

# Analitičke metode za određivanje parabena u kozmetici

---

**Mandarić, Mirna**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:144708>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**MIRNA MANDARIĆ**

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

## **ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE PARABENA U KOZMETICI**

### **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zagreb, 2016.



Datum predaje prve verzije Završnog rada: 29.srpnja 2016.

Datum predaje korigirane verzije Završnog rada: 19. rujna 2016.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 23. rujna 2016.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Potpis:



**Sadržaj**

<b>§ 1. Sažetak .....</b>	<b>7</b>
<b>§ 2. Uvod.....</b>	<b>9</b>
<b>§3. Parabeni .....</b>	<b>11</b>
<b>§4. Zakonska i pravna regulativa .....</b>	<b>13</b>
<b>§ 5. Analitičke metode za određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima.....</b>	<b>15</b>
<b>5.1. Ekstrakcijske metode .....</b>	<b>15</b>
5.1.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi	16
5.1.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi	17
5.1.3. Metoda „Single-drop“ mikroekstrakcije	18
5.1.4. Metoda disperzijske mikroekstrakcije tekuće-tekuće	19
5.1.5. Mikroekstrakcija u tekućoj fazi sa šupljim vlaknima	19
5.1.6. Ekstrakcija s pomoću sorbensa nanesenog na magnet za miješanje	20
<b>§ 5.2. Kromatografske metode za određivanje parabena</b>	<b>20</b>
5.2.1. Metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti	22
5.2.2. Plinska kromatografija	25
<b>§ 6. Literaturna vrela .....</b>	<b>299</b>



## § 1. Sažetak

U suvremenom životu kozmetika je jedna od važnih sastavnica ljudskog života. Zbog svakodnevne primjene kozmetičkih proizvoda, komercijalno dostupni kozmetički proizvod mora biti siguran za zdravlje ljudi.

U skladu sa zahtjevima kvalitetne proizvodnje i sigurnosti potrošača, potrebno je da su kozmetički proizvodi dosljedno proizvedeni i kontrolirani s ciljem osiguranja usklađenosti s propisanim pravilima i s ciljem osiguranja kvalitete odnosno zdravstvene ispravnosti. Kako bi se dokazalo da kozmetički proizvod ispunjava propisane uvjete, prije stavljanja proizvoda na tržište, kozmetički proizvod je potrebno podvrgnuti procjeni sigurnosti na temelju odgovarajućih podataka na osnovu čega je potrebno sastaviti izvješće o sigurnosti kozmetičkog proizvoda. Podatci u izvješću o sigurnosti kozmetičkog proizvoda sadrže i podatke o prisutnim štetnim tvarima. Jedan od štetnijih sastojaka kozmetičkih proizvoda su konzervansi parabeni, koji se mogu naći u svim proizvodima, od šampona, sapuna do losiona. Parabeni se koriste za sprečavanje rasta bakterija i produljuju rok trajanja kozmetičkim proizvodima. Štetnost parabena povezana je s hormonskim poremećajima i nekim oblicima karcinoma.

Svrha ovog rada je dati pregled najvažnijih analitičkih metoda za određivanje parabena prisutnih u kozmetičkim proizvodima.





## § 2.Uvod

U suvremenom životu ljudi koriste velik broj različitih kozmetičkih proizvoda i preparata. Prema službenoj definiciji kozmetički proizvod je svaka tvar ili smjesa tvari koja je namijenjena dodiru s vanjskim dijelovima ljudskog tijela (koža, kosa i vlasište, nokti, usnice i vanjski spolni organi) ili sa zubima i sluznicom usne šupljine isključivo ili prvenstveno radi njihova čišćenja, parfimiranja, i/ili zaštite i održavanja u dobrom stanju, mijenjanja njihova izgleda i/ili korekcije tjelesnih mirisa. Također, kozmetički proizvodi mogu graničiti i s propisima koji uključuju lijekove, medicinske proizvode, tradicionalne biljne lijekove i/ili biocidne proizvode.<sup>1</sup>

Sastav kozmetičkih proizvoda važan je ne samo za ljudsko zdravlje već i za okoliš. Svojstva mnogih sastojaka kozmetičkih proizvoda, koji su se donedavno smatrali prihvatljivim i neškodljivim za ljudsko zdravlje, intezivno se istražuju u svrhu što točnijeg određivanja njihovih korisnih, ali i toksičnih sastojaka. Sve dostupniji i jeftiniji kozmetički proizvodi potaknuli su brojne stručne i znanstvene rasprave o njihovom utjecaju na ljudsko zdravlje. Popis sastojaka na deklaraciji proizvoda navodi se silaznim redosljedom s obzirom na njihovu masu u vrijeme kada su dodani kozmetičkom proizvodu. Sastojci u koncentracijama manjim od 1 % mogu se navesti bilo kojim redosljedom nakon sastojaka u koncentracijama većim od 1 %. Europska komisija je putem *CosIng baze* objavila popis tvari i sastojaka koji se mogu nalaziti u kozmetičkim proizvodima.<sup>2</sup>

Sveobuhvatan program kontrole kozmetičkih proizvoda proizlazi iz potrebe za pružanjem najbolje kvalitete korisnicima sastavljen je od nekoliko elemenata: sigurnosti, povjerenja, zaštite robne marke i proizvodne učinkovitosti. Zakoni, propisi i industrijski standardi ključni su inicijatori u postupku povećanja kvalitete proizvoda i svijesti o sigurnosti u cijeloj kozmetičkoj industriji.

Parabeni se u kozmetičkim proizvodima i pripravcima koriste kao konzervansi za spriječavanje nastanka bakterija i gljivica koje mogu onečistiti kozmetički proizvod. Parabeni spadaju u skupinu sintetičkih estera p-hidroksibenzenkarboksilne kiseline, a uključuju: metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP), butilparaben (BP), izobutilparaben

(IBP), izopropilparaben (IPP), benzilparaben (BeP) i heptilparaben (HP), te njihove natrijeve soli.<sup>3</sup>

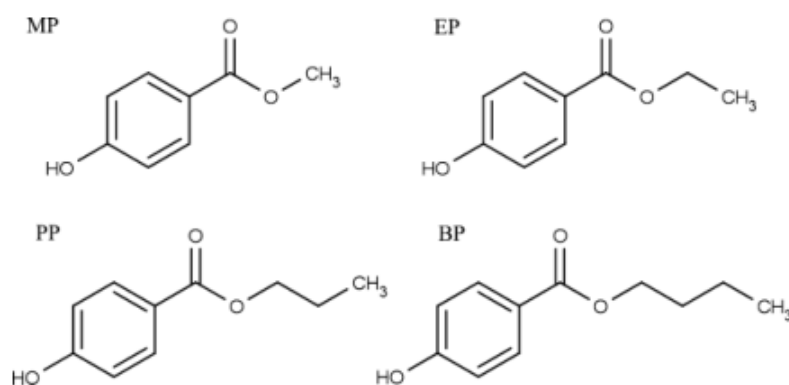
Između različitih i mnogobrojnih štetnih sastojaka koja se mogu pronaći u kozmetičkim proizvodima, istraživanja ukazuju da su parabeni jedni od štetnijih za ljudsko zdravlje. Najveća štetnost je u tome što su slični estrogenu te predstavljaju rizik za reproduktivno zdravlje, te pospješuju rast tumorskih stanica nekih karcinoma (karcinoma dojke ili malignog melanoma).<sup>4</sup>

Za analizu parabena u kozmetičkim uzorcima koriste se različiti analitički postupci koji uključuju metode odvajanja i kvantifikaciju, najčešće se koriste metode ekstrakcije i kromatografske metode.

