

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA AVBELJ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA AVBELJ

**OCENA VARNE UPORABE OKSIDATIVNIH BARVIL
ZA LASE V KOZMETIČNIH IZDELKIH**

**EVALUATION OF SAFE USE OF OXIDATIVE HAIR DYE
IN COSMETIC PRODUCTS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Zahvaljujem se prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za vso pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem za podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	I
KAZALO SLIK.....	II
KAZALO GRAFOV	III
KAZALO TABEL.....	III
KAZALO PRILOG	IV
POVZETEK	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1. LASJE.....	1
1.2. KOŽA	3
1.2.1 BARIERNA FUNKCIJA KOŽE.....	4
1.3. BARVE ZA LASE.....	5
1.3.1. NEOKSIDATIVNA BARVILA ZA LASE	5
1.3.2. OKSIDATIVNA BARVILA ZA LASE	7
1.4. ZAKONODAJA	9
1.4.1. OCENA VARNOSTI KOZMETIČNEGA IZDELKA	10
1.5. KONTAKTNI DERMATITIS.....	15
1.5.1. ALERGIJSKI KONTAKTNI DERMATITIS.....	16
1.6. SAMOTESTIRANJE.....	17
1.7. NEŽELENI UČINKI IN KOZMETOVIGILANCA	17
2. NAMEN DELA.....	20
3. MATERIALI IN METODE	21

4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1.	VSI PREKURZORJI BARVIL	26
4.1.1.	PRIMARNI INTERMEDIATI.....	27
4.1.2.	BARVNI MODIFIKATORJI.....	29
4.2.	ALKALNE SNOVI IN OKSIDANTI	30
5.	TOKSIKOLOŠKI PROFILI SNOVI	31
5.1.	p-FENILENDIAMIN.....	31
5.2.	TOLUEN-2,5-DIAMIN	35
5.3.	REZORCINOL	38
5.4.	m-AMINOFENOL.....	41
5.5.	VODIKOV PEROKSID	43
5.6.	AMONIJAK.....	46
5.7.	OCENA VARNOSTI BARVIL.....	48
6.	SKLEP	50
7.	LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1:	Sestava kutikule in lasu	2
Slika 2:	Sestava povrhnjice in kože	4
Slika 3:	Predstavniki neoksidativnih barvil za lase po skupinah.....	6
Slika 4:	Reakcije tvorbe barvila na primeru PPD in rezorcinola.....	9
Slika 5:	Bandrowskijeva baza.....	16
Slika 6:	Strukturna formula PPD	31
Slika 7:	Strukturna formula TDA	35
Slika 8:	Strukturna formula rezorcinola	38
Slika 9:	Strukturna formula m-aminofenola.....	41

Slika 10: Strukturna formula vodikovega peroksida	43
Slika 11: Strukturna formula amonijaka (zgoraj) in amonijevega hidroksida (spodaj)	46

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Število izdelkov, ki vsebujejo določeno število prekurzorjev barvil	27
Graf 2: Primarni intermediati in število izdelkov, v katerih se pojavljajo	28
Graf 3: Barvni modifikatorji in število izdelkov, v katerih se pojavljajo.....	30

KAZALO TABEL

Tabela I: Odvisnost premera las od rase.....	1
Tabela II: Kombinacije prekurzorjev barvil in vpliv na odtenek.....	7
Tabela III: Predstavniki primarnih intermediatov in barvnih modifikatorjev po skupinah...	8
Tabela IV: Primerjava iritativnega CD in ACD	15
Tabela V: Število neželenih učinkov na milijon prodanih izdelkov po kategorijah(23).....	19
Tabela VI: Število in delež posamezne sestavine v pregledanih izdelkih.....	26
Tabela VII:Število in delež primarnih intermediatov v pregledanih izdelkih.....	28
Tabela VIII: Barvni modifikatorji in delež izdelkov, v katerih se pojavljajo.....	29
Tabela IX: Uporabljene bazične snovi in oksidanti	30
Tabela X: Fizikalno-kemijske lastnosti PPD.....	31
Tabela XI: Vrednosti LD50 za PPD	33
Tabela XII: Izbrani testi genotoksičnosti za PPD.....	34
Tabela XIII: Fizikalno-kemijske lastnosti TDA.....	35
Tabela XIV: Rezultati krpičnih testiranj frizerjev s TDA	36
Tabela XV: Izbrani testi genotoksičnosti za TDA.....	37
Tabela XVI: Fizikalno-kemijske lastnosti rezorcinola.....	38
Tabela XVII: Rezultati testov genotoksičnosti za rezorcinol.....	40
Tabela XVIII: Fizikalno-kemijske lastnosti m-aminofenola.....	41
Tabela XIX: Izbrani testi genotoksičnosti m-aminofenola.....	42
Tabela XX: Fizikalno-kemijske lastnosti vodikovega peroksida	43
Tabela XXI: Fizikalno-kemijske lastnosti amonijaka	46
Tabela XXII: Meje vrednosti amonijaka za toksikološke učinke(35).....	46
Tabela XXIII: Testi genotoksičnosti za amonijak.....	47

Tabela XXIV: LD50, NOAEL in MoS vrednosti izbranih sestavin.....	48
Tabela XXV: Primerjava iritativnih, korozivnih in alergenih lastnosti snovi.....	49
Tabela XXVI: seznam 76 barvil, ki jih lahko uporabljamo v barvah za lase	56

KAZALO PRILOG

Priloga I – seznam 76 snovi, ki se lahko uporabljajo v barvah za lase	57
Priloga II – A- informacije, ki jih prijava neželenih učinkov običajno vsebuje in B- način, kako si pomagamo z odločitvenim drevesom za določitev ocene vzročnosti	59
Priloga III – izračun MoS sestavin predstavljenih v tabeli XXIV.....	61

POVZETEK

V Evropi barve za lase uporablja več kot 60% žensk in 5-10% moških. Več kot 80% barvil na trgu predstavljajo oksidativne barve za lase, zato smo se odločili oceniti varnost oksidativnih barvil, ki se v teh izdelkih uporabljajo. Oksidativna barvila so tista, ki nastanejo *in situ* v lasu z oksidacijo primarnih intermediatov in barvnih modifikatorjev. Barva barvila je rezultat kombinacije prekurzorjev barvil. Omejitve za uporabo v kozmetičnih izdelkih določa priloga III Uredbe Evropskega parlamenta in Sveta 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih. Do sedaj se na pozitivnem seznamu nahaja 76 barvil, varnost 45 pa mora biti še ocenjena. Kljub temu, da so njihove koncentracije uporabe omejene, se neželeni učinki še vedno pojavijo. Najpogostejša neželena učinka sta iritativni in alergijski kontaktni dermatitis, za katerega je značilen pojav papul in pustul na lasišču ter edem obraza. Z neželenimi učinki se ukvarja področje kozmetovigilance, kjer pa je zakonsko urejeno le poročanje o resnih neželenih učinkih.

Na vzorcu 30 izdelkov smo preučili, katere sestavine se pojavljajo najpogosteje in jih razvrstili po namembnosti. V izdelkih se je nahajalo 25 različnih prekurzorjev barvil, od tega je bilo 8 primarnih intermediatov in 17 barvnih modifikatorjev. En izdelek povprečno vsebuje 5 prekurzorjev. Najpogosteje uporabljen primarni intermediat je toluen-2,5-diamin, ki ga vsebuje 77,67% izdelkov. Barvna modifikatorja, ki se uporabljata najpogosteje, sta rezorcinol in m-aminofenol. Oba se nahajata v 56,67% izdelkov. Izbrali smo tudi najvarnejšo in najmanj varno sestavino. Kot najvarnejšo sestavino smo označili 2-amino-3-hidroksipiridin, saj je edina sestavina, ki ni alergena, poleg tega ima tudi visoke vrednosti NOAEL, LD50, ni alergena, hkrati pa je izračunana meja varne uporabe zelo visoka. Najmanj varen je p-fenilendiamin, saj ima poleg izrazito alergenega delovanja nizke tudi NOAEL, LD50 in relativno nizko mejo varne uporabe.

Za čim varnejšo uporabo izdelkov je potrebno določiti meje, ki bi omejile pojav alergijskih reakcij in izboljšati postopek samotestiranja pred nanosom. Uporabniki morajo poskrbeti, da bodo upoštevali navodila za uporabo, saj je velik delež neželenih učinkov posledica nepravilne uporabe izdelka. Če se neželeni učinki vseeno pojavijo, se s tem ukvarja področje kozmetovigilance. V primeru resnih neželenih učinkov obstaja standardiziran sistem poročanja, medtem ko za ostale neželene učinke obravnavo določijo proizvajalci sami.

Ključne besede: barve za lase, oksidativna barvila, ocena varnosti, kozmetovigilanca

ABSTRACT

More than 60% of female and 5-10% of male European population uses hair dye. Oxidative hair dyes represent more than 80% of available dye products which is why we decided to evaluate the safety of oxidative hair dyes that are currently on the market. Oxidative hair dye is formed *in situ* in hair cortex in a coupling reaction between a primary intermediate and a coupler. The shade of the dye results from combination of dye precursors. Concentrations allowed to use are set by Regulation (EC) 1223/2009 on cosmetic products. So far, 76 dyes have been evaluated and are on the positive list. 45 still need to be assessed for their safe use. Even though the limits that are allowed to be used are set, undesirable effects still happen. The most common ones are irritant and allergic contact dermatitis. For allergic contact dermatitis the most common outcome are papules and pustules on scalp and face oedema.

We studied dye precursors, alkalizing and oxidising agents in 30 products and classified the ingredients based on their usage in product. Out of 25 different dye precursors that were present in the products 8 were primary intermediates and 17 of them were couplers. There were on average 5 precursors per product. The primary intermediate that was most frequently used was toluene-2,5-diamine which was present in 77.67% of products. Resorcinol and m-aminophenol were the most used couplers; both appeared in 56.67% of products. One of our goals was also to determine the safest and the least safe ingredient. We selected 2-amino-3-hydroxypyridine as the safest since it is the only ingredient that is not a sensitizing agent. It also has high NOAEL, LD50 and margin of safety values. Based on low NOAEL, LD50, margin of safety values and high skin sensitization potency we chose p-phenylenediamine as the least safe ingredient.

To ensure the safety of the products it is necessary to determine concentrations that would minimize allergic reactions and improve and standardize the self-testing procedure that users are advised to perform before using the cosmetic product. It is necessary for users to follow the instruction since majority of undesirable effects are consequence of misuse. In case undesirable effects occur the area of cosmetovigilance acts and monitors occurrence. If undesirable effects are serious the procedure of reporting are standardised but when they are not serious companies manage them in the way they want.

