoke koncentracije aktivnih sastojaka, te tako imaju učinak protiv starenja, olakšavaju zategnuto lice, tretiraju ga protiv pigmentacija ili crvenila, ili pak neutraliziraju učinke bihevioralnog starenja kože, djelujući kao snažni antioksidansi. Molekularna struktura seruma je mnogo manja nego kod gelova i krema, tako da serum za lice može prodrijeti kroz kožu mnogo brže i dublje nego proizvodi koji sadrže ovlaživače. Poznati su po laganoj teksturi bez ulja koja nudi višu koncentraciju vitamina i antioksidansa od krema s uljima (20).

#### 1.3.1 Farmakokinetika kozmetičkih proizvoda

Sustavna apsorpcija nakon topikalne (lokalne) primjene je zanemariva. Ispitivanja bioekvivalencije ne rade se za topikalne (lokalne) formulacije, budući da se one zanemarivo malo distribuiraju u sistemska cirkulaciju, stoga se ne ispituje raspodjela, metabolizam i izlučivanje tvari (21). Transdermalnim putem primjene izbjegava se učinak prvog prolaska kroz jetre te metaboliziranje primijenjenih tvari (22). Transport kroz Stratum corneum je uglavnom pasivan proces i fizikalno - kemijske osobine će u mnogome odrediti sposobnost da supstance penetriraju kroz kožu. Stratum corneum i uske pukotine u Stratum granulosumu



čine čvrstu barijeru za vodu koja je nepropusna za većinu molekula većih od 500 kDa i koje su hidrofilne (23).

### 1.3.2 Farmakodinamika kozmetičkih proizvoda

Djelotvornost, podnošljivost i osobine kozmetičkih proizvoda određene su ne samo kroz individualne aktivne tvari, već i podlogom koja se koristi. Dokazano je da dobro oblikovana podloga može imati brojne pozitivne učinke, kao što su primjerice hidratacija i stabilizacija epidermalne barijere. Cjelokupan oblik pripravka zajedno s interakcijom između podloge, aktivne tvari i kože, utječe na djelotvornost proizvoda kao i na oslobađanje aktivne tvari (24). Nagelreiter i suradnici (25) naveli su da penetracija djelatnih tvari kroz kožu ovisi o podlozi kreme. Penetracija djelatnih tvari kroz kožu se razlikuje ovisno o korištenoj kremi jer na karakteristike otpuštanja iz topikalnih formulacija utječu termodinamička aktivnost, način miješanja kreme i topivost tvari u podlozi (26).

Kada se priča o farmakodinamici aktivnih djelatnih tvari u kremama za lice, najčešće se spominju neke od sljedećih tvari: vazodilatatori, vitamini, antioksidansi, biljni ekstrakti, UV filteri, aminokiseline, peptidi i proteini. Peptidi su lanci aminokiselina koji prodiru u dermis te stimuliraju proizvodnju kolagena. Antioksidansi, molekule koje sprječavaju stvaranje slobodnih radikala nakon izlaganja UV zračenju, su vrlo popularni sastojci kozmetike. **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.** Primjerice, trans-retinoična kiselina (aktivni oblik vitamina A) ulazi u interakciju s proteinima nuklearnih receptora, dovodi do interakcije sa specifičnim sekvencama DNA te utječe na transkripciju, što rezultira povećanjem ili smanjenjem ekspresije određenih proteina/enzima. To može dovesti do povećanja epidermalne proliferacije i diferencijacije (povećanje epidermalne debljine), povećanja produkcije epidermalnih tvari (glikozaminoglikana koji vežu vodu i tako povećavaju debljinu i hidrataciju epidermisa) te povećanja produkcije komponenti izvanstaničnog dermalnog matriksa kao što je kolagen (povećanje debljine dermisa). Neke tvari reduciraju produkciju kolagenaza i samim time razgradnju postojećeg kolagena. Retinoidi također smanjuju ekspresiju tirozinaze, ključnog enzima u pretvorbi tirozina u melanin, te time smanjuju hiperpigmentacije (27).

## 1.4 Sastav i djelovanje krema i seruma

Kreme se sastoje od uljne i vodene faze, emulgatora, konzervansa, kelatora, mirisa i aktivnih supstancija. Moguće su mnogobrojne kombinacije tih sastojaka u kremama (Tablica 1). Prema sastavu (tipu emulzije i količini ulja) kreme se dijele na emulgirane (U/V tip i V/U tip) i bezvodne (Tablica 2).

Tablica 1. Glavni sastojci krema (17)

<b>Komponenta kreme</b>	<b>Tipične supstancije (neki od primjera)</b>
<b>Uljna (masna faza)</b>	Ugljikovodici (parafin, skvalan, vazelin) Masti i ulja (maslinovo, suncokretovo, kakaovo, avokadovo ulje) Voskovi (pčelinji, karnauba) Masne kiseline (stearinska, oleinska, miristinska) Viši alkoholi (cetanol, stearyl, oktildodekanol) Esteri masnih kiselina (gliceril-esteri) Sintetički esteri (triesteri glicerola, esteri kolesterola, izopropilni esteri, oleil-oleat) Ostali (silikonska ulja)
<b>Vodena faza</b>	Pročišćena voda Humektansi (glicerol, propilen-glikol, sorbitol, tekući polietilen-glikoli) Ugušćivači (pektin, derivati celuloze, alginat) Alkoholi (etanol i izopropanol)
<b>Emulgatori</b>	Ionogeni, koji se dijele na kationaktivne (kvarterni amonijevi spojevi, polioksietilen - alilamini) i anionaktivne (sapuni masnih kiselina, soli sulfuriranih spojeva-natrijev laurilsulfat)  Amfoterni (lecitin, proteini)  Neionogeni (gliceril-monostearat, sorbitanski esteri masnih kiselina, alifatski masni alkoholi-cetilni, stearilni)
<b>Ostale tvari</b>	Alkalijske (natrijev hidroksid, kalijev hidroksid, trietanolamin) Mirisi i boje Kelatori (EDTA) Konzervansi (parabeni, sorbinska kiselina) Antioksidansi (vitamin E) Puferi (natrijev citrat, mliječna kiselina) Kozmeceutici (vitamini, UV-apsorbensi, aminokiseline, izbjeljivači)

Tablica 2. Podjela krema prema sastavu (tipu emulzije i količini ulja)(17)

Tip kreme	Osnovni sastojci		Tipični primjeri	
<b>U/V tip</b>	Uljna faza (%)	Emulgator	Proizvod	Nekadašnji naziv
	10-30	• Sapun viših masnih kiselina	Emolijentne kreme	Isperive kreme (Vanishing creams)
	30-50	• Neionogeni	Emolijentne kreme	Medium kreme
	50-85	• Proteinski • Sapun + neionogeni • Pčelinji vosak + boraks + neionogeni	Kreme za masažu Kreme za čišćenje Emolijentne kreme	Cold kreme
<b>V/U tip</b>	20-50	• Neionogeni	Emolijentne kreme	
	50-85	• Aminokiselina + neionogeni • Organski modif.minerali • Sapun + neionogeni	Kreme za masažu Kreme za čišćenje Emolijentne kreme	Noćne, hranjive kreme
<b>bezvodne</b>	100	• Uljasti gelirajući	Kreme za čišćenje i masažu	/

U vodi topljivi emulgatori (hidrofilni) čine emulzije tipa U/V, a lipofilni emulzije tipa V/U. Emulgatori i druge površinski aktivne tvari mogu se svrstati prema HLB (*engl.* hydrophile-lipophile balance) vrijednostima. HLB vrijednost govori o tipu emulzijskog sustava, ali ne daje podatke o potrebnoj količini emulgatora ni na njegov kemijski tip. Na kvalitetu krema, posebno na njihovu čvrstoću, najviše će utjecati veličina čestica emulzije i proces hlađenja. Fino dispergirane kreme s veličinom čestica ispod 20 mikrona lijepog su izgleda i dobre mazivosti.

Prema potrebi, kreme sadrže stabilizatore, konzervanse, antioksidanse, dezodoranse, repelente, bojila, mirise i neke poželjne aktivne tvari. Stabilizatori su pretežno hidrokoloide, koji povisuju viskoznost emulzijskog sustava. Antioksidansi se dodaju kad podloge podliježu

oksidacijskoj razgradnji i stvaranju ketonskih tijela. Od aktivnih tvari, kremama se mogu dodati antiseptici, antiseboroici, vitamini, enzimi, med i pčelinja mliječ te ekstrakti bilja. Sve sirovine za izradu krema moraju sadržajem i čistoćom odgovarati zahtjevima farmakopeje ili drugih priznatih propisa. Glavnim obilježjima krema smatraju se tip, veličina čestica, viskoznost i reološka svojstva, pH vrijednost i stabilnost. Emolijentne se kreme još ispituju i na stupanj disperznosti kao i na sposobnost otpuštanja vode pri 32 °C.

**Tip emulzije** može se utvrditi brojnim metodama, npr. razrjeđivanjem vodom, odnosno uljem, ispitivanjem ponašanja mrlja na filter papiru, bojenjem jedne od faza emulzije (metilenskim modrilom za vodenu fazu i sudanom III za masnu fazu), uz obavezno mikroskopsko utvrđivanje rezultata, primjenom takozvanih kobaltonih papira i mjerenjem električne vodljivosti pripravka.

**Veličina čestica emulzije** može se odrediti mikroskopiranjem, uz primjenu baždarenog mikromjera te pomoću Coulterova brojača.

**Viskoznost i reološka svojstva** određuju se različitim reoviskozimetrijskim instrumentima, npr. Hopplerovim reoviskozimetrom ili Haakeovim rotacijskim viskozimetrom.

**pH vrijednost** krema ispituje se elektrometrijski ili pomoću univerzalnih indikatorskih papira, i to u ekstraktu dobivenom od kreme i vode u omjeru 1:5. Dopuštena pH vrijednost za kreme je 3-8 ( pH vrijednost kože je 4,2-5,6) (28).

**Stabilnost** krema može se ispitati promatranjem uzoraka u normalnim uvjetima starenja ili ubrzanim metodama, tipa centrifugiranja, odnosno ispitivanja stabilnosti pripravka pri povišenim temperaturama. Tim postupcima se utvrđuje otpornost sustava prema koalescenciji (nakupljanju) čestica pojavama vrhnjenja, sedimentaciji i potpunom razdvajanju faza.

**Stupanj disperznosti** pri izradi emolijentnih krema, tipa pseudoemulzija, ispituje se tako da se povremeno špatulom nanese malo uzorka na staklenu ploču, pri čemu se krema uzorkuje od dna spremnika prema njegovoj površini. Ako krema nije dovoljno izmiješana, nebojene se kapljice vode makroskopske veličine vide golim okom; sljedeća se količina kreme nanese na drugo mjesto staklene ploče. Krema se može smatrati dovoljno stabilnom kada se u njoj ne vide nikakve kapljice vode.