## § 3. Parabeni

Parabeni su alkilni esteri p-hidroksibenzenkarboksilne kiseline, a najvažniji su: metilparaben (MP), etilparaben (EP), propilparaben (PP), butilparaben (BP), izobutilparaben (IBP), izopropilparaben (IPP), benzilparaben (BeP) i heptilparaben (HP) te njihove odgovarajuće natrijeve soli. Parabeni su najjeftiniji konzervansi, zbog čega se često koriste u kozmetici i drugim proizvodima za zdravlje i ljepotu kao što su šamponi, zubne paste, itd.<sup>3</sup>

Strukture najvažnijih parabena prikazani su na Slici 1 **Error! Reference source not found..**



Slika 1. Prikaz struktura metilparabena (MP), etilparabena (EP), propilparabena (PP) i butilparabena (BP).<sup>3</sup>

Na Slici 1 prikazane su osnovne strukturne formule parabena s različitim alkilnim skupinama (metil, etil, propil ili butil) vezanim preko kisika u para položaju benzenskog prstena. Važno svojstvo parabena, u usporedbi s drugim antimikotičkim spojevima proizlazi iz slabo kiselih svojstava koje im daju fenolne skupine, je što pri višem pH (3-8) ne disociraju i zadržavaju svoja zaštitna svojstva protiv bakterija i gljivica. S povećanjem duljine alkilnog lanca parabena povećava se njihova antimikrobiološka aktivnost, smanjuje se topljivost u vodi, a povećava topljivost u ulju i mastima.<sup>5</sup>

Parabeni djeluju na dugotrajnu stabilnost kozmetičkog proizvoda jer sprječavaju razvoj mikroorganizama poput bakterija i plijesni koje ubrzavaju razgradnju i stvaraju štetne

nusprodukte. Premala količina konzervansa ne može zaustaviti rast mikroorganizama što dovodi do propadanja proizvoda, dok prevelika količina može izazvati alergiju, dermatitis ili neku drugu neželjenu i štetnu pojavu. Više od tri četvrtine komercijalno dostupnih proizvoda za ljepotu i zdravlje u svom sastavu sadrže paraben, a ukoliko je proizvod bez parabena to mora biti jasno naznačeno na deklaraciji .

Parabeni se po svojoj potencijalnoj štetnosti često svrstavaju u skupinu s ftalatima, koji se povezuju s većim brojem ozbiljnih zdravstvenih problema poput neplodnosti, pretilosti, astme i alergija, kao i karcinomom dojke. Kada je riječ o alergijskim reakcijama, paraben može izazvati različite dermatološke probleme na koži kao što su iritacija, osip, upala i slično.<sup>6</sup>

## §4. Zakonska i pravna regulativa

Pristupanje Republike Hrvatske Europskoj Uniji za posljedicu je imalo brojne promjene u vidu direktiva i/ili smjernica svih regulatornih organa Europske Unije, koji su postrožili kriterije za vrednovanje maksimalnih dopuštenih koncentracija kemijskih sastojaka u kozmetičkim proizvodima i preparatima.

Jedna od značajnijih uredbi je Uredba br. 1223/2009 Europskog parlamenta i Vijeća o kozmetičkim proizvodima, koja za cilj ima pojednostaviti postupke i uskladiti terminologiju te time smanjiti administrativno opterećenje i dvosmislenost. Nadalje, njome se jačaju određeni elementi regulatornog okvira za kozmetičke proizvode, poput unutarnjeg nadzora nad tržištem s ciljem postizanja visoke razine zaštite zdravlja ljudi. U slučaju ozbiljne sumnje u pogledu sigurnosti bilo koje tvari sadržane u kozmetičkim proizvodima, nadležno tijelo države članice u kojoj je proizvod koji sadrži takvu tvar dostupan na tržištu, može putem obrazloženog zahtjeva zatražiti od odgovorne osobe da dostavi popis svih kozmetičkih proizvoda za koje je odgovoran i koji sadrže tu tvar. U tom je popisu potrebno navesti koncentraciju te tvari u kozmetičkim proizvodima.<sup>7</sup>

Europska komisija je donijela mnogobrojne zabrane za primjenu konzervansa u kozmetičkoj industriji. Uz brojne zabrane i ograničenja koje Uredba donosi s ciljem zaštite zdravlja ljudi, između ostalih štetnih sastojaka značajna su ona o sadržaju i maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji parabena. Na Slici 2 prikazan je dio Tablice s maksimalnim dozvoljenim koncentracijama parabena iz propisa Europske Unije.<sup>8</sup>

Referentni broj	Identifikacija tvari				Uvjeti			Tekst uvjeta primjene i upozorenja
	Kemijski naziv/INN	Naziv iz glosara uobičajenih sastojaka	CAS broj	EZ broj	Vrsta proizvoda, dijelovi tijela	Najveća koncentracija u gotovom pripravku	Ostalo	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
9	Anorganski sulfiti i hidrogensulfiti (*)	Sodium sulfite, ammonium bisulfite, ammonium sulfite, potassium sulfite, potassium hydrogen sulfite, sodium bisulfite, sodium metabisulfite, potassium metabisulfite	7757-83-7, 10192-30-0, 10196-04-0, 10117-38-1, 7773-03-7, 7631-90-5, 7681-57-4, 16731-55-8	231-821-4, 233-469-7, 233-484-9, 233-321-1, 231-870-1, 231-548-0, 231-673-0, 240-795-3		0,2 % (kao slobodni SO <sub>2</sub> )		
10	Premješteno ili izbrisano							
11	Klorobutanol	Chlorobutanol	57-15-8	200-317-6		0,5 %	Ne koristiti u aerosolnim raspršivačima	Sadrži klorobutanol
12	4-hidroksibenzojeva kiselina i njezine soli i esteri	4-Hydroxybenzoic acid, methylparaben, butylparaben, potassium ethylparaben, potassium paraben, propylparaben, isobutylparaben, sodium methylparaben, sodium ethylparaben, sodium propylparaben, sodium butylparaben, sodium isobutylparaben, ethylparaben, sodium paraben, isopropylparaben, potassium methylparaben, potassium butylparaben, potassium propylparaben, sodium propylparaben, calcium paraben, phenylparaben	99-96-7, 99-76-3, 94-26-8, 36457-19-9, 16782-08-4, 94-13-3, 4247-02-3, 5026-62-0, 35285-68-8, 35285-69-9, 36457-20-2, 84930-15-4, 120-47-8, 114-63-6, 4191-73-5, 2611-07-2, 38566-94-8, 84930-17-4, 35285-69-9, 69959-44-0, 17696-62-7	202-804-9, 202-785-7, 202-318-7, 253-048-1, 240-830-2, 202-307-7, 224-208-8, 225-714-1, 252-487-6, 252-488-1, 253-049-7, 284-595-4, 204-399-4, 204-051-1, 224-069-3, 247-464-2, 254-009-1, 284-597-5, 252-488-1, 274-235-4, 241-698-9		0,4 % (kao kiselina) za pojedini ester 0,8 % (kao kiselina) za smjesu estera		
13	3-acetil-6-metilpiran-2,4 (3H)-dion i njegove soli	Dehydroacetic acid, sodium dehydroacetate	520-45-6, 4418-26-2, 16807-48-0	208-293-9, 224-580-1		0,6 % (kao kiselina)	Ne koristiti u aerosolnim raspršivačima	
14	Mravlja kiselina i njezina natrijeva sol	Formic acid, sodium formate	64-18-6, 141-53-7	200-579-1, 205-488-0		0,5 % (kao kiselina)		