Keywords: *hair dye, oxidative hair dye, safety evaluation, cosmetovigilance*

SEZNAM OKRAJŠAV

ACD - alergijski kontaktni dermatitis

AST - aspartat aminotransferazni test

CD - kontaktni dermatitis

CTA – test transformacije embrionalnih celic sirijskega hrčka (*Cell Transformation Assay*)

DA– dermalna absorpcija

DNA - deoksiribonukleinska kislina

EC3 – efektivna koncentracija, pri kateri je proliferacija limfocitov glede na kontrolno skupino trikratna

ED10 – efektivni odmerki, pri kateri je 10 % testiranih osebkov pozitivnih

ES - Evropski parlament in Svet

F – pogostost aplikacije kozmetičnega izdelka, ki se uporabi pri izračunu meje varne uporabe

FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila

GPMT - maksimizacijski test pri morskih prašičkih (*Guinea Pig Maximization Test*)

GPx – glutation peroksidaza

LD50 – odmerki, ki povzroči v določenem času smrt 50% živali

LLNA test - test na lokalnih limfnih vozlih miši (*Local Lymph Node Assay*)

MoS - meja varne uporabe

NOAEL – najmanjša količina, ki ne povzroči škodljivih učinkov

NOEL – najmanjša količina, ki ne povzroči učinkov

PPD – p-fenilendiamin

SCCNFP - Znanstveni odbor za kozmetične in neprehrambene izdelke

SCCP - Znanstveni odbor za potrošniške proizvode

SCCS - Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov

SED - količina sistemske izpostavljenosti

SI - stimulacijski indeks

SSA – površina kože, na katero nanesemo kozmetični izdelek, uporabljamo jo pri izračunu meje varne uporabe

TDA – toluen-2,5-diamin

TT - Telesna teža

QDI – kinondiimin

INCI – mednarodna nomenklatura za kozmetične sestavine

1. UVOD

Barve za lase so raznolika skupina kozmetičnih izdelkov, ki omogočajo tako začasno kot trajno modifikacijo naravnega odtenka barve las. Njihova uporaba sega že tisočletja nazaj, saj so že ženske v starem Egiptu in Rimu za barvanje uporabljale kano. V antičnem Rimu so barve uporabljali tudi že moški za temnenje osivelih las. Uporabljali so soli kovin, ki barvo las potemniijo. Danes so na voljo barve za vsako željo – od začasnih do trajnih v številnih odtenkih. Leta 2004 so izdelki za barvanje las predstavljali 8% proizvedene kozmetike v Evropi, kar je znašalo 2,6 milijard €. Zaradi preproste uporabe so priljubljene tako pri mlajši populaciji, ki si želi samo spremeniti barvo, kot pri starejši populaciji, ki barve uporablja večinoma za prekrivanje sivih las. Zaradi pričakovanega trenda staranja prebivalstva pričakujejo, da se bo prodaja izdelkov še povečala, zato je smiselno zagotoviti, da so izdelki res varni (1). Barve za lase lahko uporabljamo samo za spremembo barve las in ne za barvanje trepalnic in obrvi. Le v tem primeru je zagotovljena varnost izdelka, saj se uporaba barv na laseh razlikuje in predstavlja točno določene pogoje uporabe.

1.1. LASJE

Lase sestavljajo tri plasti - kutikula ali povrhnjica, korteks ali skorja in medula ali sredica. Slednja v laseh ni vedno prisotna, saj je izgubila na pomenu, ker je v preteklosti služila za toplotno izolacijo telesa. Odvisnost premera in oblike las od rase prikazuje tabela I.

Tabela I: Odvisnost premera las od rase

Rasa	Povprečen premer (μm)	Premer – oblika
Bela	50	Skoraj ovalna
Črna	80	Ovalna, sploščena
Rumena	100	Okrogla

Večino sestave las predstavljajo proteini keratini, ki predstavljajo 65-95% mase lasu. V laseh se nahaja še do 30% vode, lipidi, pigmenti in elementi v sledovih. Lipidi se v laseh nahajajo v dveh oblikah: kot sestavni del kutikule ali prosti lipidi. Proteini las so bogati s cisteinom, ki omogoča močno povezovanje s sosednjimi molekulami keratina preko disulfidnih vezi s tvorbo cistina, kar je osnova za mehansko odpornost las.

- Kutikula

Stik lasu z okoljem predstavlja kutikula sestavljena iz 6-8 plasti ploščatih celic, ki površino las prekrivajo kot strešniki. Prosti rob celice je usmerjen proti konici lasu. Celice merijo v

dolžino 5-10 μm in 0,3-0,5 μm v debelino. Vsaka celica je sestavljena iz več plasti. Na površini se nahaja epikutikula, ki vsebuje približno 12% cistina. Na površino epikutikule so preko tioestrskih vezi kovalentno vezani lipidi, ki sestavljajo zunanji β -sloj. Glavni predstavnik lipidov je 18-metileikozanojska kislina. Lipidi dajejo površini las hidrofobnost in hkrati zmanjšujejo trenje, kar omeji poškodbe las, ki bi zaradi tega nastale. Pod epikutikulo se nahaja A-sloj, ki vsebuje do 30% cistina, pod A-slojem pa leži eksokutikula, ki vsebuje do 15% cistina. Vse tri plasti celic pripomorejo k mehanski odpornosti las. Pod endokutikulo se nahaja eksokutikula, ki ima nizko vsebnost cistina in zato ni pomembna pri mehanski odpornosti las. Zadnji sloj, ki razmejuje eno celico od druge, je celični membranski kompleks, ki je sestavljen iz notranjega β -sloja, δ -sloja in zunanjega β -sloja, ki razmejuje dve celici. Med zunanjim β -slojem celičnega membranskega kompleksa in površino nove celice delujejo šibke kohezivne sile, zato se z mehansko obremenitvijo celice lahko odstranijo in tako se izpostavi nov sloj 18-metileikozanojske kisline spodnje celice.



Slika 1: Sestava kutikule in lasu (2)

- Korteks

Korteks sestavljajo kortikalne celice in medcelični vezni material. Kortikalne celice so sploščene in potekajo vzporedno z osjo lasu. V dolžino merijo približno 100 μm , v debelino pa 1-6 μm . Celice zavzemajo večino notranje strukture lasu (2). Celice obdaja adhezivni matriks lipidov in proteinov. Glavna sestavina celic je keratin, ki je organiziran v makrofibrile, ki so sestavljeni iz mikrofibril. Mikrofibrile nadalje sestavlja 11 protofibril, ki so sestavljene iz α -vijačnic keratina (3). Pigmenti, ki so zaslužni za barvo las, se nahajajo v prostoru med makrofibrilami v obliki granul. Barvo las določa razmerje med rjavo-črnim eumelaninom in rdečkastim feomelaninom. Pigmente, ki predstavljajo od 1-3% sestave lasu, tvorijo melanociti v lasni čebulici. Ker se s starostjo aktivnost

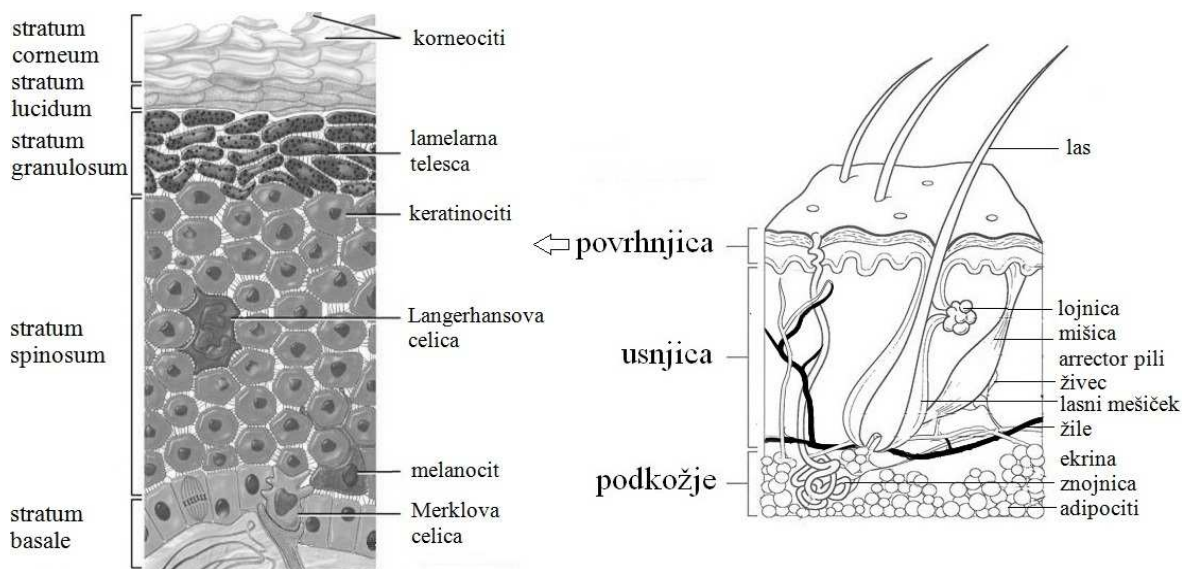
melanocitov zmanjša, je posledica manjše sinteze pigmenta sivenje las, kar skušamo prekriti z uporabo barv za lase. Kljub temu da so ti izdelki namenjeni uporabi na laseh, z vsakim nanosom barv pride v stik z njimi tudi koža, na kateri lahko povzročijo neželene učinke ali pa se preko nje absorbirajo v sistemski obtok (2).

1.2. KOŽA

Najbolj splošna strukturna delitev kože je na tri plasti – *subkutis* ali podkožje, *dermis* ali usnjico in *epidermis* ali povrhnjico. Podkožje sestavljajo skupki maščobnih celic, ki jih pregrajuje vezivno tkivo. V podkožju se nahajajo večje krvne in limfne žile ter izvodila lojnic in znojnic. Nad podkožjem se nahaja usnjica, ki prehranjuje in strukturno podpira povrhnjico. Debelina variira z anatomskim mestom – na koži hrbta dosega debelino 3 mm, medtem ko je debelina na vekah samo 200 μ m. V usnjici najdemo več vrst celic: fibroblaste, ki proizvajajo strukturne proteine in osnovno substanco, ter mastocyte in makrofage, ki predstavljajo komponente imunskega sistema. Glavni sestavini ekstracelularnega matriksa sta proteina kolagen in elastin, ki dajeta koži mehansko odpornost in prožnost. Med glavne sestavine štejemo tudi anionske glikozaminoglikane, ki pripomorejo k vezavi vode. Usnjico lahko razdelimo na retikularno in papilarno plast. Papilarna plast je tanjša in predstavlja zgornjo plast na meji s povrhnjico. Plast je nagubana, kar predstavlja boljše pogoje za prehranjevanje epidermisa, saj vsebuje tanke limfne in krvne žile, z nagubanostjo pa se površina v stiku s povrhnjico poveča.