**Sposobnost otpuštanja vode** ispituje se pri temperaturi od 32 °C. Na sedam objektnih stakalaca odvagane se po 0,30 g kreme i razmaže u tanki sloj. Nakon toga stakalca s kremom stave se u sušionicu, na 30-34°C. Sa četiri stakalca se svakih pola sata kontroliraju razlike težine, a sa tri stakalca se to čini svakog sata (ukupno pet sati). Razlika u početnoj i konačnoj masi predstavlja masu isparene vode, koja se iskazuje u postocima (29).

Razvojem farmaceutske industrije i novim tehnološkim otkrićima omogućeni su novi sustavi oblikovanja krema pored konvencionalnog emulzificiranja dvaju faza. Uklapanjem određenih tvari u emulzijske sustave dobiveni su kvalitetniji i iskoristiviji proizvodi.

Najviše ispitivanja povećanja transdermalnog prijenosa tvari posvećeno je oblikovanju kozmetičkih pripravaka s dodatkom pojačivača dermalne apsorpcije. Pojačivači dermalne apsorpcije lipidnom fluidizacijom povećavaju difuzivnost aktivnih tvari kroz rožnati sloj i tako smanjuju njegovu barijernu učinkovitost. Takav pristup povećava penetraciju raznih molekula, ali mnogi izazivaju iritacije (30).

Nano-nosači su jedan oblik pojačivača dermalne apsorpcije. To su čestice napravljene od polimera, lipida ili metala nanometarske veličine. Ukoliko su dovoljno malene, ove čestice mogu prodrijeti u najdublje slojeve kože, a djelatne tvari mogu biti prenošene na površini čestica ili u njihovoj jezgri. Nanočestice pružaju i mogućnost produljenog otpuštanja tvari (31). Nanočestice s uklopljenim kozmeceuticima za dermalnu primjenu moraju se zadržati na ili unutar pojedinih slojeva kože bez sistemskog učinka kako se ne bi prešla granica dermatokozmetičkog i transdermalnog ljekovitog pripravka (32).

#### 1.4.1 Najčešći nepoželjni sastojci u kozmetičkim pripravcima

Veliki je broj štetnih sastojaka koji se koriste u kozmetičkim preparatima. Neki od sastojaka, koji se smatraju izrazito nepovoljnima za ljudski organizam i zdravlje općenito, su butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), ciklometikon, fenoksietanol, propilparaben, aluminijski lauril sulfat i triklosan. Ti spojevi mogu imati cijeli niz negativnih posljedica, najčešće u vidu alergijskih reakcija, iritacija kože, ali neki i u vidu hormonskih poremećaja, konvulzija, povećanja opasnosti od obolijevanja od raka te povećanja mogućnosti pobačaja kod trudnica. Štetni sastojci koji se mogu naći u kozmetici najčešće se dodaju kako bi proizvod zaštitili, omekšali ili ga na neki drugi način učinili prihvatljivijim za korištenje

(42). Udruge za zaštitu potrošača bore se za jasnije deklaracije i povećane fontove, koje bi apsolutno svakome bile razumljive.

#### *Butilhidroksitoluen (BHT) - Sintetički antioksidans*

Prisustvo BHT-a dokazano je u nekim dezodoransima, parfemima, dekorativnoj kozmetici, pastama za zube te proizvodima za bebe. Izazivaju iritacije kože (npr. desni ili vlasišta) i alergije. Povezan je s problemima reprodukcije, razvojem poteškoća u učenju, ozbiljnim poremećajem deficita pažnje, kognitivnim i problemima s razvojem mozga, karcinomom dojke, prostate i štitnjače... BHT je endokrini disruptor, a prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije endokrini disruptor je „egzogen tvar ili spoj koji mijenja funkciju/funkcije endokrinog sustava i time dovodi do štetnih učinaka na zdravlje zdravog organizma, njegova potomstva ili (pod)populacija” (46). Mogu uzrokovati karcinome, defekte novorođenčadi i druge poremećaje razvoja. Bilo koji sustav u tijelu kontroliran hormonima može biti oštećen hormonskim disruptorima.

#### *Ciklopentasilosan i ciklotetrasiloksan - silikonski derivati*

Ciklopentasilosan i ciklotetrasiloksanse najčešće pronalaze u proizvodima za kosu i lice, kremama s zaštitnim faktorom i puderima za lice, u kojima se koriste za postizanje glatkoće i podatnosti. Obzirom da su po strukturi silikonski derivati mogu prouzročiti začepljenje pora i alergijske reakcije, te lakše iritacije kože ili očiju. Oba spoja pokazuju svojstva endokrinih disruptora. Ciklotetrasiloksan je klasificiran toksičnim za reprodukciju.

#### *Benzofenon*

U kozmetičke preparate se dodaje radi apsorpcije UV zraka, te na taj način produljio rok trajanja preparata. Dokazano je da može potaknuti alergijske reakcije, najčešće na koži ili očima, a povezan je i s poremećajem rada štitnjače. Također, ponekad se koristi za zaštitu samog proizvoda, zbog transparentne ambalaže.

#### *Fenoksietanol*

Poznat je i kao aromatski alkohol, a najčešće se koristi kao fiksator mirisa ili za sprječavanje razmnožavanja bakterija. Nalazi se u sapunima, šamponima, kremama za lice i tijelo te u proizvodima za higijenu djece. Njegova upotreba smatra se „okidačem“ za pojavu ekcema i alergijskih reakcija, a posebno je opasan za djecu, kojoj može prouzročiti i probleme sa živčanim sustavom. Ovaj konzervans je re-evaluiran od strane francuske Nacionalne agencije za sigurnost lijekova i medicinskih proizvoda (ANSM - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé) 2012. godine. Smatra se hematotoksičnim i hepatotoksičnim. Obzirom na 1% koncentraciju u proizvodima i dermalnu apsorpciju, agencija je ocijenila ovaj sastojak sigurnim za upotrebu kod odraslih, ali ne i za djecu mlađu od 3 godine. No, Agencija samo daje mišljenje o proizvodima, a ukoliko ne postoji regulatorni tekst, industrija ga može u potpunosti ignorirati.

#### *Trietanolamin (TEA)*

Često je korišten kao dodatak za vlaženje u kozmetičkim pripravcima, pH regulator ili kao baza za šampone, zajedno s masnim kiselinama. TEA može izazivati alergijske reakcije, iritacije očiju, suhoću kože i kose. Kao prekursor nitrozamina u reakcijama s drugim komponentama može formirati nitrozamine, izuzetno karcinogene supstancije.

#### *Ftalati – dietilftalat*

Ftalati su supstance koje se prikrivaju u kozmetičkim preparatima pod nazivom „mirisi“ (*engl. fragrances*). Lako se apsorbiraju preko noktiju, kože i pluća, a prema navodima organizacije Greenpeace i brojnim studijama, mogu izazvati rak jetre i bubrega, kao i brojne reproduktivne abnormalnosti i deformacije, smanjenu razinu testosterona i kvalitete sperme u muškaraca te preuranjeni pubertet u djevojčica. Zakon ne zahtjeva potpunu deklaraciju mirisa, bez iscrpnog navoda na deklaraciji ne možemo znati kada se ftalati nalaze u proizvodu skriveni iza naziva „mirisi“. Za izbjegavanje kontakta s tom skupinom spojeva, preporučuje se izbjegavati umjetne mirise i kupovati proizvode bez mirisa (43).

## 1.5 Instrumentalna analiza

Instrumentalne metode analize predstavljaju suvremene elektrokemijske mjerne tehnike, potenciometriju, konduktometriju i voltometriju, te kromatografske i spektrometrijske metode analize, tekućinsku i plinsku kromatografiju (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), masena spektrometrija (MS), NMR, IR, UV/VIS, CD). Instrumentalne analize podrazumijevaju provođenje kvalitativne i/ili kvantitativne analize. Kvalitativnom instrumentalnom analiza uzoraka dokazuje se prisustvo komponenti, dok se kvantitativnom analizom određuje u kojoj je mjeri supstanca prisutna u uzorku. (33)

Kvalitativna analiza provodi se jednostavnom usporedbom s bazama podataka (bibliotekama), dok je za kvantitativnu analizu potrebno izraditi baždarne krivulje. Osnova kvantitativnog određivanja u kromatografiji je mjerenje površine ili visine signala.

### 1.5.1 Kromatografija

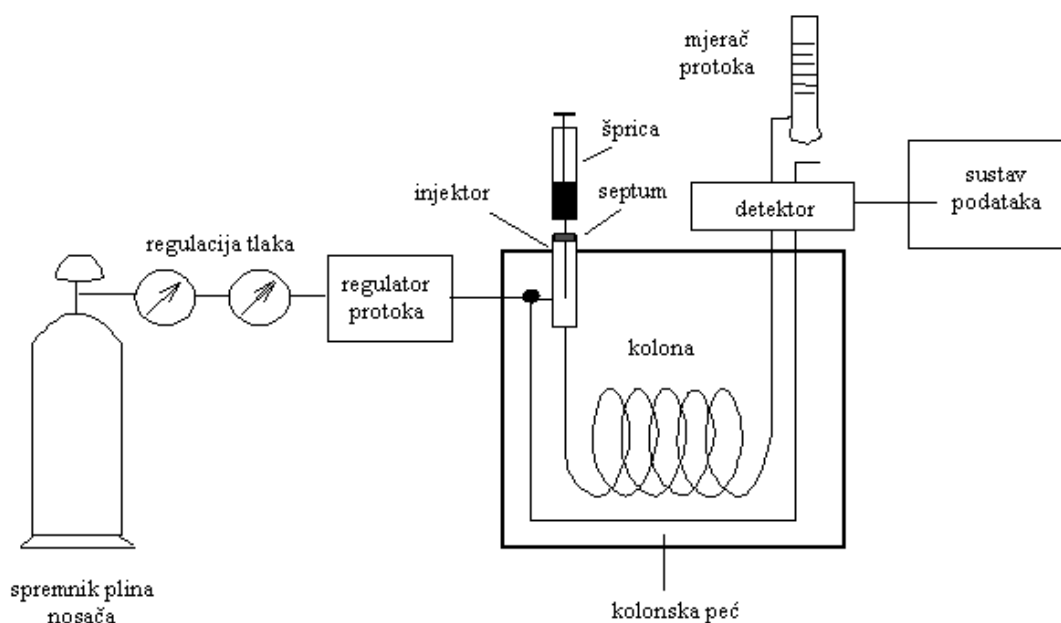
Kromatografija (*grč.*chroma- boja, graphein- pisati) označava veliki broj različitih analitičkih sustava i tehnika, ali ono što je svima zajedničko je stacionarna (nepokretna) i mobilne (pokretna) faze. Uzorak vođen mobilnom, pokretnom, fazom prolazi kroz stacionarnu fazu. Razdvajanje sastojaka smjese temelji se na različitoj brzini gibanja komponenti nošenih mobilnom fazom, odnosno, različitom afinitetu analita prema stacionarnoj fazi. Kromatografske metode su analitičke tehnike za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim maticama uzoraka. Razlikujemo dvije glavne vrste kromatografskih metoda: **kromatografija na stupcu**, u kojima stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza (plin, tekućina ili superkritični fluid) kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije i **plošnu kromatografiju**, pri čemu je stacionarna je faza nanosena na ravnu plohu ili u pore papira, a mobilna faza prolazi kroz stacionarnu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije. (34)

Na apscisi kromatograma prikazuje se retencijsko vrijeme ( $R_t$ ) u minutama, a predstavlja vrijeme izlaska karakterističnog signala na detektor. Na ordinati se prikazuje odaziv detektora, odnosno intenzitet signala.