Slika 2. Maksimalna dozvoljena koncentracija parabena propisana od zakona Europske Unije.<sup>8</sup>

## § 5. Analitičke metode za određivanje parabena u kozmetičkim proizvodima

Danas se sve više koriste ekološki prihvatljivi kozmetički proizvodi i intenzivno istražuju i primjenjuju nove, točnije i preciznije analitičke metode određivanja njihova sastava.<sup>9</sup>

Za određivanje parabena u kozmetičkim uzorcima razvijen je veliki broj metoda koje uključuju metode detekcije za djelomičnu analizu uzorka bez prethodne pripreme, brze „*screening*“ metode, razvoj i dizajn specifičnih senzora, te razvoj *on-line* sustava za automatsku pripremu uzorka i kvantifikaciju.

Analitički postupak za analizu parabena započinje izborom metode koja uključuje pripremu uzorka, odvajanje analita iz složene matrice kozmetičkog uzorka te određivanje sadržaja i koncentracije parabena. Odabir optimalne analitičke metode kojom se može točno odrediti koncentracija parabena u uzorku ovisi o kemijskim i fizikalnim svojstvima uzorka.

### 5.1. Ekstrakcijske metode

Za pripremu uzorka koriste se različiti analitički postupci ovisno o vrsti uzorka u kojem se određuju parabeni, koncentraciji prisutnih parabena, te o izabranoj analitičkoj instrumentnoj metodi za kvantifikaciju. Važan korak u analitičkom postupku je separacija analita, a koristi se u svrhu: izolacije, identifikacije, neizravnu analizu, odvajanje analita od interferencija, koncentriranje tragova, prijenos analita u pogodan medij i pojednostavljenje matrice. Za odvajanje parabena iz uzorka koriste se ekstrakcijske metode: ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE), mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid-Phase Microextraction*, SPME), mikroekstrakcija na tekućoj fazi (eng. *Liquid-Phase Microextraction*, LPME), tekućinska ekstrakcija pri povišenom tlaku (eng. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-assisted extraction*, MAD), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *Ultrasound-assisted extraction*, UAE) i ekstrakcija s fluidom pri superkritičnim uvjetima (eng. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE).<sup>9,10,11</sup>

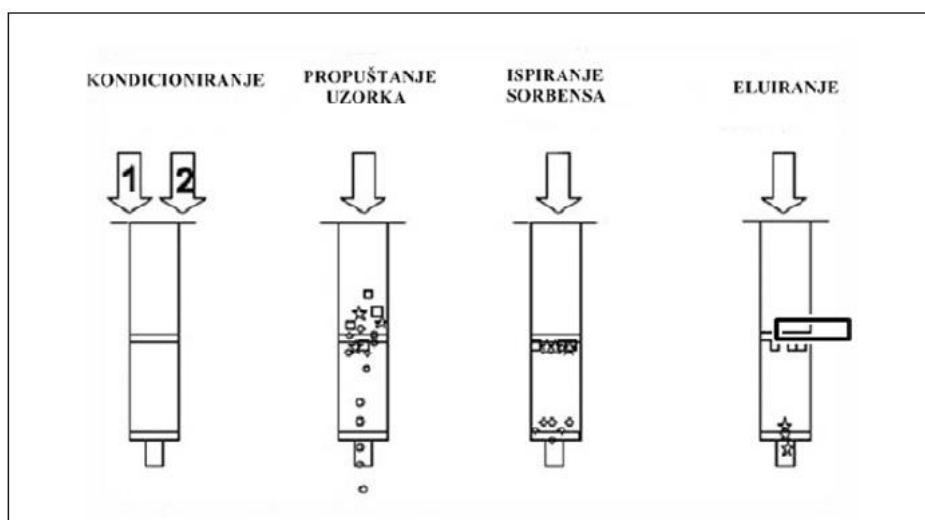


Na temelju dostupnih objavljenih radova za analizu parabena od metoda za pripremu uzorka kozmetičkih proizvoda najviše se koriste metode mikroekstrakcija na tekućoj fazi (LPME) u udjelu od oko 25 % od svih metoda koje se koriste, zatim oko 20 % mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE). Ostale ekstrakcijske metode koriste se manje od 16 % od ukupno korištenih ekstrakcijskih metoda.<sup>9</sup>

### 5.1.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Pri ekstrakciji na čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction, SPE*) dolazi do ekstrakcije otopljenih ili suspendiranih analita iz otopine uzorka, a sastoji se u propuštanju uzorka kroz aktivni sorbens u mikrokolonama ili na diskovima. Prednost ekstrakcijskog postupka SPE u usporedbi s klasičnim metodama ekstrakcije, primjerice ekstrakcije tekuće-tekuće, je brzina, učinkovitost, selektivnosti i manji utrošak štetnih otapala. Najčešće se koristi pri ukoncentriravanju tragova analita, promjene ili prilagodbe matriksa uzorka te uklanjanju interferencija.<sup>12</sup>

Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi sastoji se od ispiranja kolone odgovarajućim otapalom i pripreme sorbensa za interakciju s analitom (kondicioniranje kolone), te propuštanja uzorka kroz čvrstu fazu pri čemu dolazi do vezanja analita na površini sorbensa i zadržavanja analita. Analit ostaje vezan na čvrstoj fazi, sorbens se ispere otapalom od interferencija, a zatim slijedi desorpcija analita eluiranjem s odgovarajućim eluensom (Slika 3).



Slika 3. Shema postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi.<sup>13</sup>

Pri odvajanju parabena od masnoća koje se dodaju kao pomoćna sredstva u kozmetičkim uzorcima za ekstrakciju se koriste različite komercijalno dostupne kolone, primjerice *Sep-Pak Florisil*, *Oasis HLB* i  $C_{18}$ .<sup>3</sup>

Kao čvrsta faza koriste se i novi materijali, primjerice ugljikove nanocjevčice za SPE ekstrakciju MP, EP, PP i BP, a dobra učinkovitost postiže se radi velike adsorpcijske površine nanocjevčica za različite spojeve. Postupak se temelji na odvajanju smjese parabena na ugljikovim nanocijevčicama pomješanim s klasičnim punilom za ekstrakciju na čvrstoj fazi (RP- $C_{18}$ ) uz smjesu acetonitrila i vode kao otapala (50:50 v/v). Detekcijske granice su 0,5 - 2,1 mg L<sup>-1</sup> uz dobru preciznost metode 3,3-3,8 %.<sup>14</sup>

#### 5.1.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid-phase microextraction*, SPME) je jednostavna, brza i učinkovita metoda ekstrakcije, gdje se pročišćavanje i ukoncentriravanje analita izvode istovremeno u jednom koraku. Za mikroekstrakciju su potrebne male količine uzorka uz dobru selektivnost koja olakšava identifikaciju i kvantifikaciju analita. Zbog navedenih prednosti postupak SPME se često koristi pri odvajanju analita iz realnih uzoraka.