Glavno bariero pred zunanjimi dejavniki, kot so oksidativni stres, razne kemikalije in bariero pred izhlapevanjem vode iz notranjosti telesa, predstavlja povrhnjica, ki je razdeljena na pet plasti. Prvo plast, ki je na meji z dermisom in leži na bazalni membrani, imenujemo *stratum basale* oz. bazalna plast. Sestavljajo jo celice, ki so sposobne mitoze. Te proizvajajo celice povrhnjice, ki potujejo navzgor in se diferencirajo do korneocitov. V bazalni plasti se nahajajo tudi melanociti, ki proizvajajo melanin. Naslednja plast, ki sestavlja povrhnjico, je *stratum spinosum* oz. trnasta plast. V trnasti plasti se celice začnejo ploščiti, obenem je povečana sinteza citokeratinov. Ti so intermediarni filamenti, ki se začnejo povezovati v dezmosome in tako pripomorejo k mehanski odpornosti. V trnasti plasti se pojavijo lamelarna telesca, ki vsebujejo encime in lipide. Nad trnasto plastjo se nahaja zadnja živa plast celic, to je *stratum granulosum* ali zrnata plast. Ime je dobila po bazofilnih granulah, bogatih s proteini, ki vsebujejo histidin in cistein. Med drugimi se v zrnati plasti pojavi tudi profilagrin. Ti proteini kasneje služijo za prečne povezave snopov

keratina. Lamelarna telesca vsebujejo lipide in hidrolitične encime, ki se v zrnati plasti z eksocitozo izločijo in ustvarijo lipidno bariero. Nad zrnato plastjo se nahaja *stratum lucidum* ali svetleča plast. Ta se nahaja le na mestih, kjer je koža bolj mehansko obremenjena, na primer na stopalih in dlaneh. Sestavlja jo plast celic, ki so transparentne in dajejo svetleč izgled. Zgornji sloj povrhnjice se imenuje *stratum corneum* ali poroženela plast. Sestavlja jo 10-20 plasti poroženelih celic obdanih z lipidnim matriksom. Predstavlja glavno bariero pred izgubo vode iz notranjosti in obrambo pred mehanskimi in kemijski vplivi iz okolja, zato je za razumevanje neželenih učinkov pomembno tudi poznavanje barierne funkcije (4).



Slika 2: Sestava povrhnjice in kože (5,6)

1.2.1 BARIERNA FUNKCIJA KOŽE

Poznavanje barierne funkcije kože je pomembno za oceno varnosti, saj sestavine ne morejo povzročiti neželenih učinkov, če je ne preidejo. Glavno bariero predstavlja povrhnjica, pri kateri je za bariero najbolj zaslužna rožena plast. Ta predstavlja oviro za patogene mikroorganizme, oksidativni stres, preprečuje penetracijo kemikalij in zagotavlja mehansko obrambo pred trenjem. Roženo plast sestavlja 10-20 plasti poliedričnih celic. Zunajcelični lipidi, ki obdajajo korneocite, se nahajajo v bilamelarnih membranah. Urejenost lipidov je ključnega pomena za dobro barierno funkcijo kože. Čeprav so osnovni gradniki rožene plasti korneociti, ki so odmrle celice, to še ni mrtvo tkivo. Vsebuje namreč katalitične encime, ki imajo protimikrobno delovanje, sodelujejo pri nastanku endogenih UV-filtrov, aktivaciji citokinov in regulaciji deskvamacije. Optimalen pH kože je okrog 5. Rahlo kisel pH in nizka hidratacija rožene plasti delujeta inhibitorno na razrast večine

patogenih mikroorganizmov. Protimikrobno delujejo tudi same proste maščobne kisline in sfingozin, ki so gradniki zunajceličnega matriksa. V primeru višanja pH so pogoji za razrast patogenih mikroorganizmov bolj ugodni.

Pri višjem pH je aktivnost serinskih proteaz višja, kar posledično vpliva na manjšo kohezijo rožene plasti, saj proteaze cepijo korneodezmosome. Na barierno funkcijo kože vpliva tudi stres, ker je sinteza lamelarnih granul zaradi porasta endogenih glukokortikoidov manjša. To vpliva tudi na protimikrobno zaščito kože, saj se do rožene plasti protimikrobni peptidi nahajajo v lamelarnih granulah. Na spremembo pomembno vpliva tudi hidratacija. Rožena plast v običajnih pogojih vsebuje približno 12% vode. Dolgotrajna ali kratkotrajna sprememba v hidrataciji poruši običajno razmerje gradnikov roženi plasti in s tem omogoči lažje prodiranje ksenobiotikov v žive plasti kože. Hkrati se poveča transepidermalna izguba vode. Pri uporabi barv za lase na bariero vplivata tako višji pH kot povišanje hidratacije, kar lahko povzroči znatno prehajanje barvil v kožo (7).

1.3. BARVE ZA LASE

Čeprav barve za lase uporabljamo že več tisočletij, se je ideja o danes najbolj priljubljenih oksidativnih barvah za lase porodila ob koncu 19. stoletja. Prvi izdelek se je že kmalu za tem leta 1909 pojavil na tržišču. Danes oksidativna barvila za lase predstavljajo več kot 80% izdelkov te vrste (1). Barve za lase lahko razdelimo na več načinov – po izvoru sestavin, obstojnosti ali vrstah uporabljenih barvil. Ena izmed najbolj splošnih razdelitev barvil je razdelitev na oksidativna in neoksidativna barvila.

1.3.1. NEOKSIDATIVNA BARVILA ZA LASE

Skupino barv z neoksidativnimi barvili sestavlja zelo raznolik spekter barvil glede na obstojnost – od barv, ki se sperejo po enem pranju las do trajno obstojnih.

- **Rastlinska barvila**

Rastlinska barvila so tista, ki jih za barvanje las uporabljamo najdlje. Kot že omenjeno, je bila kana popularna že v starem Egiptu in antičnem Rimu. Barvanje s kano daje lasem rdečkast odtenek. Rdeča barvila, ki se nahajajo v listih rastline, se na keratin vežejo kovalentno, zato je barva s kano obstojna. Še danes je popularna v Indiji, kjer kano zmešajo z indigom, da dobijo temnejši odtenek barve. Za osvežitev svetlejših barv lahko uporabimo tudi cvetove kamilice ali ognjiča. Ognjič daje lasem rumenkast odtenek, kamilica pa poleg tega lase tudi rahlo posvetli. Barvo pridobivamo tako, da posušen rastlinski material uprašimo in nanesemo na mokre lase. Tovrstne barve so danes za

uporabo manj priljubljene, ker ne omogočajo širokega spektra barv, imajo slabšo prekrivnost, po večini so manj obstojne, poleg tega pa vsaka barva ni primerna za vse barve las, saj na primer ognjič na temnih lasih nima učinka. Barve rastlinskega izvora so lahko obstojne, kot na primer kana, ali pa se adsorbirajo na zunanje plasti kutikule in se tako z umivanjem izperejo.

- Kovinska barvila

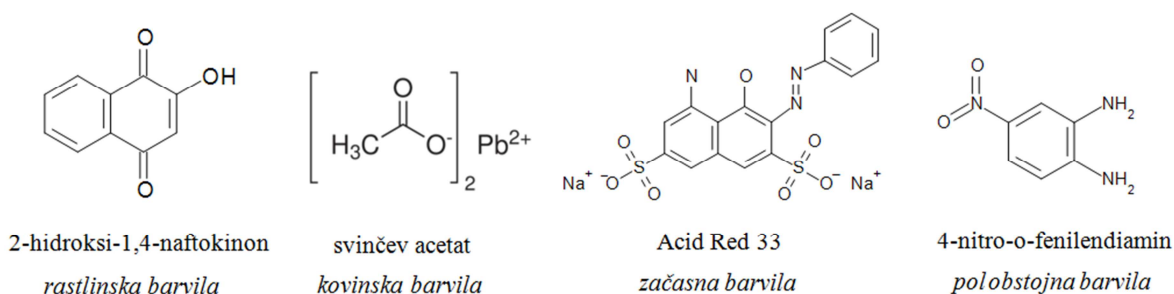
Že v antičnem Rimu so uporabljali barve za lase, ki so temeljile na soleh srebra, bizmuta in svinca. Uporabljali so jih predvsem moški, saj takšne barve omogočajo postopno temnenje las. Tiolne skupine, ki se nahajajo v stranskih skupinah aminokislin proteinov las, reagirajo s prej omenjenimi solmi, da nastanejo kovinski sulfidi. Slaba stran takšnih barvil je neprijeten vonj, ki se sprošča ob reakciji in nepredvidljivost odtenka. Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) dovoljuje uporabo svinčevega acetata in bizmutovega citrata, medtem ko v Evropi svinčeve spojine niso dovoljene (8).

- Začasna barvila

Začasna barvila so tista, ki se sperejo že po prvem umivanju las. Uporabljamo jih predvsem za osvežitev barve. Prekrijejo lahko do 15% sivih las. Gre za visokomolekularna barvila, ki se adsorbirajo na površino las in se ob umivanju z las izperejo. Najpogosteje uporabljamo azo barvila, barvila osnovana na trifenilmetanu, indofenole in indoamine.

- Polobstojnabarvila

Polobstojna barvila za lase sestavljajo nizkomolekularna barvila, ki se izperejo po 6-8 tednih. Barvila zaradi majhne molekulske mase lahko difundirajo v zunanje plasti kutikule. Izdelek uporabljamo tako, da ga po umivanju naneseemo na lase, po 10 – 30 minutah je potrebno izdelek izprati. Polobstojnih barv ne moremo uporabljati za svetljenje las. Pogosti predstavniki barvil so nitro barvila (derivati p-fenilendiamina (PPD) in o-fenilendiamina), kislj barvila, ki vsebujejo sulfonsko ali karboksilno skupino, ali bazična barvila – to so barvila, ki vključujejo kvarterne amonijeve skupine (9).



Slika 3: Predstavniki neoksidativnih barvil za lase po skupinah

1.3.2. OKSIDATIVNA BARVILA ZA LASE

Najbolj priljubljena vrsta barv za lase so oksidativne barve za lase, ki popolnoma prekrijejo sive lase, se ne izperejo in omogočajo široko izbiro odtenkov. Ti izdelki vsebujejo barvila, ki nastanejo z oksidacijo dveh prekurzorjev, zato barve in barvila imenujemo oksidativna. Izdelek je običajno sestavljen iz treh komponent, od katerih sta prvi dve namenjeni barvanju las, tretja pa regeneraciji po barvanju. Prvo komponento izdelka predstavlja zmes prekurzorjev barvil – primarnih intermediatov in barvnih modifikatorjev. pH te raztopine ali emulzije je bazičen, okrog 9-10, kar omogoča nabrekanje las in prodiranje barvil v korteks las. Za uravnavanje pH običajno uporabljamo amonijak in etanolamin. Poleg prekurzorjev barvil uporabljamo še pomožne snovi, kot so zgoščevalci, kelatorji kovinskih ionov, konzervansi in topila. Druga komponenta, ki se imenuje razvijalec, vsebuje oksidant, ki je v večini primerov vodikov peroksid. Ta ima v izdelku dvojno nalogo – v korteksu las sproži tvorbo barvil in hkrati razbarva las z oksidacijo melanina. Pred nanosom barve je potrebno komponento s prekurzorji in razvijalec zmešati. Zmes nato nanesemo na lase in pustimo 30 minut, nakar je izdelek potrebno z las sprati (9). Izdelki lahko vsebujejo do 12% vodikovega peroksida (10). Barve običajno vsebujejo 6% ali 9% peroksida. Od vrste barve je odvisno, ali je potrebno svetljenje ali ne. Barvo določa kombinacija barvnega modifikatorja in primarnega intermedata. Tako lahko en primarni intermediat tvori z različnimi barvnimi modifikatorji več odtenkov barvil. Vpliv izbranega intermedata na odtenek prikazuje tabela II.