### 1.5.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (*engl.* gas chromatography, GC) je najčešće korištena tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koje je moguće prevesti u plinovito stanje, a da pritom ne dođe do njihovog raspada, pri temperaturama od nekoliko stotina Celzijevih stupnjeva. Plinska kromatografija podrazumijeva sve kromatografske metode u kojima je pokretna faza plin, dok stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća. Temelji se na razdvajanju analita između plinovite mobilne faze i tekuće faze imobilizirane na inertnom nosaču stijenci kapilarne cjevčice (kapilarne kolone). Plinovita mobilna faza kemijski je inertna. Najčešće korišteni plinovi su helij, dušik, argon i vodik. (35) Upareni uzorak injektira se kroz injektor na početku kolone i prolazi kroz nju nošen mobilnom fazom (plinom nosiocem) pod povišenim tlakom. Sastojci uzorka se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava razdvajaju na kromatografskoj koloni i u različitom vremenu detektiraju na detektoru. Budući da je veliki broj tvari koje zadovoljavaju ovaj kriterij, plinska se kromatografija nametnula kao standardna metoda analize u forenzičnim laboratorijima zadnjih desetljeća. 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 dobivenom signalu (36). Glavne sastavnice plinskog kromatografa su injektor, kromatografska kolona i detektor, shematski prikazano na slici broj 3 (37).



Slika 3. Shematski prikaz uređaja za plinsku kromatografiju (38)

#### 1.5.1.2. Spektrometrija masa

Instrumentalna tehnika identifikacije kemijskih struktura mjerenjem relativnih molekulskih masa uzorka naziva se spektrometrija masa. Spektrometrijom masa uzorci se ioniziraju, te dolazi do razdvajanja fragmenata koji potom ulaze u magnetski analizator (39). 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 (40).

#### 1.5.1.3. Vezana tehnika plinska kromatografija sa spektrometrom masa

Plinska kromatografija sa spektrometrom masa (*engl.* gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) je zlatni standard kod kvantitativne i kvalitativne forenzične i kliničke analize lijekova, sredstava ovisnosti i bioloških uzoraka. Plinska kromatografija je pogodna za odjeljivanje i kvantifikaciju sastojaka, a spektrometar masa za kvalitativnu analizu (37). Omogućuje učinkovito razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih i poluhlapljivih tvari. Karakteristični podaci dobiveni korištenjem plinskog kromatografa su vrijeme zadržavanja (identifikacija sastojaka) i površina ispod vrška koja je proporcionalna količini sastojka. Kao rezultat masene spektroskopije nastaje maseni spektrogram, jedinstven za svaku tvar (prikazuje relativnu zastupljenost nastalih fragmenata u ispitivanom spoju) pa se često naziva i „otiskom prsta“ kemijskih spojeva. Plinskim kromatografom se fragmentiraju uzorci, a masenim spektrometrom identificiraju na način da se spektar masa uspoređuje sa bibliotekama referentnih spektara, primjerice: NIST (*engl.* National Institute of Standards and Technology), EPA (*engl.* Environmental Protection Agency), Wiley i SWGDRUG (*engl.* Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs). Zbog niskog limita detekcije pogodnija je od klasičnih biokemijskih metoda za kvantifikaciju supstanci (41).

Prednosti GC-MS metode su visoka osjetljivost, preciznost, pouzdanost, selektivnost i male količine uzoraka potrebnih za analizu. Veliki nedostatak predstavlja visoka temperatura injektora zbog čega se termički labilne tvari mogu razgraditi prilikom prolaska kroz kolonu. Nedostatak metode je i dugotrajan i skup postupak pripreme, posebice pri kvantitativnim analizama (35).

Razlike u kemijskim svojstvima između različitih molekula smjese omogućuju razdvajanje molekula tijekom putovanja uzorka kroz kolonu. Molekule trebaju različito vrijeme za prolazak kroz kromatografsku kolonu, što spektrometru masa omogućuje da

„hvata“, ionizira, ubrzava, zakreće i detektira ionizirane molekule zasebno. 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, odnosno retencijsko vrijeme, a na ordinati signal u obliku vrška proporcionalan koncentraciji određene tvari (35). Spektri masa na apscisi imaju označen omjer mase i naboja,  $m/z$ , karakterističan za određenu kemijski spoj, a na ordinati njihove relativne intenzitete. (37)

## **2. CILJEVI**

Ciljevi ovog rada bili su:

- 1) Usporediti broj deklariranih sastojaka sa ambalaže proizvoda s brojem identificiranih sastojaka koristeći GC-MS.
  
- 2) Kvalitativnom analizom odrediti prisustvo nepoželjnih sastojaka u kozmetičkim proizvodima (kremama i serumima) primjenom GC-MS metode.
  
- 3) Odrediti povezanost cjenovnog ranga proizvoda s identificiranim, nepoželjnim sastojcima u ispitivanim kozmetičkim preparatima.

### **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;

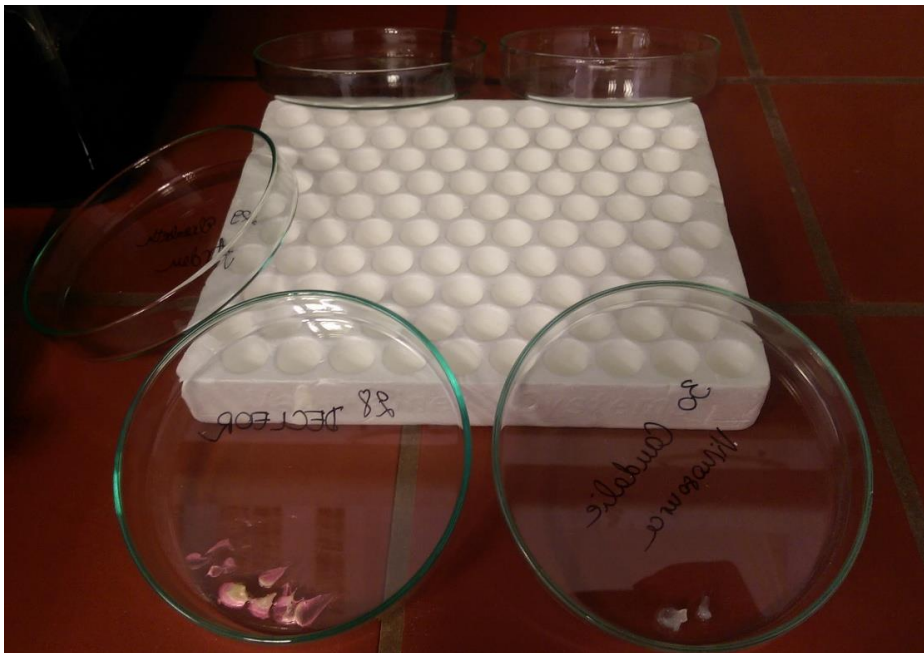
Heksan p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka;

Acetonitril p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka.

Provedeno je kvalitativno ispitivanje uzoraka, za određivanje njihovog sastava, s fokusom na sedam sastojaka: butilhidroksitoluen (BHT), ciklopentasiloksan, ciklotetrasiloksan, benzofenon, fenoksietanol, trietanolamin (TEA) i dietilftalat. Ukupno je ispitano 30 uzoraka krema i seruma.

### 3.2 Postupak pripreme uzorka za analizu

Svi su uzorci označeni pripadajućim laboratorijskim brojem, a prikaz nekih od označenih uzoraka vidimo na slici 4.



Slika 4. Ispitivani uzorci na sušenju u digestoru

Za pripremu uzoraka korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak mase 0,1 g. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala, kloroforma, etilacetata i N-heksana u jednakom omjeru (v/v/v= 1:1:1), te su potom postavljeni u digestor na sušenje u struji zraka. Uzorci u Petrijevim zdjelicama nekoliko su puta ispirani kloroformom kako bi se cijeli nanoseni sadržaj otopio. Nakon što su otopljeni uzorci su filtrirani, preneseni su u staklene tubice za GC-MS analizu. Za usporedbu dobivenih rezultata uzorci su otapani i u čistom acetonitrilu, filtrirani, otopljeni u kloroformu te prebačeni u staklene tubice za GC-MS analizu.

### 3.3 Instrumentalna analiza i radni uvjeti GC-MS metode

U ovom istraživanju za kvalitativnu analizu ispitivanih uzoraka korišten je plinski kromatograf s masenim spektrometrom: Shimadzu GCMS-QP2010 (Slika 5). Kromatografska analiza pripremljenih ekstrakata izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa, metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (*engl.* Total ion chromatogram, 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  $\mu$ L (splitless)
  - temperatura injektora 250 °C
  - protok plina nosioca 1,0mL/min
  - ukupno trajanje temperaturnog programa: 29 minuta:
    - I 100 °C izotermno 0,5 min
    - II 5 °C /min do 220 °C
    - III 275 °C izotermno 5 min





Slika 5. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa, Shimadzu GCMS-QP2010 (44)

Usporedba dobivenih kromatograma, odnosno kvalitativna analiza, izvedena je koristeći spektre masa iz biblioteka referentnih spektara Wiley 9 i NIST 107.