Pri validaciji metode SPME potrebno je odrediti analitičke parametre kao što su: osjetljivost, preciznost, detekcijske granice, izabrati vlakno i debljinu njegovog aktivnog sloja, optimirati eksperimentalne parametare apsorpcije (temperatura, vrijeme ekstrakcijskog postupka, brzina mješanja uzorka...) te optimirati vrijeme i temperaturu desorpcije.<sup>9</sup>

Postupak mikroekstrakcije uključuje postavljanje silicijeva vlakana obloženog aktivnim slojem sorbensa unutar injekcijske igle. Iгла se uroni u uzorak ili stavi iznad uzorka na određeno vrijeme, a nakon apsorpcije analita unese se u sustav plinskog kromatografa.<sup>15</sup>

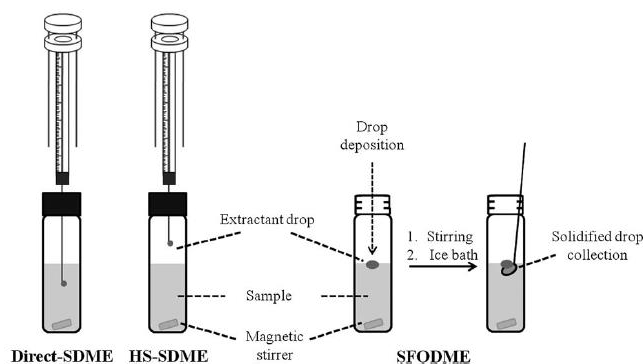
Danas se koriste različite vrste komercijalno dostupnih vlakana (različiti polimeri i različiti debljina). Pri izboru vlakana za ekstrakciju potrebno je uzeti nekoliko parametara: molekulska masa analita, struktura i polarnost molekula analita, polarnost vlakna, mehanizam ekstrakcije, granicu detekcije i linearnost koja se želi postići. Nedostatak ovog ekstrakcijskog postupka je visoka cijena i osjetljivost vlakana za SPME.<sup>9,16</sup>

Primjerice, metoda SPME koriste se za ekstrakciju parabena MP, EP i PP iz hidratantnih tonika za lice.<sup>17</sup>

### 5.1.3. Metoda „Single-drop“ mikroekstrakcije

Metoda „Single-drop“ mikroekstrakcije ili mikroekstrakcija u samo jednoj kapljici otapala (eng. *Single-drop microextraction, SDME*) koristi se za odvajanje MP, IPP EP, PP i BP iz kozmetičkih proizvoda na bazi vode.<sup>18</sup>

Shema postupka ekstrakcije u samo jednoj kapljici otapala za određivanje kozmetičkih proizvoda prikazana je na Slici 4.<sup>9</sup>



Slika 4. Shema postupka ekstrakcije u samo jednoj kapljici otapala za određivanje kozmetičkih proizvoda.<sup>9</sup>

U postupku SDME injekcijom se uzme vrlo mali volumen (1  $\mu\text{L}$ ) organskog otapala npr. heksilacetata, a nakon toga se otapalo ispusti iz injekcije, dok ne nastane kapljica na kraju igle. Iгла se zatim uroni u vodenu otopinu. U slučaju vodenih uzoraka, agitacija se može postići pomoću magnetiča. Nakon određenog vremena kapljica se uvuče natrag u injekciju i zatim unese u plinski kromatograf. Glavna prednost ovog postupka je brza ekstrakcija bez složenih aparatura. Nedostatak je mali izbor prikladnih organskih otapala koji će formirati i zadržati oblik kapljice za ekstrakciju, te potrebna spretnost u izvedbi ekstrakcije.<sup>3,9</sup>

Direktna metoda ekstrakcije SDME primjenjena je za odvajanje ftalatnih estera iz kolonjske vode i losiona za brijanje prije analize plinskom kromatografijom (GC-FID) Zalieckaite et al. (2007)<sup>19</sup>, a smjesa parabena u kozmetičkim proizvodima na bazi vode (voda za ispiranje usta, gel za kosu, itd.).<sup>20</sup>

#### 5.1.4. Metoda disperzijske mikroekstrakcije tekuće-tekuće

Metoda disperzijske mikroekstrakcije tekuće-tekuće (eng. *Dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) je metoda koja se temelji na disperziji u vodenu fazu smjese ekstrakcijskih otapala, otapala koji se ne miješa s vodom i otapala koje se miješa s vodom. Disperzijom smjese otapala nastaju kapljice koje se odlikuju velikom površinom pri kontaktu s uzorkom, čime dolazi do ukoncentriravanja analita i njegove učinkovite ekstrakcije. Primjerice, za ekstrakciju MP, EP i PP se kao disperzijsko sredstvo koristi smjesa otapala oktanola i acetona.<sup>21</sup>

Za disperzijsku mikroekstrakciju MP, EP i PP koristi se i butilkloroformijat kao ekstrakcijsko i istodobno derivatizacijsko otapalo. Nakon ekstrakcije butilirani spojevi MP, EP i PP se određuju metodom GC-FID bez prethodne derivatizacije ekstrahiranih parabena. Istraživanja su pokazala da je metoda disperzijske mikroekstrakcije parabena brža i učinkovitija ukoliko se primjene mikrovalovi i ultrazvuk.<sup>22,23</sup>

#### 5.1.5. Mikroekstrakcija u tekućoj fazi sa šupljim vlaknima

Pri mikroekstrakciji u tekućoj fazi sa šupljim vlaknima (eng. *Hollow fiber-based liquid-phase microextraction*, HF-LPME) analit se selektivno ekstrahira u mikrovolumenu unutar šupljine poroznog vlakna, najčešće od polipropilena. Unutrašnjost vlakana obično je ispunjena organskim otapalom koje se ne miješa s vodom (akceptorska faza), a zatim se vlakno uroni u vodenu otopinu uzorka (donorska faza). Svojstva vlakna mogu se radi učinkovitosti ekstrakcije analita i zamjeniti.<sup>24</sup>

Postupak ekstrakcije HF-LPME primjenjen je za separaciju parabena iz kozmetičkih uzoraka (tonici za lice) i njihovu analizu metodom GC-FID. U postupku HF-LMPE uporabljeno je šuplje vlakno od polipropilena (*Accurel Q 3/2*), a kao akceptorska fazu unutra vlakna korištena su organska otapala toluen i diheksileter.<sup>9,25</sup>