Tabela II: Kombinacije prekurzorjev barvil in vpliv na odtenek

Barvni modifikator	Primarni intermediat	
	PPD*	<i>p</i> -aminofenol
m-fenilendiamin	Modrovijolična	Vijolična
rezorcinol	Zelenorjava	Rumenorjava
2-metilrezorcinol	Rumenorjava	Rumeno-bež
m-aminofenol	Rdečerjava	Svetlooranžna
2-aminopiridin	Temno sivomodra	Svetlo sivozelena
4-amino-2-hidroksitoluen	Rdečevijolična	Oranžnordeča
1-naftol	Modrovijolična	Rdečevijolična

Primarni intermedati so predvsem aromatski diamini in aminofenoli, kjer je hidroksi ali amino skupina na *para* ali *orto* mestu glede na amino skupino. Barvne modifikatorje predstavljajo snovi, ki so aromatski m-diamini, m-aminofenoli in *meta* substituirani polifenoli. Barvni modifikatorji, ki imajo glede na hidroksilno in amino skupino na *para* mestu samo eno prosto mesto, bodo tvorili dimere. Modifikatorji, ki imajo obe *para*

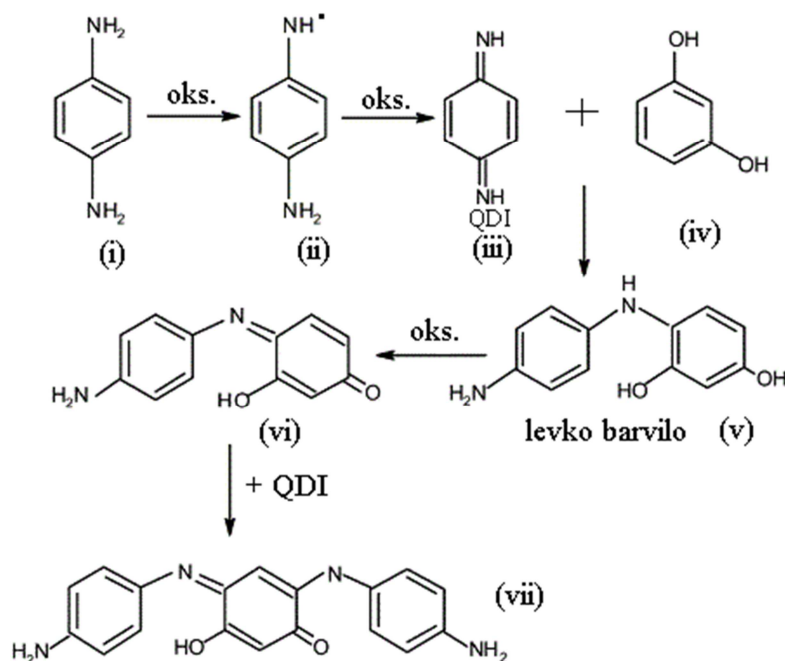
poziciji prosti, lahko tvorijo trimere, tako da je razmerje primarnih intermediatov in modifikatorjev 2:1. Nekateri predstavniki barvil so po skupinah navedeni v tabeli III (9).

Tabela III: Predstavniki primarnih intermediatov in barvnih modifikatorjev po skupinah

Primarni intermediati	
Aromatski diamini	PPD
	TDA*
Aminofenoli	o-aminofenol
	6-amino-m-krezol
Barvni modifikatorji	
m-diamini	2,4-diaminofenoksietanol
	2-amino-4-hidroksietilaminoanizol
	2,6-dihidroksietilaminotoluen
m-aminofenoli	m-aminofenol
	4-amino-2-hidroksitoluen
	5-amino-6-kloro-o-krezol
m-polifenoli	rezorcinol
	hidrokinon
	1-naftol

* TDA- toluen-2,5-diamin

Če za tvorbo barvila ni razpoložljivega modifikatorja, lahko primarni intermediat reagira z drugo molekulo intermedata. Reakcije primarnih intermediatov med seboj so veliko počasnejše od reakcij primarnih intermediatov z modifikatorjem, zato naj se ti v izdelkih ne bi pojavljali. Izpostavljenost možnim produktom reakcij ob tvorbi kombinacije barvil je preveril tudi Znanstveni odbor za potrošniške proizvode (SCCP), ki je potrdil odsotnost Bandrowskijeve baze (trimera PPD), za katero sumijo alergenost, in prisotnost samo pričakovanih produktov tvorbe barvil. Mehanizem tvorbe barvil predstavlja slika 3, ki prikazuje reakcijo med PPD (i) in rezorcinolom (iv). Primarni intermediat (i) se najprej oksidira do semikinon diimina (ii), ki nato hitro reagira do kinondiimina (QDI) (iii). QDI nato reagira z barvnim modifikatorjem (iv), da nastane levko barvilo (v). Ta se nato oksidira do zadnjega produkta, ki predstavlja barvilo (vi in/ali vii).



Slika 4: Reakcije tvorbe barvila na primeru PPD in rezorcinola

Prekurzorji barvil se v barvah nahajajo v presežku. V mnenju SCCP/0941/05 so prikazali rezultate kombinacije 11 prekurzorjev barvil in ugotovili, da je po 30 minutah delež oksidiranih barvil obsegal 0,05 % do 0,65% formulacije. Iz teh rezultatov je smiselno sklepati, da je pomembno poznati varnost tako vhodnih sestavin kot tvorjenih barvil. Koncentracije, ki jih lahko varno uporabljamo, so določene z zakonodajo (11).

1.4. ZAKONODAJA

Uredba Evropskega Sveta 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih definira v 2. členu uredbe kozmetični izdelek kot:

“katero koli snov ali zmes, namenjeno stiku z zunanjimi deli človeškega telesa (povrhnjico, lasiščem, nohti, ustnicami in zunanjimi spolnimi organi) ali z zobmi in sluznico ustne votline zaradi izključno ali predvsem njihovega čiščenja, odišavljenja, spreminjanja njihovega videza, njihovega varovanja, ohranjanja v dobrem stanju ali korekcije telesnega vonja.”

Zakonodajno področje kozmetičnih izdelkov ureja Uredba Evropskega parlamenta in Sveta 1223/2009 o kozmetičnih izdelkih, ki zahteva, da kozmetični izdelek ne sme škodovati zdravju ljudi. Varnost izdelka mora zagotoviti proizvajalec, uvoznik ali trgovec. Uredba vključuje 8 prilog, ki v večji meri regulirajo uporabo snovi. Priloga I predpisuje obliko poročila o varnosti kozmetičnega izdelka. Naslednje priloge se nanašajo na uporabo sestavin v izdelkih. Prilogo II sestavlja seznam snovi, ki se v kozmetičnih izdelkih ne

smejo uporabljati. V prilogi III najdemo seznam snovi, ki jih kozmetični izdelki ne smejo vsebovati, razen tiste, za katere veljajo omejitve. Priloga III določa, v kateri vrsti izdelka in pod kakšnimi pogoji snov lahko uporabljamo ter opozorila, ki morajo biti označena na embalaži. V to kategorijo sodijo tudi vsa barvila za lase. V prilogah IV, V in VI najdemo sezname barvil, konzervansov in UV-filtrov, ki jih lahko uporabljamo. V prilogi VII so predstavljeni simboli, ki se uporabljajo na primarni ali sekundarni embalaži, zadnja priloga VIII pa vsebuje popis potrjenih alternativnih metod testiranja (10).

Mnenja in ocene varnosti za področje kozmetičnih izdelkov podaja Znanstveni odbor za varstvo potrošnikov (SCCS), ki je leta 2008 nadomestil SCCP. Pred letom 2004 je strategijo ocenjevanja varnosti barvil za lase vpeljal Znanstveni odbor za kozmetične in neprehrambene izdelke (SCCNFP). Mnenja komisij se upoštevajo pri izdelave seznamov, ki sestavljajo priloge uredbe. Področje barv za lase je bilo še nedolgo nazaj slabo regulirano, zato so vpeljali proces ocene varnosti barvil v treh korakih, pri katerem so sodelovale vse tri našteje komisije. Barvila niso deli priloge IV, saj v to kategorijo spadajo samo barvila, ki dajejo barvo na podlagi absorpcije in odboja. Ta definicija ne vključuje oksidativnih barvil za lase, ker ta nastanejo s kemijsko reakcijo (10). Proces ocenjevanja je potekal v treh korakih. V prvem koraku so morali proizvajalci do določenega roka priskrbeti podatke o varnosti sestavin. SCCP je s pomočjo teh izdelal mnenja, kar je predstavljalo drug del strategije, SCCS pa danes ta mnenja po potrebi tudi dopolnjuje. Glede na to, da se vsi zbrani podatki nanašajo na posamezne sestavine, torej samo na primarne intermediate ali barvne modifikatorje, so v zadnjem delu ocene ocenili izpostavljenost reaktantom in reakcijskim produktom ter sistemsko izpostavljenost barvil ob barvanju (12).

1.4.1. OCENA VARNOSTI KOZMETIČNEGA IZDELKA

Ocena varnosti kozmetičnega izdelka se sprejme na podlagi varnosti njegovih sestavin. Po pregledu fizikalno-kemijskih lastnosti in mednarodne identifikacije spojine o varnosti odločajo različni testi. Z 11. marcem 2013 je v veljavo stopila popolna prepoved testiranja na živalih, zato so ob testiranih toksikoloških učinkih navedena tudi razpoložljiva *in vitro* testiranja. Na trgu se pogosto pojavijo nove, večinoma aktivne sestavine. Te navadno pridobivajo ali uvažajo v območju od 1-10 ton. V tem primeru mora proizvajalec oz. uvoznik za dokaz varnosti priskrbeti vsaj podatke o akutni toksičnosti, iritaciji in

korozivnosti, sposobnosti senzitivizacije kože, dermalni absorpciji, toksičnosti po ponavljajoči aplikaciji in genotoksičnosti.

- Iritacija in korozivnost

S testi korozije ocenimo zmožnost snovi, da na koži pusti trajne posledice. Pred prepovedjo testiranja na živalih so teste najpogosteje izvajali na koži zajcev. Danes za oceno korozivnosti snovi obstaja 5 validiranih *in vitro* metod. Testi iritacije so tisti, ki opazujejo reverzibilne poškodbe kože po aplikaciji snovi za čas 4 ur. Za oceno iritacije snovi *in vitro* lahko uporabljamo tri validirane teste, ki temeljijo na rekonstruiranem človeškem epidermisu. Pomembni so tudi testi iritacije oči, ki so bili razviti z namenom opazovanja korozivnosti ali iritativnosti snovi v človeškem očesu. Najbolj znan test je Draizeov test na zajčjem očesu, pri katerem snov za določen čas apliciramo v zajčje oko in ga opazujemo nadaljnjih 21 dni. Alternativna *in vitro* metoda danes še ne obstaja razen, testa na izoliranem govejem ali kokošjem očesu, vendar je ta primeren le za določanje močnih iritantov ali korozivnih snovi.

- Alergenost

Senzitizer ali alergen je snov, ki lahko pri določenih osebah povzroči alergijsko reakcijo. Za določanje alergenega potenciala po dermalnem nanosu snovi poznamo več *in vivo* metod, med drugimi test na lokalnih limfnih vozlih miši (LLNA), maksimizacijski test pri morskih prašičkih (GPMT) in Buehlerjev test. Najbolj znan in uporabljen je test LLNA, ki temelji na primerjavi proliferacije limfocitov skupine živali, ki je izpostavljena snovi, in kontrolne skupine. Rezultat podamo kot stimulacijski indeks (SI), ki je količnik med proliferacijo limfocitov testne in kontrolne skupine. Ta je sorazmerna koncentraciji aplicirane snovi, zato lahko snovi med seboj primerjamo. Za primerjavo alergenov služi vrednost EC₃, ki predstavlja koncentracijo snovi, pri kateri je proliferacija limfocitov glede na kontrolo trikratna (13).