#### **4. RESULTATI**

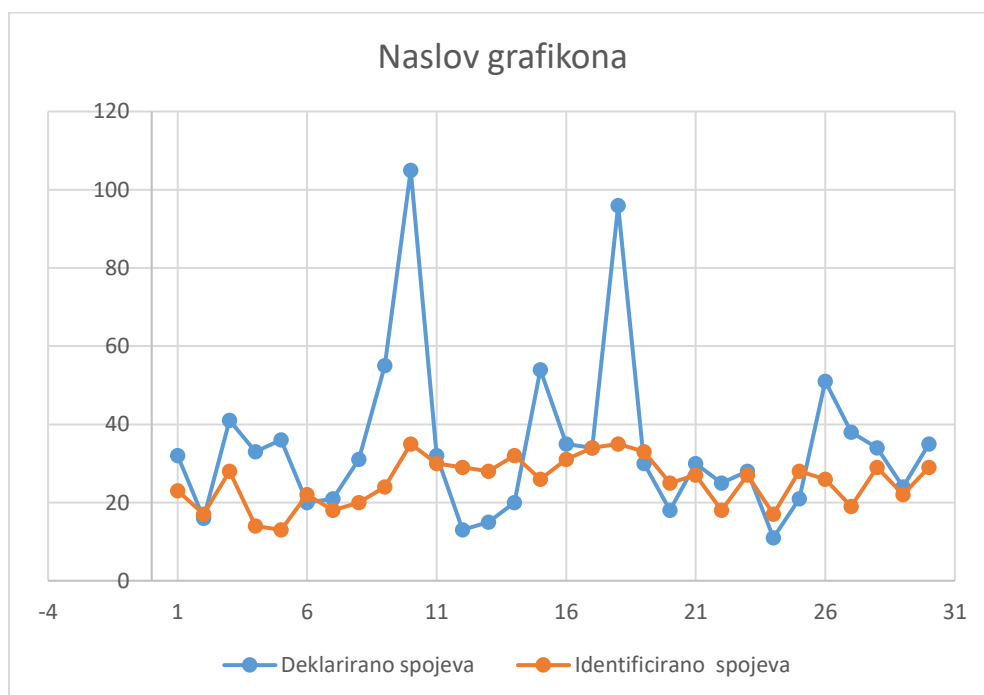
#### 4.1 Ispitivanje navedene deklaracije uzoraka

Tablica 3. Usporedba broja deklariranih sastojaka i sastojaka identificiranih GC-MS metodom

<b>Redni broj uzorka</b>	<b>Deklarirano spojeva</b>	<b>Identificirano spojeva</b>	<b>Broj pronađenih štetnih sastojaka u uzorku (od istraživanih 7)</b>
1	32	23	1
2	16	17	1
3	41	28	1
4	33	14	3
5	36	13	1
6	20	22	1
7	21	18	1
8	31	20	/
9	55	24	1
10	105	35	1
11	32	30	4
12	13	29	1
13	15	28	1
14	20	32	/
15	54	26	3
16	35	31	1
17	34	34	/
18	96	35	2
19	30	33	1
20	18	25	/
21	30	27	2
22	25	18	/
23	28	27	1
24	11	17	1

25	21	28	2
26	51	26	1
27	38	19	1
28	34	29	1
29	24	22	2
30	35	29	/

Za kontrolu deklaracije navedene na poleđini proizvoda uspoređen je broj deklariranih sastojaka svakog pojedinog uzorka s brojem sastojaka dokazanih GC-MS metodom. Kvalitativnom analizom 30 ispitivanih uzoraka identificirano je u rasponu 13-35 pronađenih tvari po uzorku, dok ih je na pojedinačnim deklaracijama navedeno u rasponu 11-105 (slika 6). Od ukupno 30 uzoraka, u 17 uzoraka deklaracije su pokazale odstupanje broja deklariranih sastojaka za  $\leq 7$  sastojaka u usporedbi sa brojem identificiranih sastojaka, a kod preostalih 13 uzoraka broj deklariranih sastojaka se razlikovao za  $> 7$  sastojaka od broja identificiranih sastojaka (tablica 3).



Slika 6. Grafički prikaz usporedbe broja pronađenih i deklariranih tvari po uzorku. Os x prikazuje redni broj uzorka, dok os y prikazuje broj tvari u uzorku. Plavom bojom je označen broj deklariranih tvari, a narančastom bojom je označen broj pronađenih tvari.

## 4.2 Kvalitativna analiza uzoraka

Rezultati dobiveni analizom uzoraka, koristeći GC-MS metodu, prikazani su tablično i grafički (tablica 4 i slike 7-14).

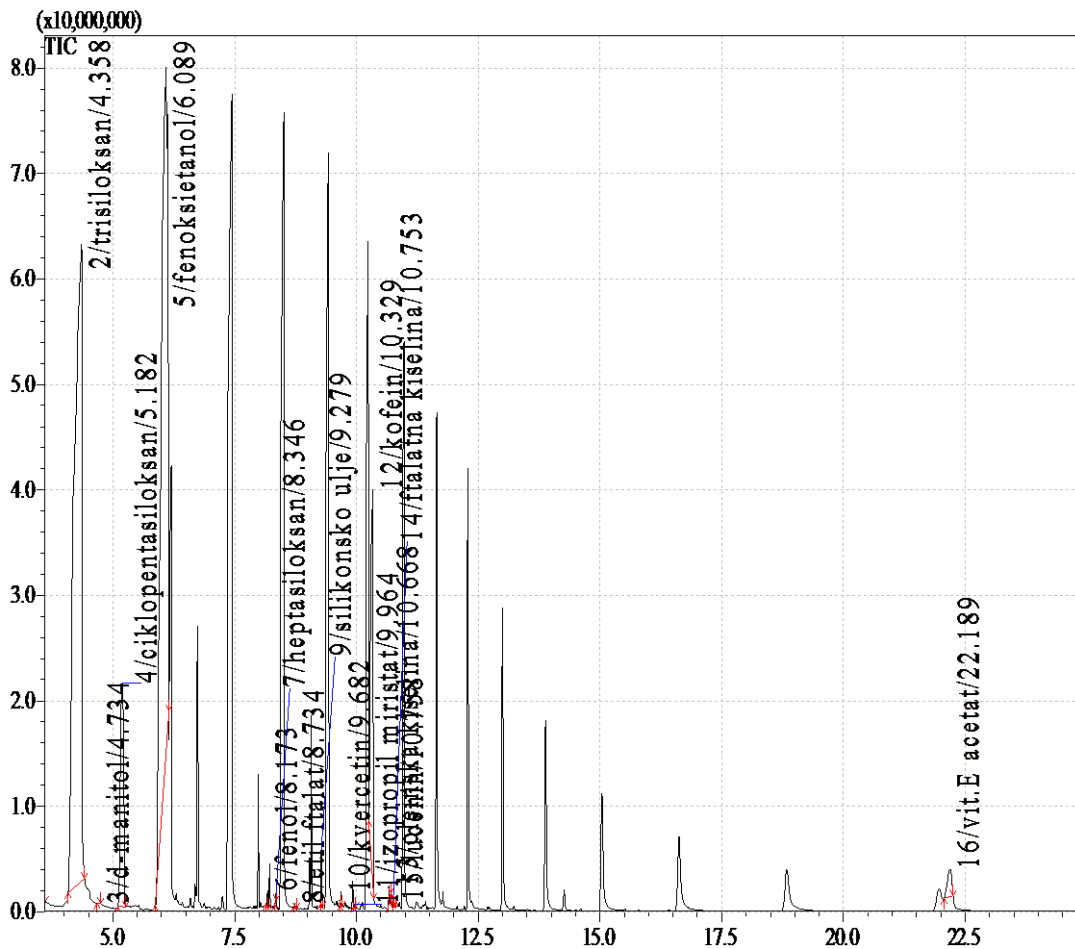
Kvalitativnom analizom 30 uzoraka GC-MS-om, pronađeno je svih 7 ispitivanih sastojaka (butilhidroksitoluen (BHT), ciklopentasiloksan, ciklotetrasiloksan, benzofenon, trietanolamin (TEA) i dietilftalat), a svaki od njih je pronađen u barem jednom ispitivanom uzorku (tablica 4).

Tablica 4. Popis 7 ispitivanih (štetnih) tvari i uzorci u kojima su identificirane

<b>Ispitivani spojevi</b>	<b>Uzorci u kojima je dokazano prisustvo ispitivanih spojeva</b>	<b>Ukupni broj uzoraka u kojima je dokazano prisustvo ispitivanih spojeva</b>
<b>butilhidroksitoluen</b>	11., 18., 21.	3
<b>ciklopentasiloksan</b>	2., 3., 4., 5., 10., 11., 12., 13., 15., 27., 29.	11
<b>ciklotetrasiloksan</b>	4., 29.	2
<b>benzofenon</b>	11.	1
<b>fenoksietanol</b>	1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 9., 10., 11., 12., 15., 16., 18., 21., 23., 24., 25., 26., 27., 28.	21
<b>trietanolamin</b>	25.	1
<b>dietilftalat</b>	15., 19.	2

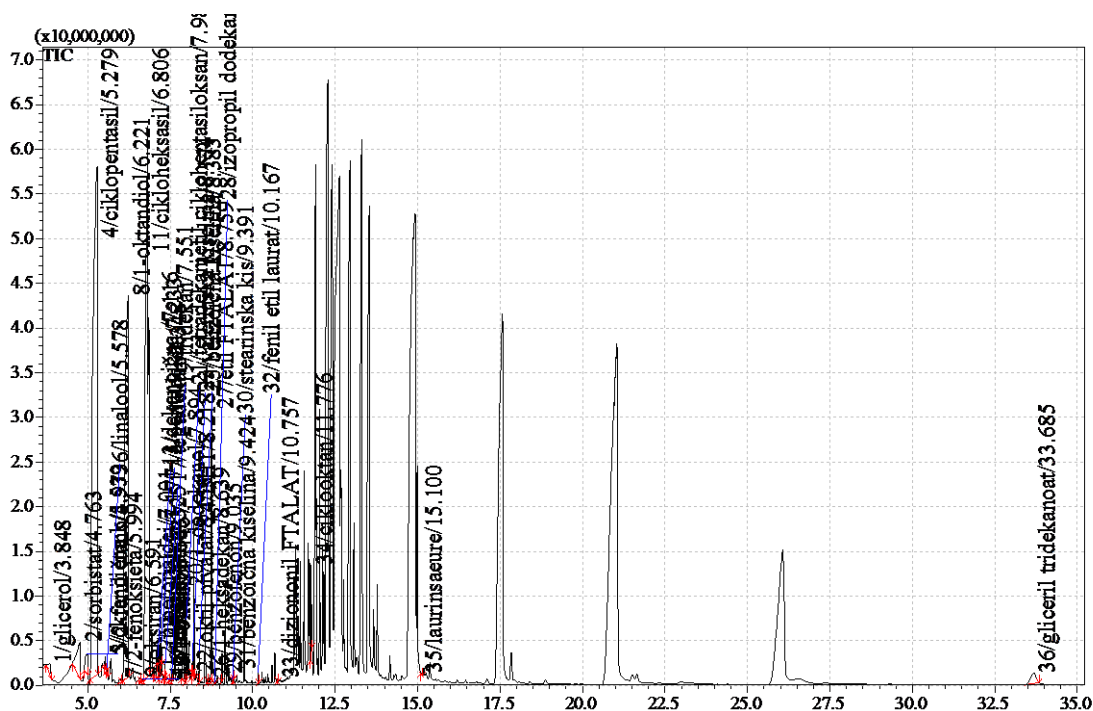
Kvalitativnom analizom dobiveni su i obrađeni kromatogrami svih uzoraka, a izdvojeno i prikazano je njih 7 (Slike 7-13) u kojima je pronađen najveći broj ispitivanih nepoželjnih sastojaka.