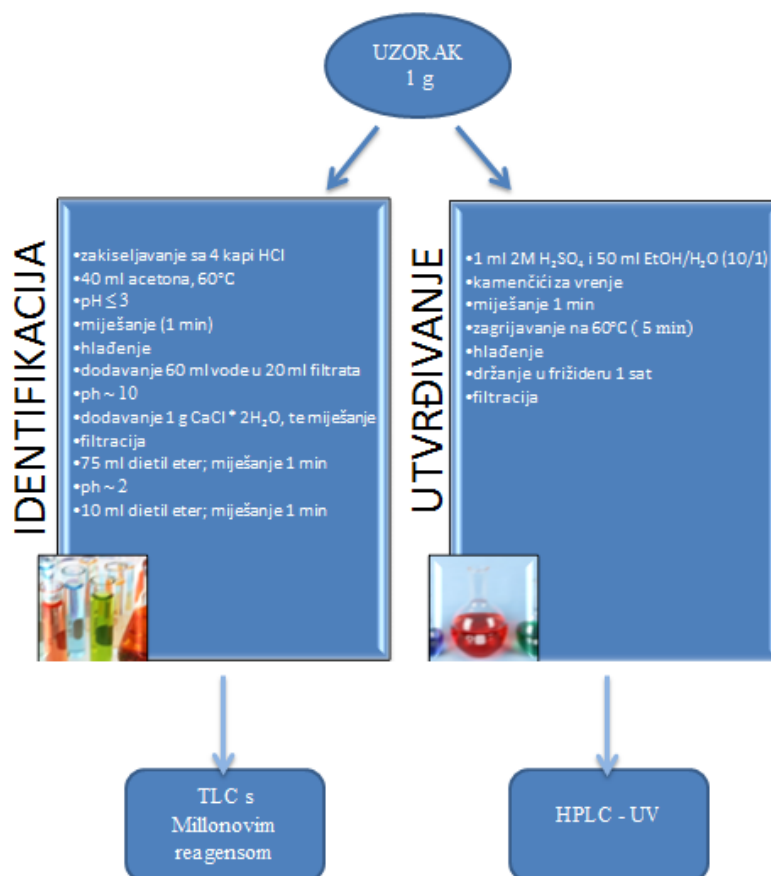
#### 5.1.6. Ekstrakcija s pomoću sorbensa nanesenog na magnet za miješanje

Ekstrakcija pomoću sorbensa nanesenog na magnet za miješanje (eng. *Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE) primijenjuje se za ekstrakciju MP, EP, PP i BP u mlijeku za tijelo nakon čega se odredi sastav metodom HPLC-UV. Metoda se temelji na ekstrakciji parabena na sorbensu

(polidimetilsiloksan- PDMS) nanesenom na magnet za miješanje i uspostavljanju ravnoteže između parabena otopljenog u uzorku i sorbiranog na sorbensu.<sup>26,27</sup>

## 5.2. Kromatografske metode za određivanje parabena

Za kvalitativno određivanje 2-fenoksietanola, 1-fenoksipropan-2-ola, metil-4-hidroksibenzoata, etil-4-hidroksibenzoata, propil-4-hidroksibenzoata, butil-4-hidroksibenzoata i benzil-4-hidroksibenzoata u kozmetičkim proizvodima koristi se metoda tankoslojne kromatografije (eng. *Thin-layer chromatography*, TLC), a za kvantifikaciju navedenih spojeva tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Za određivanje parabena metodama TLC i HPLC potrebno je približno 1 g uzorka koji otopi najčešće u klorovodičnoj kiselini ( $\text{pH} \leq 3$ ) ili sumpornoj kiselini i ekstrahira acetonom. Na Slici 5 prikazana je shema uobičajenog analitičkog postupka za odvajanje i određivanje parabena.<sup>9</sup>



Slika 5. Shema postupka priprave uzorka za identifikaciju i kvantifikaciju parabena u kozmetičkim proizvodima kromatografskim metodama.<sup>9</sup>

Izbor metode i uvjeti odjeljivanja i analize ovisi o svojstvima uzorka. Primjerice, za vrlo lužnate kozmetičke proizvode, kao što je toaletni sapun, kako bi se olakšala ekstrakcija parabena dodaje se klorovodična kiselina uz lagano zagrijavanje uzorka do približno 60 °C. Za određivanje parabena metodom TLC u lijevak za odjeljivanje dodaje se dietileter i kalcijev klorid dihidrat i Millionov regens. Nakon odjeljivanja, odvojeni parabeni se detektiraju na temelju mrlja različitih boja vidljivih pod UV svjetlom, a vrijednosti  $R_f$  prikazane su u Tablica 1.

Tablica 1. Vrijednosti  $R_f$  i odgovarajuće boje mrlja odvojenih parabena nakon odjeljivanja metodom TLC.<sup>28</sup>

Spoj	$R_f/h$	Boja
4-hidroksibenzojeva kiselina	11	crvena
Metilparaben	12	crvena
Etilparaben	17	crvena
Propilparaben	21	crvena
Butilparaben	26	crvena
Benzilparaben	16	crvena
2-fenoksietanol	29	žuta
1-fenoksipropan-2-ol	50	žuta

Za određivanje parabena metodom HPLC potrebno je približno 1,0 g uzorka koji se prethodno ekstrahira etanolom uz dodatak sumporne kiseline i zagrijavanje (60 °C).<sup>28</sup>

### 5.2.1. Metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti

Metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) koristi se za odjeljivanje i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, kozmetičkoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Primjena metode HPLC vrlo je važna i u prehrambenoj industriji, kontroli kvalitete hrane, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih voda, za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera, vitamina, itd. U navedenim realnim uzorcima važna je detekcija i sadržaj štetnih tvari, a najčešće se određuju potencijalni karcinogeni i mutageni spojevi poput parabena u kozmetičkim proizvodima ali i pesticidi, poliklorirani bifenili ili policiklički aromatski ugljikovodici.

U postupku odjeljivanja metodom HPLC tekući ili kruti uzorak se otopi u prikladnom otapalu, te propusti kroz kromatografsku kolonu pomoću otapala (pokretnom fazom). Mehanizam odvajanja sastojaka smjese metodom HPLC ovisi o vrsti nepokretne faze koja se koristi (npr. u adsorpcijskoj kromatografiji sastojci smjese se odvajaju adsorpcijom analita).

Razdjeljivanje se može temeljiti i na drugim mehanizmima, primjerice, ionskoj izmjeni, odvajanju na temelju razlike u veličini čestica te specifičnoj interakciji između otopljene tvari i pokretne faze.

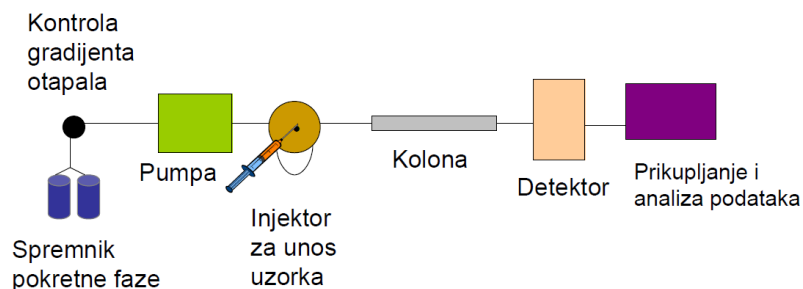
Metoda HPLC je osobito pogodna za analizu nehlapljivih ili termički nestabilnih spojeva koji se ovom metodom mogu analizirati bez razgradnje ili prevođenja u hlapljive derivate, što je ujedno i najvažnija prednost pred plinskom kromatografijom. Zbog velikog izbora pokretnih i nepokretnih faza metoda se odlikuje velikim razlučivanjem pa se koristi za analizu kompleksnih smjesa. Od velikog broja podvrsta tekućinske kromatografije najviše se koristi razdjelna kromatografija. U razdjelnoj kromatografiji nepokretna faza je inertni nosač (npr. silicijev ili aluminijski oksid) s polarnim (npr. etilenglikol) ili nepolarnim (skvalan) slojem selektivnog spoja. Odjeljivanje sastojaka smjese ovisi o polarosti: sastojaka, pokretne i nepokretne faze, tj. ovisi o interakciji polarnog analita s polarnom nepokretnom fazom. Napolarni spojevi bez polarnih funkcionalnih skupina slabo reagiraju s nepokretnom fazom.