Alergene na podlagi testa LLNA klasificiramo v tri skupine:

- zmerni alergen, ko je EC₃ vrednost večja od 2,0%,
- močan alergen, ko je EC₃ vrednost manjša ali enaka 2,0% in večja od 0,2%,
- ekstremen alergen, ko je EC₃ vrednost manjša ali enaka 0,2%.

Alergene snovi označujemo z oznako R43. Ta podaja informacijo, da snov lahko povzroči alergijsko reakcijo. To oznako snovi pridobijo, če je v Buehlerjevem testu vsaj 15% živali pozitivnih, v GPMT mora ta pogoj izpolniti 30% živali, v testu LLNA pa mora snov

povzroči vsaj trikratno povečanje proliferacije limfocitov. Če se snov z oznako R43 nahaja v kozmetičnem izdelku, mora biti na ovojni dodano opozorilo: »*Lahko povzroči alergične reakcije. Vsebuje [ime snovi]*«.«(14).

Čeprav *in vitro* alternativa še ni na voljo, je nekaj testov v postopku validacije. Eden od testov je *Direct Peptide Reactivity Assay* test, ki preučuje sposobnost snovi, da se veže na proteine kože, ki tako postanejo imunogeni. Ta test bi bil primeren za oceno alergnosti barvil za lase, saj so barvila lahko prohapteni.

- Dermalna absorpcija

Eden od osnovnih parametrov, ki jih moramo za oceno varnosti in izračun meje varne uporabe (MoS) poznati, je dermalna absorpcija. *In vitro* testi dermalne absorpcije, ki jih izvedemo s Franzovimi difuzijskimi celicami, so že dobro uveljavljeni. Najpogosteje uporabljeni membrani sta prašičja ali človeška koža. Snov se šteje za sistemsko razpoložljivo, ko preide iz rožene plasti v žive plasti kože. Pri izvajanju meritve je pomembno, da se snov nahaja v podobnem vehiklu, kot je v izdelku, saj lahko tudi ostale komponente pripomorejo k absorbirani količini. Za zanesljivo oceno absorpcije SCCS priporoča, da jo izvedemo na vsaj osmih primerkih kože vsaj štirih donatorjev. Ustrezna morabiti tudi masna bilanca, ki mora biti v območju od 85-115%. V primeru izpolnjenih pogojev za dobro meritve, za izračunu MoS uporabimo seštevek aritmetične sredine meritve in standardne deviacije. Če je variabilnost rezultatov visoka ali je masna bilanca neprimerna pri manjšem številu rezultatov – na primer, da je izmed desetih celic masna bilanca primerna v sedmih – uporabimo seštevek aritmetične sredine in dveh standardnih deviacij. Primer neizpolnjenih pogojev je predstavljen v nadaljevanju v poglavju o rezorcinololu (str. 38).

- Akutna toksičnost

Testi akutne toksičnosti opisujejo vpliv škodljivih učinkov na zdravje, ki so posledica enkratne izpostavitve snovi. S pomočjo akutnih testov določimo LD50, ki služi primerjavi in klasifikaciji toksičnosti snovi. Teste akutne toksičnosti izvajamo na živalih, *in vitro* metoda, s katero bi lahko nadomestili *in vivo* študije, še ni na voljo. Obstajajo pa alternativni *in vivo* testi, ki jih izvajamo na manjših skupinah živali ali pri katerih ne opazujejo odmerkov, ki povzročijo smrt, ampak učinke snovi na živali.

- Toksičnost pri ponovljivih odmerkih

Testi ponavljajoče aplikacije nam podajo informacijo o vplivu snovi na organizem po daljši časovni izpostavljenosti. Omogočajo identifikacijo tarčnih organov, na katere snov

vpliva, in vpliv snovi na življenjsko dobo. Te študije izvzemajo podatke o karcinogenosti, genotoksičnosti in reproduktivni toksičnosti. Najpogosteje izvajamo 28-dnevne in 90-dnevne študije, možna je tudi izpostavitve snovi na dve leti. S pridobljenimi podatki določimo najmanjšo količino snovi, ki ne povzroči škodljivih učinkov (NOAEL), ki jo uporabimo pri računanju MoS. Prav tako kot za teste akutne toksičnosti *in vitro* metoda za zdaj še ne obstaja.

- Mutagenost in genotoksičnost

Mutagenost je definirana kot pojav, pri katerem snov inducira stalne prenosljive spremembe dednega materiala. Spremembe lahko prizadenejo gen, genski segment ali kromosome. Genotoksičnost je v primerjavi z mutagenostjo širši pojem, saj se nanaša tudi na procese, ki spreminjajo vsebnost in strukturo deoksiribonukleinske kisline (DNA). Tako testi genotoksičnosti vključujejo tudi teste, ki spremljajo poškodbe DNA. Za oceno genotoksičnosti uporabljamo kombinacijo vsaj treh testov, s katerimi preverjamo vse posledice genotoksičnosti: mutagenost na genskem nivoju, anevplodijo in klastogenost. Klastogena snov povzroči prekinitev kromosomov, ki se kaže v preurejanju ali izgubi kromosomskih segmentov; anevplodija pa je pojav, pri katerem se v celici spremeni število kromosomov. Za testiranje genske mutacije uporabljamo kombinacijo testov povratne mutacije bakterij ter *in vitro* test mutacij sesalskih celic lokusa timidin kinaze (*tk* lokus) in hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaze (*hprt* lokus). Za opazovanje klastogenosti in anevplodije uporabljamo enega od naslednjih testov: *in vitro* mikronukleusni test ali *in vitro* test kromosomskih aberacij. Ker se večina snovi v telesu metabolizira, je teste potrebno izvesti tudi ob prisotnosti metabolnega sistema. Najpogosteje uporabljamo mešanico S9, ki vsebuje jetrne encime pridobljene iz homogenata podganjih jeter.

- Karcinogenost

Snov je karcinogena, če inducira nastanek tako benignih kot malignih tumorjev. Karcinogene lahko razdelimo na genotoksične ali ne-genotoksične. Za prve velja, da snov povzroči tumorje zaradi spremembe genetskega materiala, medtem ko so pri negenotoksičnih karcinogenih mehanizmi drugačni. Validiran *in vitro* test, ki bi pokrival obe vrsti karcinogenov, še ne obstaja. Eden od obetajočih testov temelji na transformaciji embrionalnih celic sirijskega hrčka (CTA), ki naj bi detektiral obe vrsti snovi.

- Reprodukativne toksikološke študije

Študije teratogenosti ugotavljajo vpliv snovi na reprodukcijo. Običajno izvajamo eno- in dvogeneracijsko študijo, kjer opazujemo preživelost zarodkov in strukturne ter funkcijske

nepravilnosti. Obstajajo *in vitro* testi embriotoksičnosti, ki lahko posnemajo vmesne stopnje teh testov, vendar ti še ne pokrivajo celotnega obdobja in ne dajejo celotne slike.

- Toksikokinetične študije

Te študije opisujejo časovno usodo snovi v telesu ter njeno absorpcijo, distribucijo, biotransformacijo in izločanje. Trenutno ni na voljo *in vitro* alternative.

- Fototoksičnost in fotoiritacija

Za fotoiritacijo obstaja validirana *in vitro* metoda, ki primerja citotoksičnost snovi ob in brez izpostavitve snovi UV-VIS svetlobi, na enakem principu delujejo tudi testi fotomutagenosti. *In vitro* metoda, s katero bi lahko zaznali fotosenzitizacijo, ne obstaja.

Zadnji korak pri oceni varnosti sestavine je izračun MoS, s katerim rezultate živalskih testiranj prenesemo na izpostavljenost človeka. Izpostavitev snovi označimo za varno, če je količnik med NOAEL in količino sistemske izpostavljenosti (SED) vsaj 100. Vrednost SED opisuje količino sistemsko razpoložljive snovi ob predvidljivi uporabi. Pri preračunu upoštevamo površino dela telesa, kjer se izdelek uporablja, dermalno absorpcijo, povprečno maso človeka (60 kg) in frekvenco aplikacije. V tem izračunu je upoštevan faktor 10 (4,0 x 2,5) za razlike v kinetiki in dinamiki med vrstami in faktor 10 (3,2 x 3,2) za iste razlike znotraj vrste. To razmerje ni fiksno in se glede na razpoložljive informacije o snovi lahko spreminja. Za barve za lase je značilno, da je za nekatere toksikokinetika dobro opisana na človeku ali pa so parametri pri ljudeh in živalih primerljivi, zato lahko del faktorja medvrstnih razlik izpustimo in posledično je zahtevani MoS štirikrat manjši, kar znaša 25. Za test dermalne absorpcije barvil za lase priporočajo nanos višjega odmerka izdelka, kot je to običajno, in sicer 20 mg/cm² kože. Za realno oceno dermalne absorpcije mora biti čas izpostavitve enak kot pri uporabi barve- od 30 do 45 minut (13).

V zadnjem desetletju se je tako na podlagi obstoječih podatkov oblikoval pozitiven seznam barvil s 76 barvili, ki jih lahko uporabljamo v izdelkih. Seznam zajema vse vrste barv za lase in je del priloge III. 2. avgusta 2012 je bila sprejeta direktiva o pozitivnem seznamu snovi, ki predvideva spremembo priloge II in III. Do 1. marca 2013 so morale države članice sprejeti direktivo, ki začne veljati 1. septembra 2013. Zdaj ostaja za oceno varnosti še 45 snovi. Za te snovi veljajo do sedaj določene omejitve za uporabo (1, 15). Prilogo I, dodano diplomski nalogi, sestavlja seznam dovoljenih barvil v barvah za lase in klasifikacija SCCS, ki kategorizira barvila glede na sposobnost povzročanja preobčutljivosti. Ocene varnosti, s katerimi so ustvarili seznam, niso zajemale sposobnosti

snovi, da povzroči preobčutljivost, zato namerava Evropska komisija v naslednjih letih urediti še to področje, da se možnost alergijskih reakcij čim bolj zmanjša (16). Ker so alergijske reakcije poleg iritacije pogosti neželeni učinki barv za lase, v nadaljevanju navajamo najpogostejše oblike teh reakcij.

1.5. KONTAKTNI DERMATITIS

Najpogostejši neželeni učinek barv za lase je kontaktni dermatitis, ki ima lahko resnejše posledice. Dermatitis je vnetje kože, ki se v primeru, da ga povzroči zunanji dejavnik, imenuje kontaktni dermatitis (CD). Dva glavna tipa CD sta iritativni in alergijski kontaktni dermatitis (ACD). Iritativni CD je omejen na področja kože, ki so bila v stiku s snovjo, ki je povzročila reakcijo. Na splošno je med populacijo v primerjavi z ACD bolj razširjen. Pogosto se pojavi na dlaneh, saj so te izpostavljene velikemu številu snovi. Iritativni CD lahko povzročijo abrazivi, detergenti in tudi voda – to so snovi, ki oslabijo barierno funkcijo kože. ACD se od iritativnega razlikuje po mehanizmu, saj je reakcija pri ACD imunsko posredovana preobčutljivostna reakcija tipa IV. ACD se lahko pojavi na različnih področjih telesa in ni omejen le na mesto izpostavitve alergenih snovi.