U uzorku broj 4 dokazano je prisustvo ciklopentasiloksana, ciklotetrasiloksana i fenoksietanola, kao što je prikazano na slici 7.



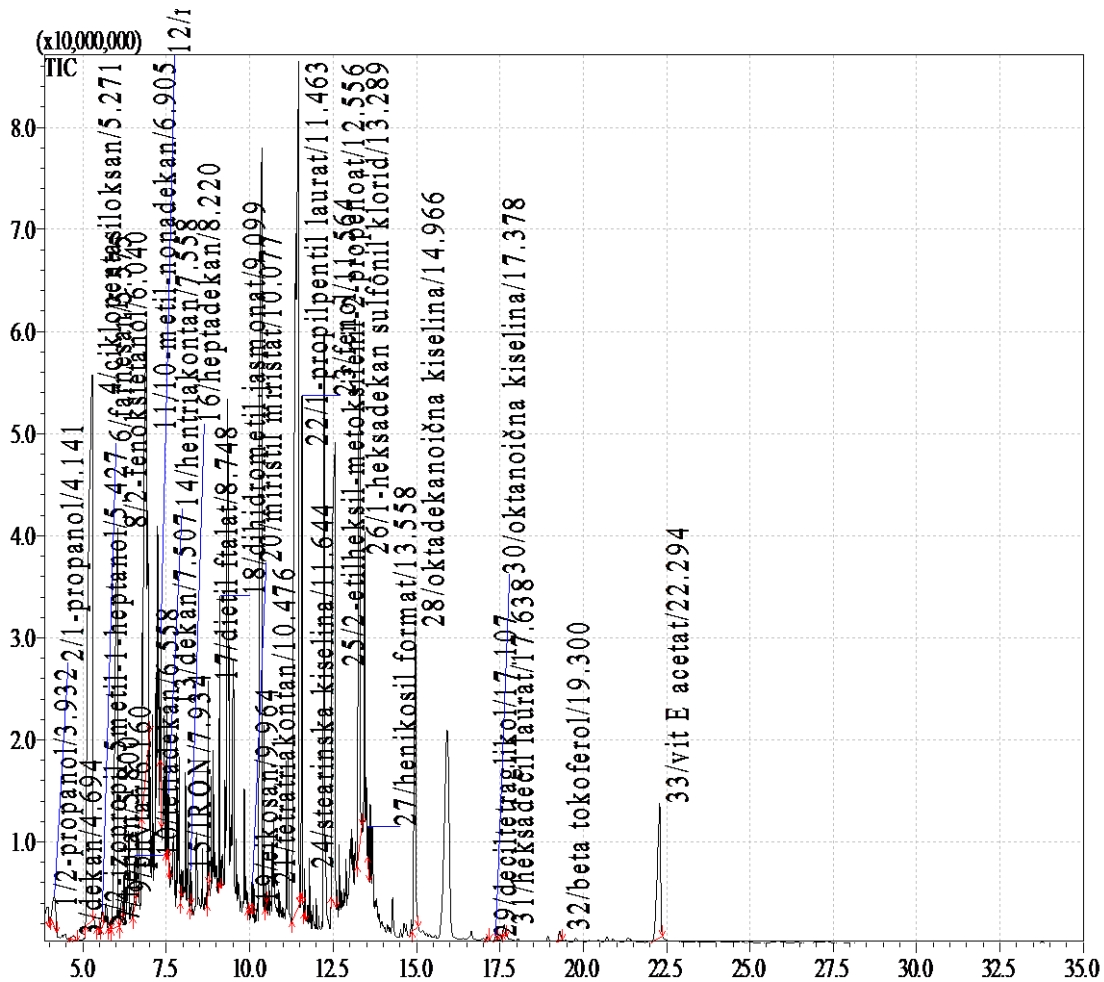
Slika 7. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 4, analiziranog GC-MS tehnikom. Os x prikazuje vrijeme zadržavanja uzorka u koloni (retencijsko vrijeme, RT), dok os y prikazuje intenzitet tvari proporcionalan koncentraciji tvari. U ispitivanom je uzorku dokazano prisustvo ciklopentasiloksana (RT=5,182), ciklotetrasiloksana (RT=5,912) i fenoksietanola (RT=6,089).

U uzorku broj 11 dokazano je prisustvo butilhidroksitoluena, ciklopentasiloksana, benzofenona i fenoksietanola s karakterističnim retencijskim vremenima, prikazano na slici 8.



Slika 8. Ukupni ionski kromatogram uzorka br.11, 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 butilhidroksitoluena (RT=8,218), ciklopentasiloksana (RT=5,279), benzofenona (RT=9,035) i fenoksietanola (RT=5,994).

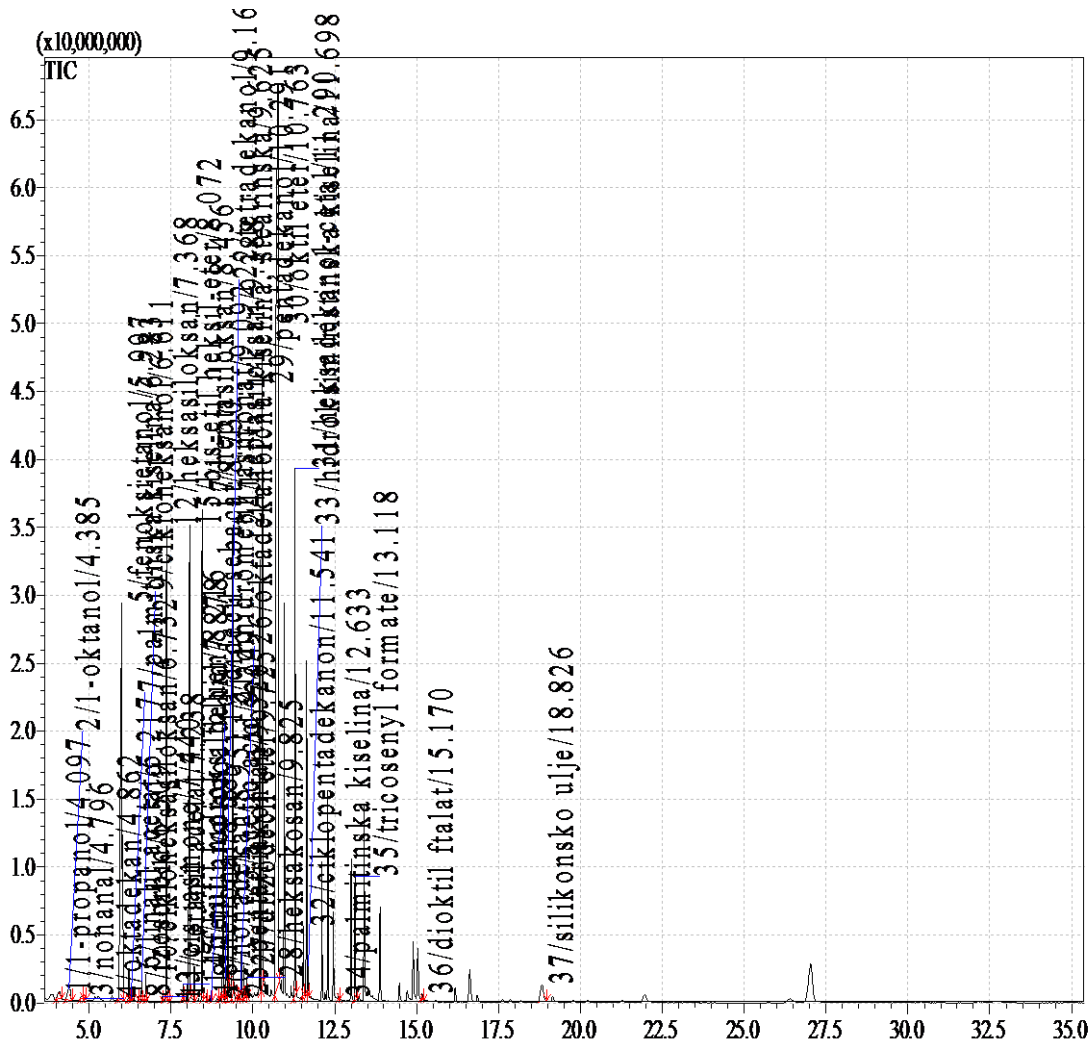
U uzorku broj 15 dokazano je prisustvo ciklopentasiloksana, fenoksietanola i dietilftalata, kao što je prikazano na slici 9.



Slika 9. Ukupni ionski kromatogram uzorka br.15, 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 ciklopentasiloksana (RT=5,271), fenoksietanola (RT=6,040) i dietilftalata (RT=8,748).