U kromatografiji obratnih faza, pri kojoj je nepokretna faza nepolarna (modificirani silikagel), a pokretna faza polarna (smjesa vode i polarnog organskog otapala), mehanizam razdvajanja temelji se na hidrofobnosti analita.

Na odjeljivanje pri tekućinskoj kromatografiji utječe temperatura, posebice kad je riječ o otopinama male molekulske mase. Povišena temperatura poboljšava difuznost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze pa se time poboljšavaju kinetički parametri. S povišenjem temperature mijenja se i selektivnost kolone. Maksimalna dopuštena temperatura pri tekućinskoj kromatografiji je niža od temperature vrelišta pokretne faze za oko 20 °C. Umjesto temperature bolje je programirati protok, čime se poboljšava razdvajanje i smanjuje vrijeme zadržavanja.

Uređaj za HPLC sastoji se od spremnika s pokretnom fazom i sustava za obradu otapala, pumpe koja tjera pokretnu fazu kroz sustav pod visokim tlakom, injektora za unos uzorka u pokretnu fazu, kromatografske kolone s uređajem za programiranje temperature, detektora, te uređaja za prikupljanje i analizu podataka (Slika 6).



Slika 6. Shema uređaja za HPLC.<sup>29</sup>

Pokretna faza (eluent) prolazi preko stacionarne faze kojom je punjena kolona pomoću pumpe. Uzorak se unosi (injektira) u pokretnu fazu prije kolone gdje se sastojci smjese različito dugo zadržavaju i tako razdvajaju. Sastojci smjese se nakon razdvajanja na koloni određuju detektorom na temelju promjene svojstava pokretne faze (eluensa) ili uzorka.

Apsorpcija UV/VIS zračenja, odnosno apsorpcijski spektar pokretne faze snima se detektorom (osjetljivost:  $10^{-10}$  g cm<sup>-3</sup>), fluorescencija se mjeri fluorimetrom (osjetljivost:  $10^{-11}$  g cm<sup>-3</sup>), potencijali i struja razlaganja pokretne faze mjeri se elektrokemijskim detektorom (osjetljivost:  $10^{-12}$  g cm<sup>-3</sup>). Kao univerzalan ili selektivni detektor često se koristi spektrometar masa gdje dolazi do ionizacije uzorka, mjeri se ukupna struja iona ili se ioni određuju pojedinačno nakon prethodnog razdvajanja (osjetljivost:  $10^{-10}$  g cm<sup>-3</sup>).<sup>14</sup>

Metodom HPLC s UV detekcijom određeni su parabeni i konzervansi 2-fenoksietanol i 1-fenoksipropan-2-ol u uzorcima šampona i mlijeka za tijelo.<sup>9</sup>

Ekstrakcijom pomoću reverzних micela uz površinski aktivnu tvar Brij-35 postiže se selektivna ekstrakcija parabena, p-hidroksibenzojeve kiseline i benzojeve kiseline iz uzoraka pripremljenom u propanolu.<sup>9</sup>

Za brzu kromatografsku analizu parabena koristi se kromatografija s micelama gdje je uobičajena kolona za HPLC zamjenjena s kolonom C<sub>18</sub> s micelama natrijevog dodecil sulfata (SDS). U ovoj metodi koristi se pokretna faza s manjim udjelom organskog otapala, a nakon odvajanja u koloni dolazi do lakog odvajanja parabena u vodenu fazu.<sup>9</sup>

Metoda tekućinske kromatografije s UV detektorom se koristi za određivanje parabena u smjesi s drugim spojevima koji se također koriste kao konzervansi u kozmetičkim proizvodima. Na C<sub>18</sub> stupcu sa česticama veličine 1-2 μm parabeni se odvoje u samo pet minuta, ukoliko se

određuju samo parabeni, a devet minuta ako se određuju parabeni istovremeno s ostalim konzervansima.<sup>30</sup>

Osim UV detektora za detekciju parabena koriste se kemiluminiscencijski (CL) detektor i spektrometar masa kao detektor (eng. *Mass Spectrometry*, MS).<sup>30</sup>

Za određivanje parabena osim metodom HPLC koriste se i novije metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s monolitski stupcima s ubrizgavanjem uzorka u protok.<sup>12</sup> Upotreba kratkih monolitskih kolona daje bolju preciznost i rezoluciju u usporedbi s metodom HPLC, a odvajanje je moguće u manje od tri minute. Razvijen je selektivni elektrokemijski senzor za MP, EP, PP i BP, omogućavajući njihovo utvrđivanje u kozmetičkim proizvodima bez predhodnog odvajanja.<sup>31</sup>