Tabela IV: Primerjava iritativnega CD in ACD

Značilnost	Iritativni CD	ACD
<i>Potreben predhodni stik s snovjo</i>	ne	da
<i>Imunski odziv</i>	ne	da
<i>Prizadeto mesto</i>	mesto stika s snovjo	mesto stika s snovjo in oddaljena mesta
<i>Časovni okvir</i>	hiter nastop po kontaktu	>24 ur

Iritativni CD in ACD lahko soobstajata. Za razlikovanje je potrebno izvedeti čim več informacij o času izpostavitve in nastanku reakcije, mestu stika s snovjo in prejšnji izpostavitvi snovi, za katero sumimo, da je alergen. ACD je ena najpogostejših reakcij pri barvah za lase. To so dokazali tudi v Združenem Kraljestvu, saj so ugotovili, da je poklic z najpogostejšim pojavljanjem CD frizerstvo (18). Podatki o neželenih učinkih niso popolnoma točni, saj uporabniki posledic pogosto ne sporočijo. Na Danskem neželene učinke barv za lase sporoči 5,3% uporabnikov, medtem ko v Združenem Kraljestvu enako stori 14%. Razliko so pojasnili tako, da so na Danskem bolj priljubljene svetle barve, ki vsebujejo manj barvil, ki pogosteje povzročajo reakcije. Najpogostejša reakcija na barve za lase je ACD, vendar se zelo redko pojavijo tudi takojšnje preobčutljivostne reakcije tipa I, kot so astma, kontaktna urtikarija in anafilaktični šok.

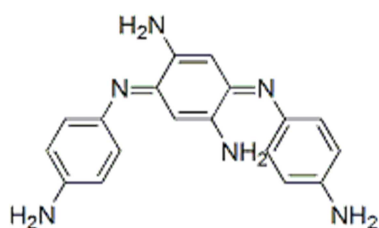
1.5.1. ALERGIJSKI KONTAKTNI DERMATITIS

Simptomi in znaki, ki kažejo na ACD, so srbečica, pekoč občutek, zbadanje in pojav papul. Pri hujših oblikah je značilen predvsem edem obraza in eritem, ki se lahko razteza z lasišča po vratu in zgornjem delu prsnega koša. Neželeni učinki lahko trajajo od nekaj ur do nekaj dni (18). ACD diagnosticiramo s krpičnimi testi, ki jih ocenjujemo kot 70-80% natančne. To natančnost omogočajo kontrolirani pogoji– na kožo hrbta naneseemo določeno količino potencialnega alergena v določenem volumnu in vehiklu, določen pa je tudi čas odčitavanja rezultatov (17).

Snov lahko izzove imunski odziv šele, ko preide roženo plast in vstopi v žive plasti epidermisa. Za sestavine kozmetike je značilno, da so hapteni. To so snovi, ki po vstopu v kožo reagirajo z njenimi proteini (18). V primeru barvil za lase gre za prohaptene, saj sama barvila s proteini ne reagirajo. Prohapteni so kemikalije, ki se v koži pretvorijo v bolj reaktivno in nato reagira s komponentami kože, ki postanejo imunogene in tako prepoznavne za imunski sistem (17). Alergene v epidermisu privzamejo Langerhansove celice, v manjši meri pa tudi ostale dendritične celice, ki se nahajajo v nižjih plasteh kože. Proces migracije in diferenciacije uravnava predvsem TNF- α in IL-1 β . Dendritične celice po privzemu antigena dozori in antigen predstavijo na površini. Potujejo do področnih bezgavk, kjer aktivirajo limfocite T.

Količina antigena, ki je potrebna za senzitivizacijo, je odvisna od intrinzičnih lastnosti snovi in tudi vehikla, ki lahko vpliva na prehod snovi skozi roženo plast. Ker podatki o izpostavitvi alergenu na maso snovi glede na telesnotežo (TT) človeka ne bi imeli velike informativne vrednosti, je podatke o snovi bolj smiselno podati kot odmerek snovi na površino kože. Obstajajo namreč meje, do katerih količina alergena ne povzroči vidnih posledic, saj je odziv zavrt. Če je koža poškodovana in je posledica tega večja količina izraženih proinflammatoryh citokinov, je verjetnost alergijske reakcije na snov višja, na kar opozarjajo tudi navodila na embalaži (19).

Eden od najbolj znanih kontaktnih alergenov v kozmetiki je PPD. Ta je del Evropske



Slika 5: Bandrowskijeva baza

standardne serije alergenov z 1% raztopino PPD. Je edino barvilo za lase, ki ga testiramo, saj naj bi bil zaslužen za največje število ACD. PPD je prohapteni, saj je aromatski amin, za katere je značilno, da ne reagirajo s komponentami kože. Eden možnih alergijskih produktov je Bandrowskijeva baza, ki je trimer PPD. Točna snov, ki

povzroča preobčutljivost, še ni znana. Alergije na PPD so bolj pogoste pri ljudeh, ki so uporabljali začasne tetovaže s črno kano, ki ji temno obarvanost daje PPD. Ta v izdelkih za poslikavo telesa sicer ni dovoljen (18).

1.6. SAMOTESTIRANJE

ACD lahko potrdimo samo s krpičnimi testi, ki potekajo pod kontroliranimi pogoji. Čas izpostavitve snovem je 48 ur. Po 48 urah v ta namen usposobljeno osebje pregleda in določi rezultate. Po 96 urah rezultate pregledamo še enkrat zaradi možnosti zakasnjene reakcije. Kontrolirana sta vehikel, v katerem je alergen, ter mesto nanosa na hrbtu. Vse to daje zanesljive rezultate.

Barve za lase imajo v navodilih za uporabo opisan postopek testiranja, ki naj bi zmanjšal število neželenih učinkov in opozoril na možno alergično reakcijo na sestavine izdelka. Navodila za testiranje se zelo razlikujejo med proizvajalci. Določeni proizvajalci priporočajo testiranje na koži za ušesom, medtem ko drugi na koži notranjega dela roke. Ena od težav je tudi nenatančnost pri opisu odmerjanja, saj je navedeno, da naj uporabniki testirajo majhno količino izdelka. Čas izpostavitve izdelka zelo variira – od 45 min do 48 ur. Nekateri priporočajo samo nanos komponente, ki vsebuje barvila, medtem ko nekateri nanos mešanice izdelka. Zaradi velikega števila spremenljivk to ni zagotovilo, da koža ne bo reagirala na barvilo. Testiranje lahko tudi povzroči preobčutljivost, saj komponenta z barvili vsebuje visoko koncentracijo barvil. Testi izvajajo potrošniki sami, zato predlagajo uvedbo ocenjevalne lestvice, ki bi olajšala presojanje rezultatov. Rezultati testov so lahko lažno negativni, zato to ne more biti zagotovilo za varnost izdelka. Kljub vsem preventivnim ukrepom in opozorilom na embalaži včasih pride do neželenih učinkov, s katerimi se ukvarja področje kozmetovigilance (20).

1.7. NEŽELENI UČINKI IN KOZMETOVIGILANCA

Uredba 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta o kozmetičnih izdelkih neželene učinke razvrsti v dve kategoriji: neželene učinke in resne neželene učinke. V drugem členu uredbe jih definira z besedami:

Neželeni učinek:

“pomeni za zdravje ljudi nevarno reakcijo, ki se lahko pripiše običajni ali razumno predvidljivi uporabi kozmetičnega izdelka.”

Resni neželeni učinek:

“pomeni neželeni učinek, ki povzroči začasno ali stalno funkcionalno nezmožnost, invalidnost, hospitalizacijo, prirojene nepravilnosti ali neposredno bistveno tveganje ali smrt.”

V času pisanja uredbe model sporočanja neželenih učinkov še ni obstajal, zato zakon ugotavlja, da bi bilo takšno obveščanje o resnih neželenih učinkih potrebno in da bi morali pristojni organi voditi evidenco kozmetičnih izdelkov, ki lahko resno škodujejo zdravju. Odgovorna oseba mora zagotoviti, da so informacije o neželenih ali resnih neželenih učinkih lahko dostopne javnosti. Področje obveščanja o neželenih učinkih ureja 23. člen uredbe. V primeru resnih neželenih učinkov morajo odgovorna oseba in distributerji to sporočiti pristojnim organom države članice, v kateri se je neželeni učinek pojavil, ti pa informacijo sporočijo ostalim članicam. Sporočiti morajo znane in pričakovane neželene učinke, ime izdelka in ukrepe, če so bili ti ob pojavu dogodka sprejeti (10).

Večina evropskih držav nima uradnega in zanesljivega sistema poročanja o neželenih učinkih. Panožno združenje kozmetične industrije v Evropski uniji – Colipa (danes Cosmetics Europe), je leta 2005 izdalo smernice za opis neželenih učinkov, ki razlikujejo med neželenimi učinki in neželenimi dogodki. Neželene dogodke lahko prijavijo uporabniki, zdravstveno osebje ali pristojni organi. Vsako podjetje mora voditi evidenco le-teh, jih dokumentirati in oceniti, preučiti pogostost pojavljanja in sprejeti morebitne ukrepe. Najprej je potrebno dokazati, da se je dogodek zgodil, takrat je označen kot neželeni dogodek. Temu sledi zbiranje podatkov in ocenjevanje verjetnosti. Vsak dogodek mora imeti svojo mapo, ki je označena s številko in tako omogoča nedvoumno prepoznavanje dogodka. Vsebovati mora podatke o vrsti neželenega dogodka, časovnem poteku, omogočati mora identifikacijo kozmetičnega izdelka ter podatke o osebi, ki je neželeni dogodek sporočila ali o uporabniku samem. Nato se po smernicah oceni verjetnost, da je neželeni dogodek povzročil kozmetični izdelek. Imenuje se vzročnost oz. angleško *causality*. Odločitev se izvede glede na pridobljene podatke o časovnem okvirju poteka dogodka, simptomih in na podlagi zdravstvenega pregleda ali ponovne izpostavitve snovi. Dogodek razvrstimo v eno od kategorij: zelo verjetno, verjetno, vprašljivo, manj verjetno in v primeru, da izdelek ni povzročil škodljivih učinkov, ga razvrstimo med izključene primere. Če je ocena neželenega dogodka zelo verjetno ali verjetno, ti postanejo neželeni učinki. Za čim lažjo obdelavo podatkov in nedvoumnost odgovorovje priporočena uporaba standardiziranega vprašalnika. Po zbiranju informacij in oceni vzročnosti lahko proizvajalec spremeni formulacijo, doda opozorila, spremeni navodila za uporabo,

odpokliče izdelek... Pogostost in resnost težav lahko obravnavamo na število neželenih učinkov v časovnem obdobju ali številu na milijon prodanih izdelkov (21). V prilogi II diplomski nalogi se nahaja seznam informacij, ki jih prijava neželenih učinkov običajno vsebuje in diagram za pomoč pri oceni vzročnosti.