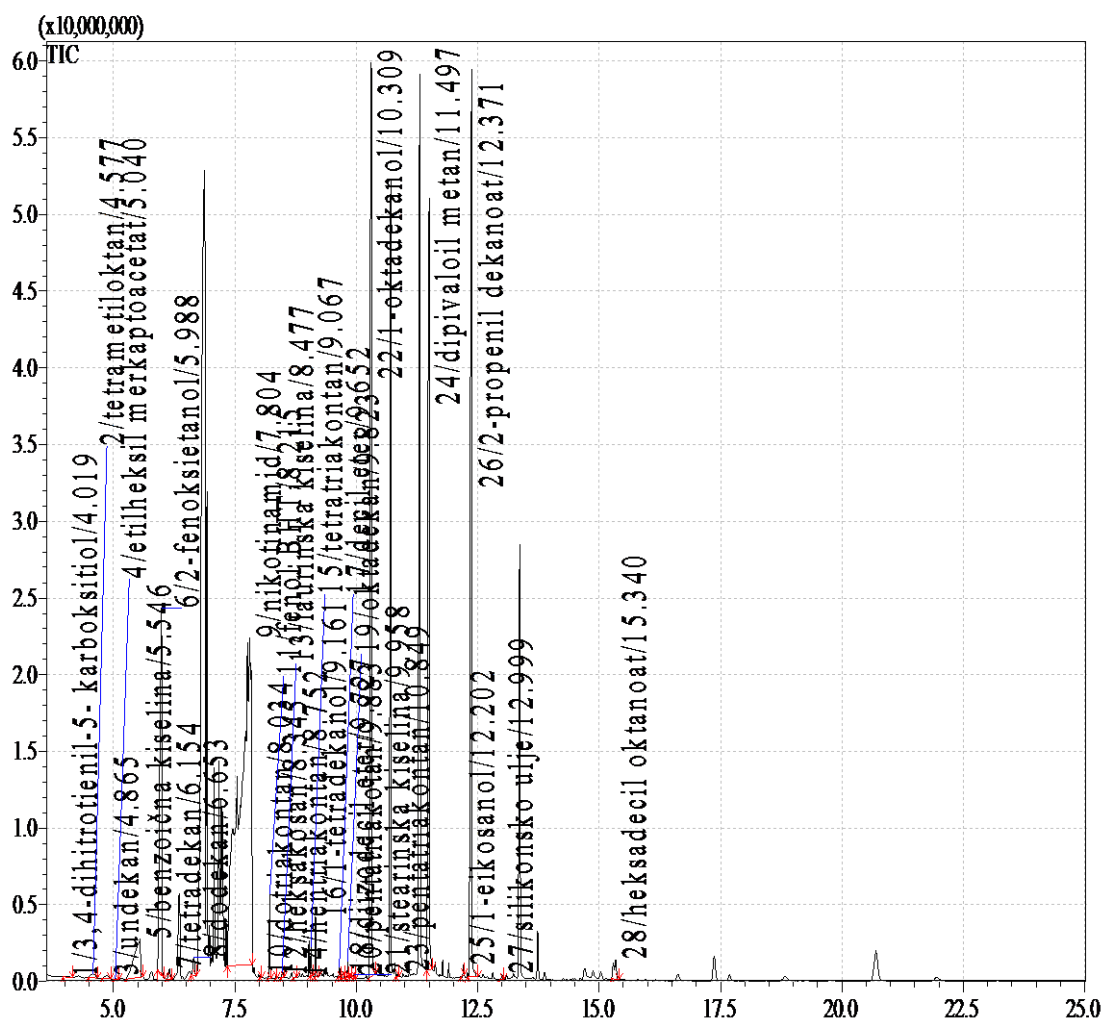


U uzorku broj 18 dokazano je prisustvo butilhidroksitoluena i fenoksietanola, kao što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Ukupni ionski kromatogram uzorka br.18, 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 butilhidroksitoluena (RT=8,216) i fenoksietanola (RT=5,997).

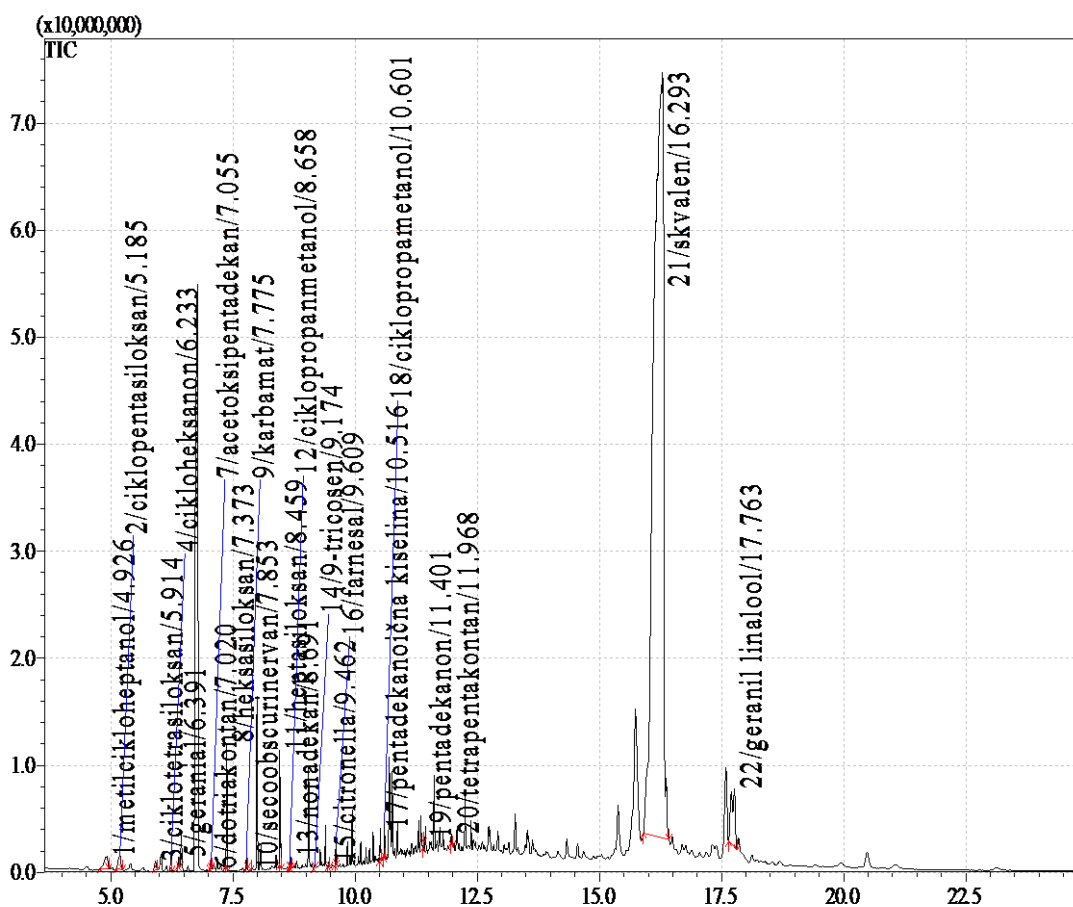
U uzorku broj 21 dokazano je prisustvo butilhidroksitoluena i fenoksietanola, kao što je prikazano na slici 11.



Slika 11. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 21, analiziranog GC-MS tehnikom. Os x prikazuje vrijeme zadržavanja uzorka u koloni (retencijsko vrijeme, RT), dok os y prikazuje intenzitet tvri proporcionalan koncentraciji tvri. U ispitivanom je uzorku dokazano prisustvo butilhidroksitoluena (RT=8,215) i fenoksietanola (RT=5,988).



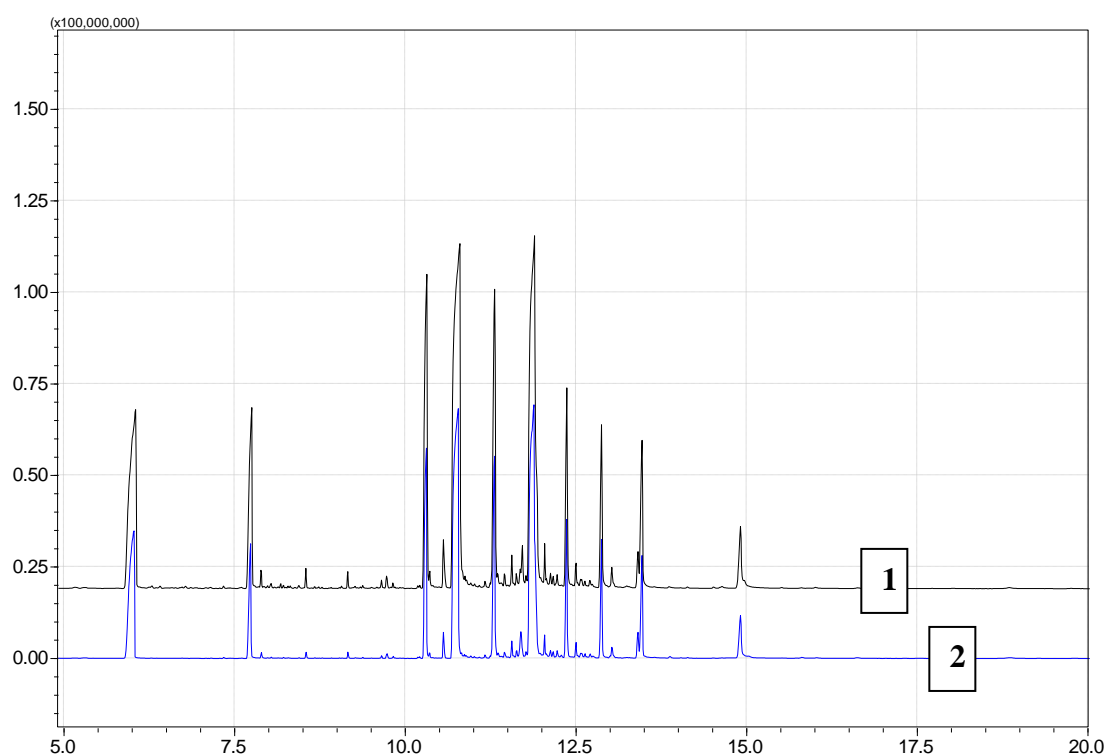
U uzorku broj 29 dokazano je prisustvo ciklopentasiloksana i ciklotetrasiloksana, kao što je prikazano na slici 13.



Slika 13. Ukupni ionski kromatogram uzorka br. 29, 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 ciklopentasiloksana (RT=5,185) i ciklotetrasiloksana (RT=5,914).

Za usporedbu dobivenih rezultata GC-MS metodom, uzorak 2 pripremljen je na dva načina, koristeći smjesu otapala i čisti acetonitril (opisano u poglavlju 3.2. Postupak pripreme uzorka za analizu).

Usporedbom dobivenih karakterističnih signala obakromatograma, može se uočiti gotovo potpuno podudaranje dobivenih signala (Slika 14), čime je dokazano da odabir otapala nema veći utjecaj na dobiveni rezultat. Ipak, kao otapalo za ekstrakciju uzorka za GC-MS analizu, za daljnju pripravu uzorka odabrana je smjesa otapala kloroforma, N-heksana i etil acetata. Korištenje smjese otapala uvijek ima prednost u odnosu na samo jedno otapalo, jer se smjesom otapala povećava mogućnost ekstrakcije većeg broja komponenti iz uzorka.