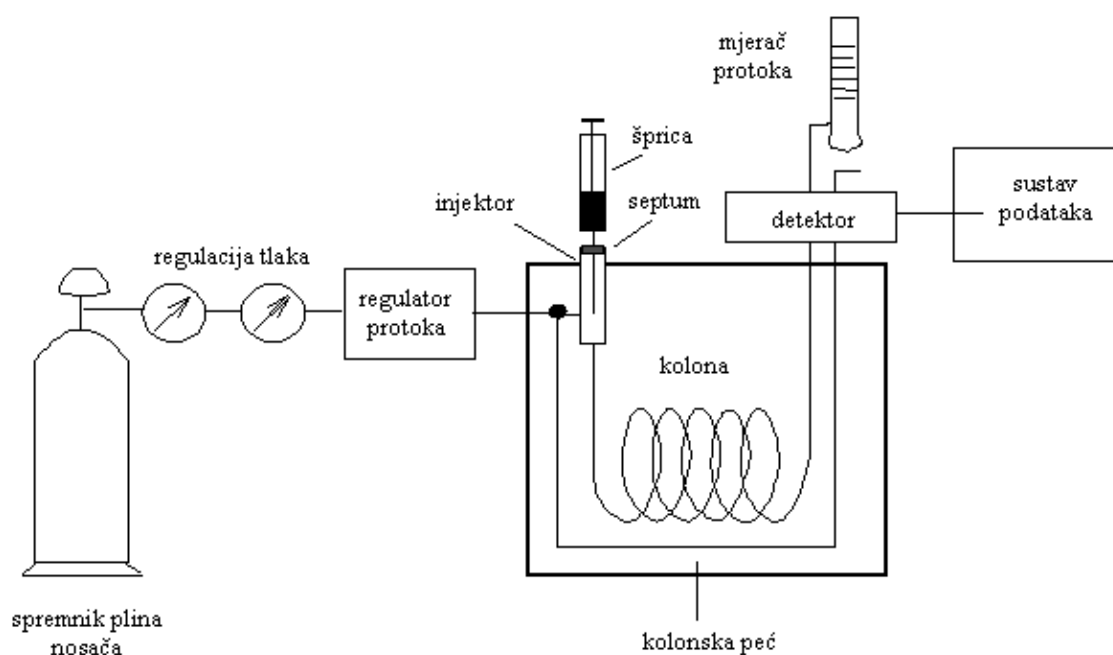
### 5.2.2. Plinska kromatografija

U plinskoj kromatografiji (eng. *Gas Chromatography*, GC) pokretna faza je plin, a nepokretna faza se mijenja ovisno o analitu. Uvijek se provodi u koloni. Koristi se za analizu smjese u kojoj sastojci pri radnoj temperaturi (-70 °C do +400 °C) imaju dovoljan tlak para. Plinskom kromatografijom čvrste se tvari mogu odrediti tako da se ispitivana tvar upotrijebi kao nepokretna faza ili analizom hlapljivih produkata njihove razgradnje. Nosač uzorka je inertan plin, a najčešće se koriste vodik, helij, dušik i argon. Izbor plina utječe na razdvajanje i vrijeme odvajanja. Protok pokretne faze i temperatura podese se ovisno o svojstvima ispitivane smjese. Razlikujemo plinsko-tekućinsku kromatografiju (eng. *Gas-Liquid Chromatography*) gdje je pokretna faza plin, a nepokretna tekućina i plinsko-čvrstu kromatografiju (eng. *Gas-Solid Chromatography*) gdje je pokretna faza plin, a nepokretna krutina.

Plinska se kromatografija koristi za odvajanje, kvantitativnu analizu i izolaciju komponenata smjese, za utvrđivanje čistoće tvari te pomoć pri identifikaciji. Temelji se na odvajanju komponenti smjese uslijed razlike u adsorpciji na nepokretnoj fazi i razdvajanje od nepokretne faze uz plin kao pokretnu fazu. S obzirom na nepokretnu fazu ovu metodu dijelimo na plinsko-adsorpcijsku i plinsko-razdjelnu kromatografiju. Plinskom kromatografijom može se postići kvalitativna i kvantitativna analiza smjese uz bolje razlučivanje u kraćem vremenu nego u većini današnjih uobičajenih analitičkih postupaka.

Pokretna faza – plin nosilac – niske je viskoznosti pa se mogu rabiti mnogo dulje, a time i djelotvornije kolone. Detekcija malih količina plinova i para mnogo je jednostavnija i točnija od određivanja malih količina tvari u tekućem stanju. Međutim, ova metoda je pogodna samo za analizu hlapljivih, ne suviše polarnih (dugo se zadržavaju na koloni) te termički stabilnih spojeva.<sup>32</sup>

U plinskoj kromatografiji se plinoviti ili tekući uzorak unosi u protok inertnog plina nosioca kao pokretne faze. Shematski prikaz tipičnog plinskog kromatografa je prikazan na Slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz uređaja za plinsku kromatografiju<sup>33</sup>

Detektori moraju omogućiti selektivno i/ili osjetljivo određivanje analita. Najčešći se koriste plameno-ionizacijski detektor (eng. *Flame ionization detector*, FID), detektor termičke vodljivosti (eng. *Thermal conductivity detector*, TCD) i detektor zahvata elektrona (eng. *Electron capture detector*, ECD). Metoda plinske kromatografije uz plameno-ionizacijski detektor (eng. *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*, GC-FID) obično zahtjeva predhodnu derivatizaciju analita kako bi se dobio hlapljivi produkt. Najčešći derivatizacijski postupak za parabene je acetilacija s anhidridom octene kiseline. Ovakva derivatizacija ima nekoliko prednosti: brža priprava uzorka, jednostavnije uklanjanje suviška reagensa i mogućnost reakcije u vodenom mediju.<sup>29</sup>

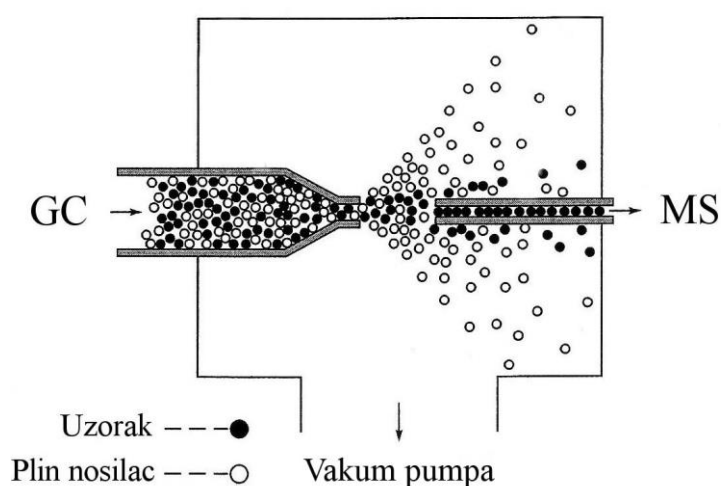
Plinskom kromatografijom (GC-FID) učinkovito se odjeljuju i određuju MP, EP, PP i BP u tonicima za lice.<sup>34</sup> Za određivanje parabena metodom GC-FID za derivatizaciju parabena osim acetilacije koristi se alkilacija s butilnim i izobutilnim derivatima.<sup>35</sup>

Parabeni se mogu odrediti metodom GC-FID i bez prethodne derivatizacije, ali nedostatak tog postupka je manja rezolucija signala u kromatogramu i manje simetrični pikovi nego oni dobiveni metodama uz prethodnu derivatizaciju.<sup>35</sup>

Fotoionizacijski detektor koristi ultraljubičasto zračenje za detekciju komponenata odvojenih u kromatografskoj koloni. Ioni se skupljaju na elektrodama, a nastala struja proporcionalna je koncentraciji iona. Metoda plinske kromatografije uz fotoionizacijski detektor (eng. *Gas chromatography with photoionization detector*, GC-PID) za većinu uzoraka daje slabije detekcijske granice u usporedbi s rezultatima dobivenim metodom GC-FID, ali ima bolju selektivnost.

U plinskoj kromatografiji za analizu parabena najčešće se koristi spektrometar masa kao detektor (eng. *Gas Chromatography-Mass spectrometry*, GC-MS). Plinoviti uzorak se ionizira i fragmentira, a zatim se fragmenti određuju na temelju njihovog omjera mase i naboja.