Leta 2012 je Evropska komisija objavila priporočila za poročanje o resnih neželenih učinkih. Izdelali so tri vrste obrazcev: obrazec A je namenjen distributerjem ali odgovornim osebam, ki pristojnim organom sporočajo o neželenih učinkih. Obrazec B izpolnijo pristojni organi in ga priložijo obrazcu A. Obrazec je namenjen sporočanju informacij ostalim državam članicam in odgovorni osebi, kadar o učinkih sporoča distributer. Obrazec C prav tako izpolnijo pristojni organi, namenjen pa je poročanju o neželenih učinkih ostalim državam članicam in odgovornim osebam, kadar podatke o neželenih učinkih sporoči zdravstveno osebje ali končni uporabnik. Poročanje o resnih neželenih učinkih je postalo zakonsko veljavna oblika sporočanja 11. julija 2013. Ti morajo biti razvrščeni po vzročnosti v enake skupine kot pri smernicah Colipe, le ocena »vprašljivo« se spremeni v »ne more se točno oceniti« (22).

Štiri večja podjetja, ki imajo ustaljeno prakso zbiranja podatkov o neželenih učinkih, so sporočila podatke o neželenih učinkih nastalih zaradi barv za lase v letih 2003-2006. V zadnjih dveh letih so se ravnali po smernicah Colipe. Neželene učinke so razdelili v več kategorij: a) vsi NU, b) razlikovanje med iritacijo kože in lasišča ter c) ACD, d) ACD, katerega posledica je edem obraza, e) resnejši primeri ACD, f) vpliv začasnih črnih tetovaž s kano na ACD in vpliv starosti na resne/neresne primere ADC. V tabeli V so predstavljeni številčni rezultati NU na milijon prodanih izdelkov za eno od podjetij.

Tabela V: Število neželenih učinkov na milijon prodanih izdelkov po kategorijah (23)

PODJETJE 1 (država)	a) vsi neželeni učinki	b) iritativni CD	c) ACD	d) ACD in edem	e) resni dogodki	f) predhodno začasne tetovaže
Združeno Kraljestvo	5,21	1,40	3,81	2,55	1,00	0,48
Francija	1,42	0,36	1,07	0,50	0,08	0,06
Nemčija	2,01	1,24	0,77	0,32	0,12	0,04

Kot merilo resnih poškodb je bil izbran pojav edema, ki je predstavljal manj kot 5% primerov ACD. Po prejemu informacij o neželenih dogodkih, so po zdravniškem pregledu ugotovili, da je le 31% primerov povezanih s pravilno rabo barv za lase. To kaže na to, da je ocena vzročnosti pomemben korak. Po pregledu informacij so ugotovili, dačasne tetovaže s črno kano štirikrat povečajo tveganje za pojav preobčutljivost, poveča pa se tudi tveganje za resnejše reakcije (23).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je oceniti varnost barvil za lase in na vzorcu njihovih sestavin ugotoviti, katera barvila se pogosto pojavljajo v izdelkih. Po literaturnem pregledu področja smo se odločili pregledati sestavine izdelkov za barvanje las, ki so v prodaji. Pregledali smo izdelke, ki so namenjeni širši potrošnji in niso namenjeni za uporabo v frizerskih salonih. Želeli smo ugotoviti, katere sestavine se uporabljajo najpogosteje ter število prekursorjev barvil v izdelkih. Glede na to, da v Evropski Uniji s 1. septembrom 2013 stopi v veljavo seznam dovoljenih barvil, smo prilogo III Uredbe o kozmetičnih izdelkih primerjali z rezultati in tako ugotovili, ali barvila na trgu ustrezajo temu seznamu. Nato smo izbrali tri sestavine, ki se v izdelkih pojavljajo najpogosteje, in glede na razpoložljive informacije izdelali toksikološke profile snovi. Enako smo storili tudi za PPD, saj je znano, da povzroči večje število neželenih učinkov.

3. MATERIALI IN METODE

V drogerijah smo razbrali sestavine 31 izdelkov, ki se uporabljajo za barvanje las. Izbor barv zajema širok spekter odtenkov. Tretjino barv predstavljajo svetli odtenki, tretjino temno rjavi in črni, zadnjo tretjino pa rdeče-vijolične barve. Pri enem izdelku so bile sestavine napačno navedene, saj so bila barvila navedena za sestavinami v predelku, kjer je pisalo, katere sestavine izdelek lahko vsebuje. Iz tega ni bilo možno določiti, katera barvila izdelek dejansko vsebuje, zato ta ni vključen v obdelavo podatkov. Poleg prekursorjev barvil smo razbrali še, katere alkalne snovi in oksidante vsebujejo izdelki.

1) Syoss Pro-nature – natural dark brown

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: rezorcinol, m-aminofenol, 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

2) Schwarzkopf Perfect Mousse3-0 Dark Brown

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: rezorcinol, m-aminofenol, 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

3) Schwarzkopf Palette Deluxe760 Dazzling Brown

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2-metilrezorcinol, rezorcinol, m-aminofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

4) Subrina Charm 85 Bordo

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat, p-aminofenol

Barvni modifikatorji: 2-metil-5-hidroksietilaminofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen, m-aminofenol, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

5) Subrina Pure 57 cimet

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat, p-aminofenol

Barvni modifikatorji: rezorcinol, m-aminofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

6) Subrina Supreme 45/10 žareče oranžna

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat

Barvni modifikatorji: 4-amino-2-hidroksitoluen

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

7) Avon Advanced Technique Hair Color 6.3 Light Golden Brown

Primarni intermediati: tolueen-2,5-diamin sulfat, p-fenilendiamin

Barvni modifikatorji: 2-metilrezorcinol, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

8) Swarzkopf Poly Colour 36 Mittelashblond

Primarni intermediati: tolueen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2-metilrezorcinol, 4-klororezorcinol, 6-metoksi-2-metilamino-3-amino piridin, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

9) Swarzkopf Poly Colour 46 Noir Schwarzbrown

Primarni intermediati: tolueen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: 4-klororezorcinol, m-aminofenol, 2,6-dihidroksi-3,4-dimetilpiridin, 4-amino-2-hidroksitoluen, 6-metoksi-2-amino-3-aminopiridin

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

10) Garnier Olia 4.3 Golden Dark Brown

Primarni intermediati: p-aminofenol, tolueen-2,5-diamin

Barvni modifikatorji: 2-amino-3-hidroksipiridin, 6-hidroksiindol, 2-metilrezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

11) Martis Respect R09 zelo svetlo blond

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diaminopirazol sulfat

Barvni modifikatorji: m-aminofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

12) Syoss Professional Performance 6-8 dark blond

Primarni intermediati: tolueen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2-metilrezorcinol, rezorcinol, 4-klororezorcinol, 2-amino-3-hidroksipiridin, m-aminofenol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

13) L'Oréal Casting Creme Gloss 210 modro črna

Primarni intermediati: tolueen-2,5-diamin, N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2,4-diaminofenoksietanol HCl, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

14) L'Oréal Sublime Mousse1000The Pure Very Light Blonde

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin, N,N-bis(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2,4-diaminofenoksietanol HCl, *m*-aminofenol, 2-metilrezorcinol, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid, etanolamin

15) Schwarzkopf Color Mask 750 Dark Gold Blonde

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: rezorcinol, 2-metilrezorcinol, 4-klororezorcinol, 2-amino-3-hidroksipiridin, *m*-aminofenol, 2-amino-6-kloro-4-nitrofenol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

16) Schwarzkopf Color Mask 368 Dark Chesnut

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat, 4-amino-*m*-krezol

Barvni modifikatorji: 2-metilrezorcinol, 4-amino-2-hidroksitoluen, 2-amino-3-hidroksipiridin, *m*-aminofenol, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

17) Schwarzkopf Palette Mousse Color 668 Mahagonij

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: rezorcinol, 2-metilrezorcinol, 2-amino-3-hidroksipiridin, *m*-aminofenol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev klorid

18) Garnier Nutrisse 100 Extra Light Natural Blonde

Primarni intermediati: *p*-aminofenol, *p*-fenilenediamin

Barvni modifikatorji: 2,4-diaminofenoksietanol HCl, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

19) L'Oréal PréférenceWildOmbrés

Primarni intermediati: /

Barvni modifikatorji: /

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid, etanolamin

20) Schwarzkopf Live Wild Lights Crazy Violet S77

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat

Barvni modifikatorji: 1-naftol, 6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin HCl, 4-amino-2-hidroksitoluen

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

21) Schwarzkopf Brilliance890Schwarz

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: m-aminofenol, 1,3-bis-(2,4-diaminofenoksi)propan HCl, 6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin HCl

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

22) Martis Respect R12 saten blond

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diaminopirazol sulfat

Barvni modifikatorji: m-aminofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

23) Subrina Saten 88 neon vijoličasta

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diaminopirazol sulfat

Barvni modifikatorji: 1-naftol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

24) Subrina Charm 78 vulkansko rdeča

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diaminopirazol sulfat, toluen-2,5-diamin sulfat, p-aminofenol

Barvni modifikatorji: 2-metil-5-hidroksietilaminofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen, m-aminofenol, 2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

25) L'Oréal Récltal Préférence P67 Booster Intensiv Rot

Primarni intermediati: 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat, p-aminofenol, toluen-2,5-diamin

Barvni modifikatorji: 4-amino-2-hidroksitoluen, 5-amino-6-kloro-o-krezol, 6-hidroksiindol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid, etanolamin

26) L'Oréal Preference Mousse Absolue 400 - Natural Dark Brunette

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin, hidroksipropil bis(N-hidroksietil-p-fenilendiamin) HCl, N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2,4-diaminofenoksietanol HCl, m-aminofenol, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

27) Schwarzkopf Perfect Mousse 586 Deep Mahogany

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat, 4-amino-m-krezol, 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat

Barvni modifikatorji: 2-amino-3-hidroksipiridin, 4-amino-2-hidroksitoluen, 2-metilrezorcinol, m-aminofenol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

28)Schwarzkopf Color Ultimate 700 Dunkel-Blond

Primarni intermediati: toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: rezorcinol, 2-metilrezorcinol, m-aminofenol, 2,7-naftalendiol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: etanolamin

29) Schwarzkopf Million Color7-77Glänzendes Kupferrot

Primarni intermediati: 4-amino-m-krezol, toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: 2-amino-6-kloro-4-nitrofenol, 4-amino-2-hidroksitoluen, 2-amino-3-hidroksipiridin, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev klorid

30)Schwarzkopf DiademS10Vanilleblond

Primarni intermediati:toluen-2,5-diamin sulfat

Barvni modifikatorji: 4-klororezorcinol, 2-amino-3-hidroksipiridin, 2-metilrezorcinol, rezorcinol

Oksidant: vodikov peroksid

Bazična snov: amonijev hidroksid

Izmed sestavin smo s pomočjo že uporabljene literature (9,10) in mnenj komisij (SCCP, SCCS) razbrali sestavine in jih razvrstili glede na namembnost v izdelku. Nato smougotovili pogostost pojavljanja določene sestavine glede na vse sestavine, nato pa še posebej delež barvnih modifikatorjev in primarnih intermediatov v izdelkih. Zanimalo nas je tudi, koliko prekurzorjev barvil posamezen izdelek vsebuje. Na koncu smo pregledali še, kateri so najbolj uporabljenebazične snovi in oksidanti. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Microsoft Office Excel 2007.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Trgovine ponujajo širok izbor barv za lase, izmed katerih smo pregledali sestavine 31. Kljub omejevanju uporabe in opozorilom na embalaži uporabniki sestavin ne poznajo, zato je potrebno zagotoviti varnost čim širšemu krogu uporabnikov. V izbranih barvah za lase smo pregledaliuporabljene prekurzorje barvil in jih razvrstili padajoče glede na pogostost pojavljanja v pregledanih izdelkih. V tabeliVI je navedeno število izdelkov, v katerih se sestavina pojavi, in delež izdelkov, ki to sestavino vsebujejo. V tabelah so predstavljena samo barvila, ki nastanejo s kemijsko reakcijo. S kemijsko reakcijo nastala barvila

uporabljamo v barvah za lase, saj ta nastanejo z oksidacijo prekurzorjev barvil v lasu. Nastala barvila imajo tako večjo molekulsko maso in omogočajo, da se barva ne izpira. V obdelavo podatkov niso zajeta ostala barvila, saj ne nastanejo z oksidacijo v laseh in služijo le obarvanju komponente izdelka.