Slika 14. Usporedba kromatograma dobivenih analizom uzorka br. 2 ekstrahiranog koristeći:

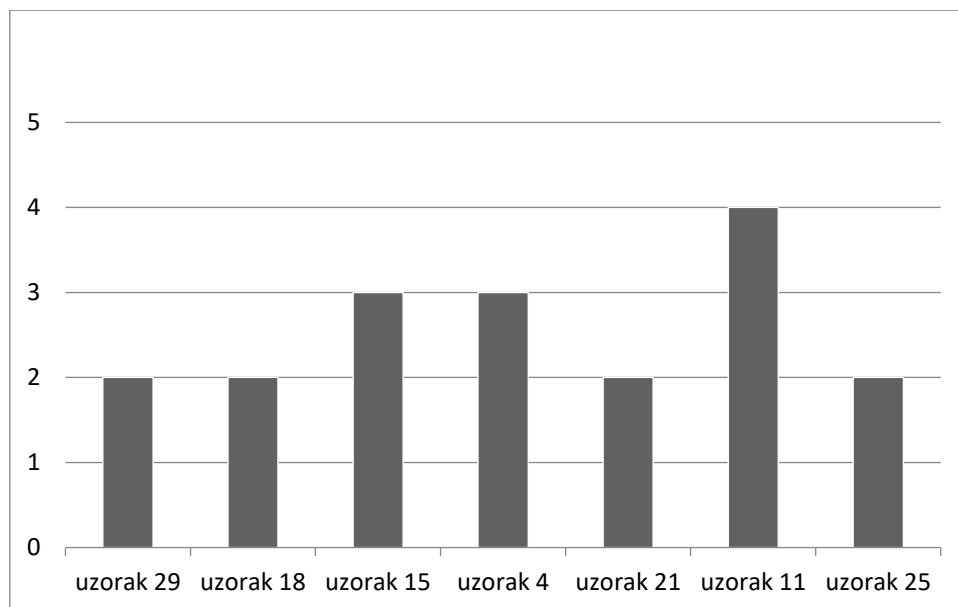
- smjesu otapala (kloroform, n-heksan i etilacetat)- kromatogram 1
- acetonitril - kromatogram 2

### 4.3 Usporedba dobivenih rezultata i cijene uzoraka

Kao srednja cjenovna vrijednost uzoraka uzet je iznos od 200 kn, te su uzorci prema cijenama raspoređeni u dvije kategorije, oni cijene niže od 200 kn (skupina 1) i oni više od 200 kn (skupina 2). U skupinu 1 spada 14 uzoraka, dok ih 16 spada u skupinu 2. Od 7 uzoraka u kojima je identificirano 2 ili više nepoželjnih sastojaka, 4 spadaju u kategoriju skupljih od 200 kn, a 3 spadaju u kategoriju jeftinijih od 200 kn.

Svih 6 uzoraka, u kojima nije identificiran nijedan od 7 nepoželjnih sastojaka, spada u skupinu 1, odnosno skupinu „jeftinijih“ proizvoda.

U jednom uzorku dokazana su 4 ispitivana nepoželjna sastojka, u dva uzorka 3 takva sastojka, a u četiri uzorka dokazano je prisustvo 2 „nepoželjna“ ispitivana sastojka (slika 15).



Slika 15. Grafički prikaz usporedbe cijene uzoraka i broja nepoželjnih identificiranih sastojaka. Na apscisi su prikazani uzorci poredani od najskupljeg prema najjeftinijem, dok je na ordinati prikazan broj identificiranih nepoželjnih sastojaka.

## **5. RASPRAVA**

Od ukupno 30 uzoraka, u 17 uzoraka deklaracije su pokazale odstupanje broja deklariranih sastojaka za  $\leq 7$  sastojaka u usporedbi sa brojem identificiranih sastojaka, a kod preostalih 13 uzoraka broj deklariranih sastojaka se razlikovao za  $> 7$  sastojaka od broja identificiranih sastojaka (tablica 3). Dobivenim rezultatima, koji upućuju na neispravnost i nepodudaranje s navedenim deklaracijama u 43% proizvoda (nešto manje od pola ispitivanih uzoraka), dolazi se do zaključka da bi proizvodi očito trebali prolaziti strože kontrole kvalitete. Kao moguća opravdanja razlike u broju deklariranih i identificiranih sastojaka treba uzeti u obzir još jedan segment, a to je vjerojatnost težeg očitavanja kromatograma i nemogućnost identifikacije hidrofилnih sastojaka uzoraka zbog metode pripreme uzoraka za obradu (organska otapala) i same tehnike identifikacije.

Priprema uzorka za analizu pokazala se razmjerno jednostavnom i dostatnom za identifikaciju istraživanih spojeva. Korištenjem različitih organskih otapala za ekstrakciju, radi usporedbe dobivenih rezultata GC-MS analizom, nije dokazana nikakva značajnija razlika.

Za uočavanje moguće poveznice između cijene proizvoda (tzv. „brendova“) i ispravnosti i preciznosti navedenih deklaracija odabrani su proizvodi šireg cjenovnog raspona. Obzirom na rezultate prikazane u poglavlju 4.3., viša cijena proizvoda nije jamstvo ispravnosti deklaracije u odnosu na jeftinije proizvode.

Od cjelokupnog broja analiziranih uzoraka, samo u njih 6 nije potvrđeno prisustvo nijednog od 7 ispitivanih štetnih sastojaka (uzorci 8, 14, 17, 20, 22 i 30). Svih 6 navedenih uzoraka spada u skupinu proizvoda jeftinijih od 200 kn, odnosno skupinu 1, te se svi mogu kupiti u ljekarnama i specijaliziranim prodavaonicama, za razliku od nekih proizvoda u kojima su identificirani nepoželjni sastojci, a mogu se nabaviti u drogerijama.

Jedan od interesantnijih, u ovom radu istraživanih sastojaka, poznat po svom negativnom utjecaju na ljudski organizam i okoliš, dietil ftalat, koristi se, i može ga se pronaći u PVC proizvodima, omekšivačima i plastifikatorima. U slučaju pozitivnog rezultata na dietil ftalat razlog nije nužno dodavanje istog u proizvod, već postoji mogućnost da ftalati difundiraju u proizvod iz same ambalaže (45). Također, moguća je kontaminacija uzorka ftalatima koji su migrirali iz plastičnog pribora korištenog tijekom pripreme uzoraka za



analizu (kao što su plastične žličice i nastavci za pipete). Njihova identifikacija u kozmetičkim proizvodima upućuje na potrebu za provođenjem strože kontrole sastava proizvoda nakon samog pakiranja.

Zbog moguće niske hlapljivosti nekih od ispitivanih spojeva, priprema uzoraka za analizu trebala bi sadržavati veću količinu samog uzorka. Prema tome se postavlja pitanje da li je uopće moguće detektirati iznimno niske koncentracije istraživanih sastojaka jer postoji mogućnost preuranjenog hlapljenja pa supstanca uopće neće ni stići na detektor? Za odgovore na ta pitanja poželjno proširiti ispitivanje nekim daljnjim studijama.

Potrebno je provođenje daljnjih, kontroliranih studija koje bi pomogle u uočavanju negativnih učinaka sastojaka kozmetike, do kojih dolazi akumulacijom u organizmu zbog učestale i dugotrajne primjene na kožu u malim koncentracijama. Potencijalni štetni sastojci su nedovoljno istraženi, a redovito se mogu pronaći u kozmetičkim proizvodima.

Posljednjih desetljeća vlada zaokupljenost javnosti o istraživanjima o opasnim spojevima u dječjim igračkama, odjeći i štetnim sastojcima u prehrambenim proizvodima, pri čemu dolazi do podizanja svijesti o njihovoj štetnosti. Ipak, ljudi još uvijek nisu dovoljno educirani i osviješteni o sastavu kozmetičkih proizvoda koje koriste za njegu kože lica i tijela. Kupuju li se proizvodi prema privlačnim pakiranjima ili se pak smatra da su proizvodi renomiranih kozmetičkih kuća bezuvjetno kvalitetni? Mnogi konzumenti dugi niz godina koriste kozmetičke proizvode bez informiranja o sastavu proizvoda. Mnogi proizvodi ne pokazuju odmah nekakve negativne posljedice. Međutim, one se, osim ako nisu u vidu burne alergijske reakcije, ne moraju osjetiti odmah, te se posljedice mogu osjetiti i godinama kasnije (47). Nedovoljna educiranost potrošača o potencijalno štetnim sastojcima kozmetičkih proizvoda, kao i nesigurnost u ispravnost deklaracija daje ovom eksperimentalnom postupku kontrole metodički odabranih kozmetičkih proizvoda, suvislu i opravdanu svrhu.

## **6. ZAKLJUČCI**

- Kvalitativnom analizom 30 uzoraka kozmetičkih preparata dokazano je prisustvo minimalno 13, a maksimalno 35 sastojaka po uzorku primjenom GC-MS tehnike.
- 43% ispitivanih uzoraka nije pokazalo podudaranje s deklariranim sastojcima nakon analize provedene GC-MS-om.
- Od ukupno 30 ispitivanih uzoraka, u njih 24 je dokazano prisustvo ispitivanih nepoželjnih sastojaka i to: butilhidroksitoluena, ciklopentasiloksana, ciklotetrasiloksana, fenoksietanola, benzofenona, trietanolamina i dietilftalata.
- Suprotno očekivanom, svih 6 uzoraka u kojima nije identificiran nijedan od 7 sastojaka spadaju u skupinu 1, odnosno skupinu „jeftinijih“ proizvoda.
- Potrebno je provođenje detaljnijih i daljnjih studija koje bi omogućile detektiranje iznimno niskih koncentracija nepoželjnih i nedeklariranih sastojaka.



- 1) URL: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=33593#top> pristup [2017 Apr 26]
- 2) URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:31976L0768> pristup [2017 Jul 11]
- 3) URL: [http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_10\\_125\\_3093.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_10_125_3093.html) pristup [2017 Jul 11]
- 4) URL: [https://issuu.com/inpharma/docs/inph\\_1/44](https://issuu.com/inpharma/docs/inph_1/44) pristup [2017 Apr 26]
- 5) URL: <http://www.labosan.hr/novosti/zdravstvena-ispravnost-i-kontrola-kozmetickih-proizvoda/> pristup [2017 Apr 23]
- 6) URL: <http://www.farmaceut.org/kalendar-dogadjanja/strucna-dogadjanja-u-hrvatskoj/kozmetovigilancija-u-hrvatskoj-radionica-kako-prijaviti-nuspojave-na-kozmeticki-proizvod-121> pristup [2017 Apr 24]
- 7) Nikolić V, Koža, integumentum commune. Anatomija čovjeka. Zagreb: JUMENA; 101-105, 1990.
- 8) Ulger H, Erdogan N, Kumanlioglu S, Unur E. Effect of age, breast size, menopausal and hormonal status on mammographic skin thickness. *SkinResTechnol.* 284-289, 2003; 9 (3)
- 9) URL: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=33611> pristup [2017 Apr 24]
- 10) Jurić-Lekić G. Koža. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 369-381, 2005.
- 11) URL: <http://www.znanje.org/i/i2014/2014iii02/2014iii02020823/koza.jpg> pristup [2017 Apr 29]
- 12) URL: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/20/Skinlayers.png/300px-Skinlayers.png> pristup [2017 Apr 28]
- 13) Hamblin MR, Huang Y. Handbook of photomedicine, Boca Raton FL: CRC press, 347-348, 2013.
- 14) URL: <https://www.uptodate.com/contents/photoaging> pristup [2017 Apr 29]
- 15) Brandt FS, Cazzaniga A, Hann M. Cosmeceuticals: current trends and market analysis. *SeminCutan Med Surg*, 141-143, 2011.
- 16) URL: <https://zdravlje.gov.hr/o-ministarstvu/djelokrug-1297/sanitarna-inspekcija/predmeti-opce-uporabe-i-zastita-od-buke/kozmeticki-proizvodi-1832/1832> pristup [2017 Apr 27]
- 17) URL: <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/> pristup [2017 Apr 27].
- 18) European Pharmacopoeia, Sixth Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2007