Nedostatak analize u sustavu GC-MS je način povezivanja kromatografa u kojem analit kontinuirano prolazi kroz kolonu i MS gdje se može ionizirati samo određena količina uzorka može se ukloniti korištenjem kapilarne kolone niskog protoka, a za odvajanje viška plina nosioca koristi se *jet separator* (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz *jet separatora*

Određivanje parabena metodom GC-MS se može podijeliti u tri skupine:

- Metode koje se temelje na prethodnoj derivatizaciji uzorka acetiliranjem
- Metode koje se temelje na prethodnoj derivatizaciji uzorka silacijom
- Metode bez derivatizacije uzorka.<sup>36,37</sup>

Prednost analize parabena metodom GC-MS su niske detekcije granice, selektivnost i osjetljivost, a u usporedbi s metodom HPLC-MS za određivanje parabena su visoka rezolucija, niža cijena i manje štetnih produkata.<sup>37</sup>

## 6. Literaturna vrela

---

1. <https://zdravlje.gov.hr/o-ministarstvu/djelokrug-1297/sanitarna-inspekcija/predmeti-opce-uporabe-i-zastita-od-buke/kozmeticki-proizvodi-1832/1832> (preuzeto 20.07.2016.)
2. <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/> (preuzeto 20.07.2016.)
3. J. A. Ocaña-González, M. Villar-Navarro, M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, M. A. Bello-López, *Anal. Chim. Acta* **858** (2015) 1-15.
4. <http://www.breastcancerfund.org/clear-science/radiation-chemicals-and-breast-cancer/parabens.html> (preuzeto 15.07.2016.)
5. [http://www.medscape.com/viewarticle/508430\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/508430_2) (preuzeto 12.05.2016.)
6. J. R. Byford, L. E. Shaw, M. G. B. Drew, G. S. Pope, M. J. Sauer, P. D. Darbre, *J Steroid Biochem Mol Biol.* **80** (2002) 49-60.
7. Europski parlament i Vijeće, UREDBA (EZ) br. 1223/2009, članak 24. str. 168., [http://www.zakon.hr/z/667/Zakon-o-provedbi-Uredbe-\(EZ\)-br.-1223.2009-Europskog-parlamentna-i-Vije%C4%87a-od-30.-studenog-2009.-o-kozmeti%C4%8Dkim-proizvodima](http://www.zakon.hr/z/667/Zakon-o-provedbi-Uredbe-(EZ)-br.-1223.2009-Europskog-parlamentna-i-Vije%C4%87a-od-30.-studenog-2009.-o-kozmeti%C4%8Dkim-proizvodima) (preuzeto 01.09.2016.)
8. Europski parlament i Vijeće, UREDBA (EZ) br. 1223/2009, članak 24. str. 287., [http://www.zakon.hr/z/667/Zakon-o-provedbi-Uredbe-\(EZ\)-br.-1223.2009-Europskog-parlamentna-i-Vije%C4%87a-od-30.-studenog-2009.-o-kozmeti%C4%8Dkim-proizvodima](http://www.zakon.hr/z/667/Zakon-o-provedbi-Uredbe-(EZ)-br.-1223.2009-Europskog-parlamentna-i-Vije%C4%87a-od-30.-studenog-2009.-o-kozmeti%C4%8Dkim-proizvodima) (preuzeto 01.09.2016.)
9. N. Cabaleiro, I. de la Calle, C. Bendicho, I. Lavilla, *Trends Anal. Chem.* **57** (2014) 34-48.
10. S. Scalia, D.E. Games, *Analyst* **117**, (1992) str. 839–841.
11. M. R. Lee, C. Y. Lin, Z. G. Li, T. F. Tsai, *J. Chromatogr. A* **1120**, (2006) 244–251.
12. J. R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, WILEY, Newcastle, 2009, str. 49-53.

- 
13. [https://www.google.hr/search?q=spe&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiytrvq7p\\_PAhWEGCwKHSrNB5gQ\\_AUICCgB&biw=1366&bih=659#tbn=isch&q=solid+phase+extraction&imgrc=IBg8o04uLunJfM%3A](https://www.google.hr/search?q=spe&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiytrvq7p_PAhWEGCwKHSrNB5gQ_AUICCgB&biw=1366&bih=659#tbn=isch&q=solid+phase+extraction&imgrc=IBg8o04uLunJfM%3A) (preuzeto 16.6. 2016.)
14. I. Márquez-Sillero, E. Aguilera-Herrador, S. Cárdenas, M. Valcárcel, „Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system“, *J Chromatogr A* **1217**(1) (2010) 1-6.
15. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, Boston, 2000, str. 560-580.
16. J. Jia, S. Liu, Y. Guo, S. Wang, X. Liu, „Preparation of nanoporous array anodic titanium wire supported solid-phase microextraction fiber coated with a copolymerized polymerizable ionic liquid monomer pair“, *Anal. Methods* **6** (2014) 7875-7882.
17. V. Ciuvasovaite, E. Adomaviciute, V. Vickackaite, *Chemija* **18** (2007) 11–15.
18. M. Saraji, S. Mirmahdieh, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) str. 988–995.
19. R. Zalieckaite, E. Adomaviciute, V. Vickackaite, „Single-drop microextraction for the determination of phthalate esters“, *Chemija* **18** (2007) 25–29.
20. M. Saraji, S. Mirmahdieh, „Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and GC-MS detection for the determination of parabens in water and cosmetic products“, *J. Sep. Sci.* **32** (2009) 988–995.
21. M. A. Farajzadeh, Dj. Djozan, R. Fazeli, *Talanta* **81** (2010) 1360–1367.
22. A. Farajzadeh, E. M. Khosrowshahi, P. Khorram, *J. Sep. Sci.* **36** (2013) 3571–3578.
23. L. Sánchez-Prado, G. Álvarez-Rivera, J. P. Lamas, M. Lores, C. García-Jares, M. Llompert, *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, (2011) 3293–3304.
24. M. A. Bello-López, M. Ramos-Payán, J. A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, *Anal. Lett.* **45** (2012) 804–830.
25. M. A. Farajzadeh, D. Djozan, R. F. Bakhtiyari, „Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid–liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography—Flame ionization detection“, *Talanta* **81** (2010) 1360–1367.

- 
26. L. P. Melo, M. E. C. Queiroz, *J. Sep. Sci.* **33** (2010) str. 1849–1855.
  27. N. Ramirez, R. M. Marce, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 6226–6231.
  28. <http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1996/45/oj/hrv/pdfa1a> (preuzeto 01.09.2016)
  29. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Thomson, Belmont, 2004.
  30. T. Wu, C. Wang, X. Wang, Q. Ma, *Int. J. Cosmetic Sci.* **30** (2008) 367–372.
  31. Y. Wang, Y. Cao, C. Fang, Q. Gong, *Anal. Chim. Acta* **673** (2010) 145–150.
  32. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, Boston, str. 560-580, 2000.
  33. [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm) (preuzeto 15.05.2016.)
  34. A. Prichodko, M. Mockunaite, V. Smitiene, V. Vickackaite, *Chemija* **22** (2011) 155–161.
  35. A. Braithwaite, F. J. Smith, *Chromatographic Methods*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1999, str. 262.
  36. L. Sanchez-Prado, G. Alvarez-Rivera, J. P. Lamas, M. Llompарт, M. Lores, C. Garcia-Jares, „Content of suspected allergens and preservatives in marketed baby and child care products“, *Anal. Methods* **5** (2013) 416–427.
  37. M. Haunschmidt, W. Buchberger, C. W. Klampfl, R. Hertsens, „Identification and semi-quantitative analysis of parabens and UV filters in cosmetic products by direct-analysis-in-real-time mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometric detection“, *Anal. Methods* **3** (2011) 99-104.