- 19) Filipović-Grčić J. Praktikum kozmetologije. Zavod za farmaceutsku tehnologiju. Farmaceutsko-biokemijski fakultet. Zagreb, 2001.
- 20) URL: <http://www.thedermreview.com/face-serum/> pristup [2017 Apr 25]
- 21) Yamamoto Y, Kumetani M, Onuki Y, Koide T, Suzuki T, Fukami T. Analysis of the Stability of External – Application Dermatologic Preparations: Consideration from Rheological Measurements. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64, 1047-1055, 2016.
- 22) Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: Review and comment. *SkinRes. Technol.* 2008, 14, 249–260.
- 23) Bos JD, Meinardi M.M. The 500 dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* 2000, 9, 165–169.
- 24) Kerscher M, Buntrock H. Update on cosmeceuticals. *J DtschDermatolGes*, 2011, 9, 314-327.
- 25) Nagelreiter C, Raffeiner S, Geyerhofer C, Klang V, Valenta C. Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisone acetate. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 448, 305–312, 2013.
- 26) Ishii H, Todo H, Sugibayashi K. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58, 556—561, 2010.
- 27) Bissett DL. Common cosmeceuticals. *ClinDermatol*, 27, 435-445, 2009.
- 28) Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci.* 359-370, 2006 Oct;28(5).
- 29) Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. Školska knjiga; Zagreb, 34-39, 2003.
- 30) Benson HA, Namjoshi S. Proteins and peptides: strategies for delivery to and across the skin. *J PharmSci*, 97, 3591-3610, 2008.
- 31) Palmer BC, De Louise LA. Nanoparticle-Enabled Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting. *Molecules* 2016, 21(12), 1719.
- 32) Pepić I, Vujičić M, Lovrić J, Filipović – Grčić J. Nanočestice u dermatokozmetičkim pripravcima: liposomi, mikroemulzije i polimerne micide. *Farmaceutski glasnik*, 68, 763-772, 2012.
- 33) Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije, šesto izdanje (englesko), prvo izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 134-143, 1999.

- 34) Skoog DA, West DM, Holler FJ. Uvod u kromatografske metode. Osnove analitičke kemije: Školska knjiga; 645-674, 1999.
- 35) Sutlović D. Kriminalističko istraživanje, zapljena i analiza sredstva ovisnosti. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 103-118, 2011.
- 36) Sutlović D. Potvrđne metode analize. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 109-111, 2011.
- 37) Sutlović D. Potvrđna analitička metoda, plinska kromatografija-spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 394-395, 2011.
- 38) URL: [http://freezg.tcom.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/sl096.gif](http://freezg.tcom.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/sl096.gif) pristup [2017 Apr 30]
- 39) Pine HS. Organska kemija. 3. ed. Zagreb: Školska knjiga; 1130-1132, 1994.
- 40) Sutlović D. Spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 355-357, 2011.
- 41) Kaluzna-Czaplinska J. Current medical research with the application of coupled techniques with mass spectrometry. Med SciMonit. 117-123, 2011;17(5).
- 42) URL: <http://www.ewg.org/enviroblog/2014/01/chemicals-should-disappear-cosmetics> pristup [2017 Jul 10]
- 43) URL: <https://www.quechoisir.org/decryptage-produits-cosmetiques-les-fiches-des-molecules-toxiques-a-eviter-n2019/> pristup [2017 Jul 10]
- 44) URL:<http://www.shimadzu.com/an/gcms/qn50420000005ykm-img/qn50420000005yll.jpg> pristup [2017 Aug 08]
- 45) Crinnion WJ. Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. Altern Med Rev. 190-196, 2015.
- 46) URL: <http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/> pristup [2017 Sep 12]
- 47) URL: <http://www.makrovita.ba/bs/pitanja-i-odgovori/uticaj-kozmetike-na-zdravlje> pristup [2017 Sept 20]

## **8. SAŽETAK**



## NASLOV RADA:

Kvalitativna analiza kozmetičkih pripravaka primjenom GC-MS metode

## CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

Kvalitativna analiza kozmetičkih proizvoda primjenom GC-MS metode, usporedba dobivenih rezultata s podacima navedenim na deklaraciji proizvoda, te pronalazak poveznice između cijene 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 30 uzoraka krema i seruma. Uzorci su prema cjenovnom rasponu raspoređeni u dvije kategorije: skupina 1- 14 proizvoda čija je cijena niža od 200 kn i skupinu 2- 16 proizvoda čija je cijena viša od 200 kn. Za analitičku pripremu uzoraka korištene su staklene Petrijeve zdjelice na koje je nanesen uzorak mase 0,1 g. Uzorci su ekstrahirani smjesom organskih otapala, kloroforma, etil acetata i N-heksana u jednakom omjeru (v/v/v= 1:1:1), te su potom postavljeni u digestor na sušenje u struji zraka. Nakon što su otopljeni uzorci filtrirani, preneseni su u staklene tubice za GC-MS analizu. Kvalitativna analiza je izvršena GC-MS metodom (plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom) koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40-600 m/z. Za usporedbu dobivenih rezultata, uzorak 2 je otopljen i u čistom otapalu, acetonitrilu, filtriran, razrijeđenu kloroformu te prebačen u staklenu tubicu za GC-MS analizu.

## REZULTATI:

Kvalitativnom analizom u uzorcima je identificirano u rasponu 13-35 supstanci, dok ih je na pojedinačnim deklaracijama navedeno u rasponu 11-105. Od ukupno 30 uzoraka, u 17 uzoraka deklaracije su pokazale odstupanje broja deklariranih sastojaka za  $\leq 7$  sastojaka u usporedbi sa brojem identificiranih sastojaka, a kod preostalih 13 uzorakabroj deklariranih sastojaka se razlikovao za  $> 7$  sastojaka od broja identificiranih sastojaka.

Posebno je ispitivano prisustvo 7 štetnih i nepoželjnihsastojaka: butilhidroksitoluena (BHT), ciklopentasiloksana, ciklotetrasiloksana, benzofenona, trietanolamina (TEA) i dietil ftalata, te je svaki od njih pronađen u barem jednom ispitivanom uzorku. Od ukupno 30 ispitivanih uzoraka, u 24 uzorka je dokazano prisustvo nepoželjnih sastojaka.

Od 7 uzoraka u kojima je identificirano 2 ili više nepoželjnih sastojaka, 4 spadaju u skupinu 2, a 3 u skupinu 1. U uzroku br. 11 dokazana su 4 ispitivana nepoželjna sastojka, 3 sastojka u uzorcima 4 i 15, a u uzorcima 18, 21, 25 i 29 dokazano je prisustvo 2 nepoželjna ispitivana sastojka.

Usporedbom dobivenih karakterističnih signala kromatograma uzorka 2, dokazano je da izbor otapala nema veći utjecaj na dobiveni rezultat, obzirom da se dobiveni kromatogrami gotovo potpuno preklapaju.

## ZAKLJUČAK:

Ovim istraživanjem je dokazano odstupanje od navedenih deklaracija proizvoda kod analize 43% uzoraka. Cijena nije bila u korelaciji s podudaranjem deklariranih i detektiranih sastojaka u proizvodu. Potrebno je provođenje detaljnijih studija kojim bi se mogle utvrditi mogućnosti detektiranja iznimno niskih koncentracija istraživanih nepoželjnih sastojaka.

## **9. SUMMARY**

#### DIPLOMA THESIS TITLE:

Qualitative analysis of cosmetic products by GC-MS method.

#### OBJECTIVES:

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

#### DESIGN:

Experimental study.

#### SETTINGS:

Toxicology laboratory, Department of pathology, medicine and cytology, University Hospital of Split.

#### MATERIALS AND METHODS:

In this study, 30 creams and serums were chosen. Samples were divided in two categories according to price range, group 1- 14 products costing less than 200 kn, and group 2 – 16 products costing more than 200 kn. For preparation, samples weighing approximately 0,1 g, were applied to Petri Dishes. Samples were extracted with the mix of organic dissolvent's (chloroform : ethyl acetate : hexane = 1:1:1) and then were left to volatilize in digester. After dissolving, samples were filtrated and transferred to glass cuvettes for the qualitative analysis by GC-MS method (gass chromatography-mass spectrometry). Analysis was performed by a method that simultaneously records the total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m/z. In order to compare the results, sample number 2 was dissolved in pure dissolvent, acetonitrile, filtered, diluted in chloroform and transferred to the glass cuvette for GC-MS analysis.

## RESULTS:

Qualitative analysis of samples showed 13-35 ingredients detected by GC-MS method, while individual declarations of products had 11-105 listed ingredients. In total of 30 samples, 17 samples had  $\leq 7$  ingredients difference between detected and declared ingredients, and 13 samples had  $< 7$  ingredients difference. All seven of the tested, potentially harmful and undesirable ingredients (butylhydroxytoluene, cyclopentasiloxane, cyclotetrasiloxane, benzophenone, triethanolamine and diethyl phthalate), were detected using qualitative analysis by GC-MS method, and all of them were detected in at least one sample. In 30 tested samples, 24 of them were positive for at least one tested undesirable ingredient. Between seven samples which had two or more undesirable ingredients detected, four of them belong to the group 2, and three of them in the group 1. In sample 11, 4 undesirable tested ingredients were detected; 3 of them in samples 4 and 15 and in samples 18, 21, 25 and 29 number of detected undesirable ingredients were 2. Comparing characteristic signals of chromatograms, it has been proved that choice of dissolvents does not affect final result.

## CONCLUSION:

In this work, deviation from declaration on products was proved using GC-MS method in 43% of samples. Price didn't show correlation with matched declared and detected ingredients in products. More thorough analysis and studies are required to determine possibilities of detecting extremely low concentrations of the tested undesirable ingredients.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:** Martina Stolica

**Datum rođenja:** 28.10.1993.

**Mjesto rođenja:** Split

**Obrazovanje:**

- OŠ „Kman-Kocunar“, Split, 2000.-2008., prosjek ocjena tokom svih 8 razreda: 5,00
- Zdravstvena škola Split, smjer: farmaceutski tehničar, Split, 2008.-2012., prosjek ocjena tokom sva 4 razreda: 5,00
- Integrirani studij: Farmacija, Medicinski fakultet Split i Kemijsko-tehnološki fakultet Split, Split, 2012.-2017., težinski prosjek ocjena tokom studija: 3,9
- Stručno osposobljavanje: 6 mjeseci u ljekarničkoj jedinici SDŽ „Brda“

**Školski uspjesi:**

- 2. mjesto na Županijskom natjecanju u latinskom jeziku za srednje škole, 2010.
- 1. mjesto na Državnom natjecanju „Schola Medica“ za farmaceutske tehničare, 2012.