4.1. VSI PREKURZORJI BARVIL

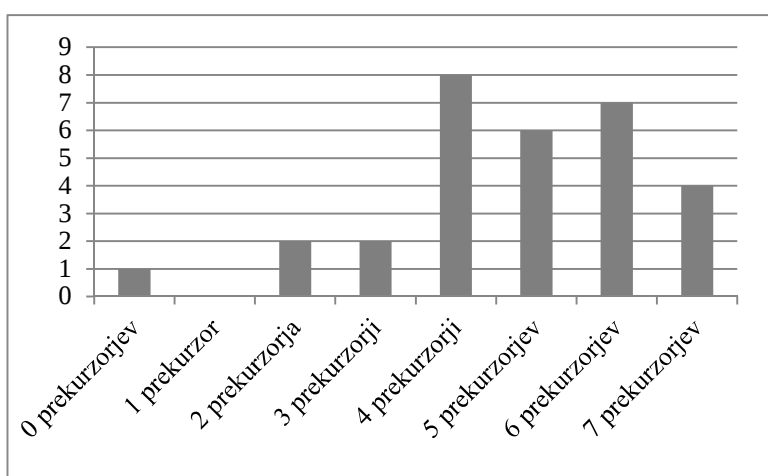
Tabela VI predstavlja vse aktivne sestavine, ki tvorijo oksidativna barvila, in število izdelkov, v katerih se pojavijo. V tabeli je poleg seštevka sestavin tudi delež glede na seštevke števila izdelkov. V sivo obarvanih celicah se nahajajo primarni intermediati, v ostalih celicah pa barvni modifikatorji. V 30 izdelkih se je pojavilo 25 različnih sestavin, od tega je 8 primarnih intermediatov in 17 barvnih modifikatorjev. Najpogosteje se v izdelkih pojavlja toluen-2,5-diamin, ki je v večini primerov v obliki sulfata. Najpogosteje uporabljena modifikatorja sta m-aminofenol in rezorcinol.

Tabela VI: Število in delež posamezne sestavine v pregledanih izdelkih

Sestavina (INCI*)	Število izdelkov		Delež izdelkov [%]	
toluen-2,5-diamin sulfat	18	23	60,00	76,67
toluen-2,5-diamin	5		16,67	
m-aminofenol	17		56,67	
Rezorcinol	17		56,67	
4-amino-2-hidroksitoluen	13		43,33	
2-metilrezorcinol	12		40,00	
2-amino-3-hidroksipiridin	8		26,67	
1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat	8		26,67	
p-aminofenol	6		20,00	
4-klororezorcinol	5		16,67	
2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat	4		13,33	
2,4-diaminofenoksietanol HCl	4		13,33	
6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin	4		13,33	
4-amino-m-krezol	3		10,00	
N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat	3		10,00	
2-amino-6-kloro-4-nitrofenol	2		6,67	
p-fenilendiamin	2		6,67	
6-hidroksiindol	2		6,67	
2-metil-5-hidroksietilaminofenol	2		6,67	
1-naftol	2		6,67	
5-amino-6-kloro-o-krezol	1		3,33	
1,3-bis-(2,4-diaminofenoksi)propan HCl	1		3,33	
2,6-dihidroksi-3,4-dimetilpiridin	1		3,33	
hidroksipropil bis(<i>N</i> -hidroksiethyl- <i>p</i> -fenilendiamin) HCl	1		3,33	
2,7-naftalendiol	1		3,33	
SKUPAJ	25 sestavin			

*INCI – mednarodna nomenklatura za kozmetične sestavine

Nadalje smo ugotavljali število prekurzorjev vposameznem izdelku. Eden od izdelkov ni vseboval nobenega prekuzorja, saj je bil namenjen le posvetlitvi las. To ne velja za vse izdelke, ki so namenjeni svetenju las, saj se barve med seboj razlikujejo po odtenkih. Z oksidanti lase samo razbarvamo in posvetlimo, medtem ko z dodatkom oksidativnih barvilpridobimo različne barve in odtenke. Vidimo, da 83,33% izdelkov vsebuje vsaj štiri prekurzorje ali več. Ker molekulo barvila sestavljata primarni intermediat in barvni modifikator, sta za formacijo barvila potrebna vsaj dva prekurzorja. Iz grafa 1 je razvidno, dasamo enega prekurzorja ne vsebuje nobeden od izbranih izdelkov. En izdelek je v povprečju vseboval 5 prekurzorjev barvil.



Graf 1: Število izdelkov, ki vsebujejo določeno število prekurzorjev barvil

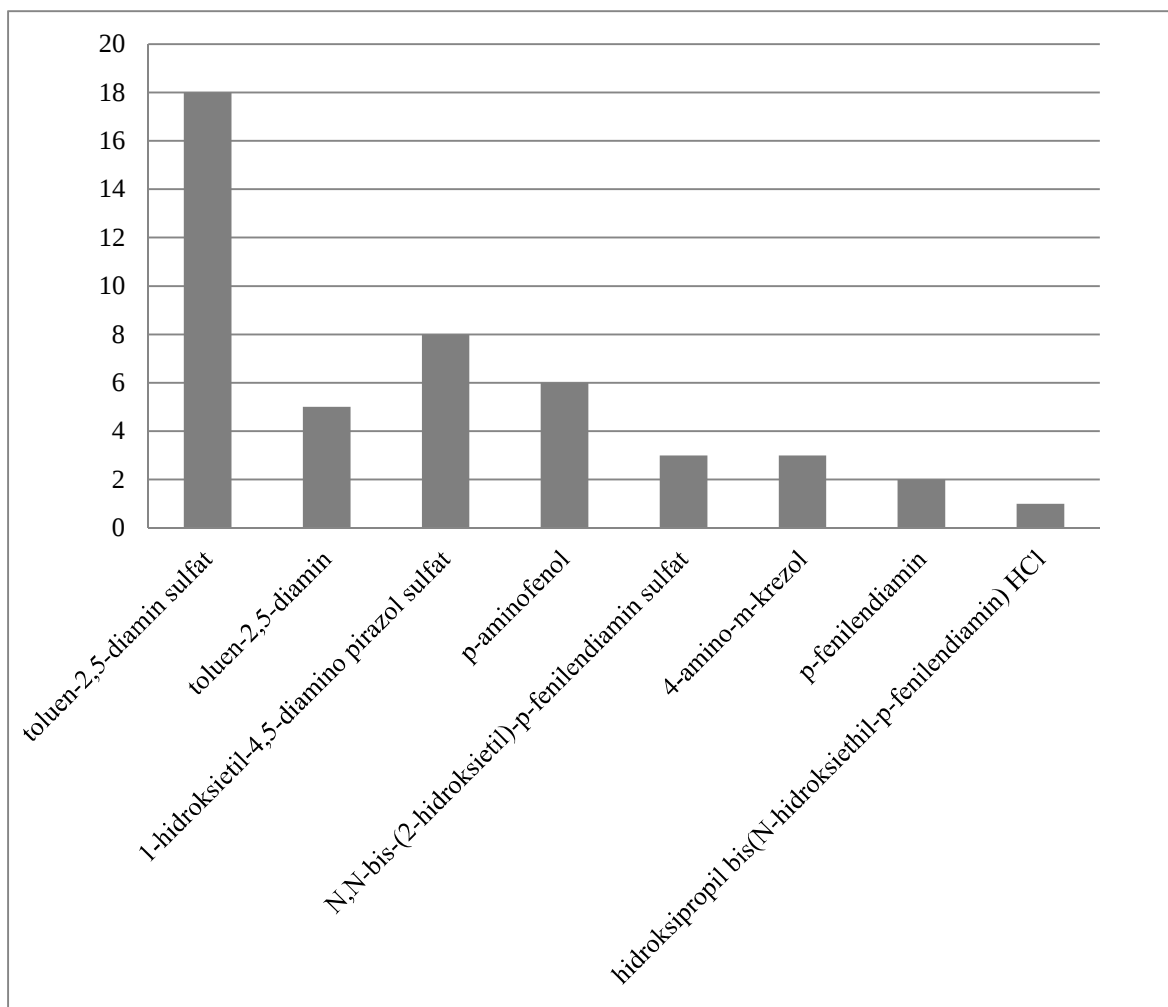
4.1.1. PRIMARNI INTERMEDIATI

Po pregledu vseh sestavin smo posebej ovrednotili še primarne intermediete in barvne modifikatorje. TDA, ki je najpogosteje uporabljen primarni intermediat in prekurzor barvila, spada v kategorijo ekstremnih alergenov. Vse sestavine, razen 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfata in p-aminofenola, so na pozitivnem seznamu barvil, ki so že ocenjene s strani komisij in jih v omejenih koncentracijah lahko uporabljamo v barvah za lase. Seznam z dovoljenimi barvili se nahaja v prilogi I diplomske naloge (16). Ti dve sestavini se ne nahajata na seznamu priloge II Uredbe o kozmetičnih izdelkih, v kateri se nahajajo snovi, ki si za uporabo v kozmetičnih izdelkih prepovedane (10). Na podlagi tega sklepamo, da barvili spadata v skupino 45 snovi, ki še morajo biti ocenjene za uporabo v barvah za lase. 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat ima močno sposobnost povzročanja preobčutljivosti, p-aminofenol pa izkazuje možnost povzročanja preobčutljivosti. Izmed ostalih so vsi primarni intermedieti močni povzročitelji

preobčutljivosti, PPD pa ekstremen. Med ekstremne alergene se snov uvrsti, ko je EC3 vrednost nižja od 0,2%. Glede na seštevek primarnih intermediatov smo v pregledanih izdelkih določili prisotnost 54,35% ekstremnih alergenov, 45,65% pa močnih alergenov (16).

Tabela VII:Število in delež primarnih intermediatov v pregledanih izdelkih

Sestavina (INCI)	Število izdelkov, v katerih se pojavlja		Deležizdelkov [%]	
toluen-2,5-diamin sulfat	18	23	60,00	77,67
toluen-2,5-diamin	5		16,67	
1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat	8		26,67	
p-aminofenol	6		20,00	
N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat	3		10,00	
4-amino-m-krezol	3		10,00	
p-fenilendiamin	2		6,67	
hidroksipropil bis(N-hidroksiethyl-p-fenilendiamin) hidroklorid	1		3,33	



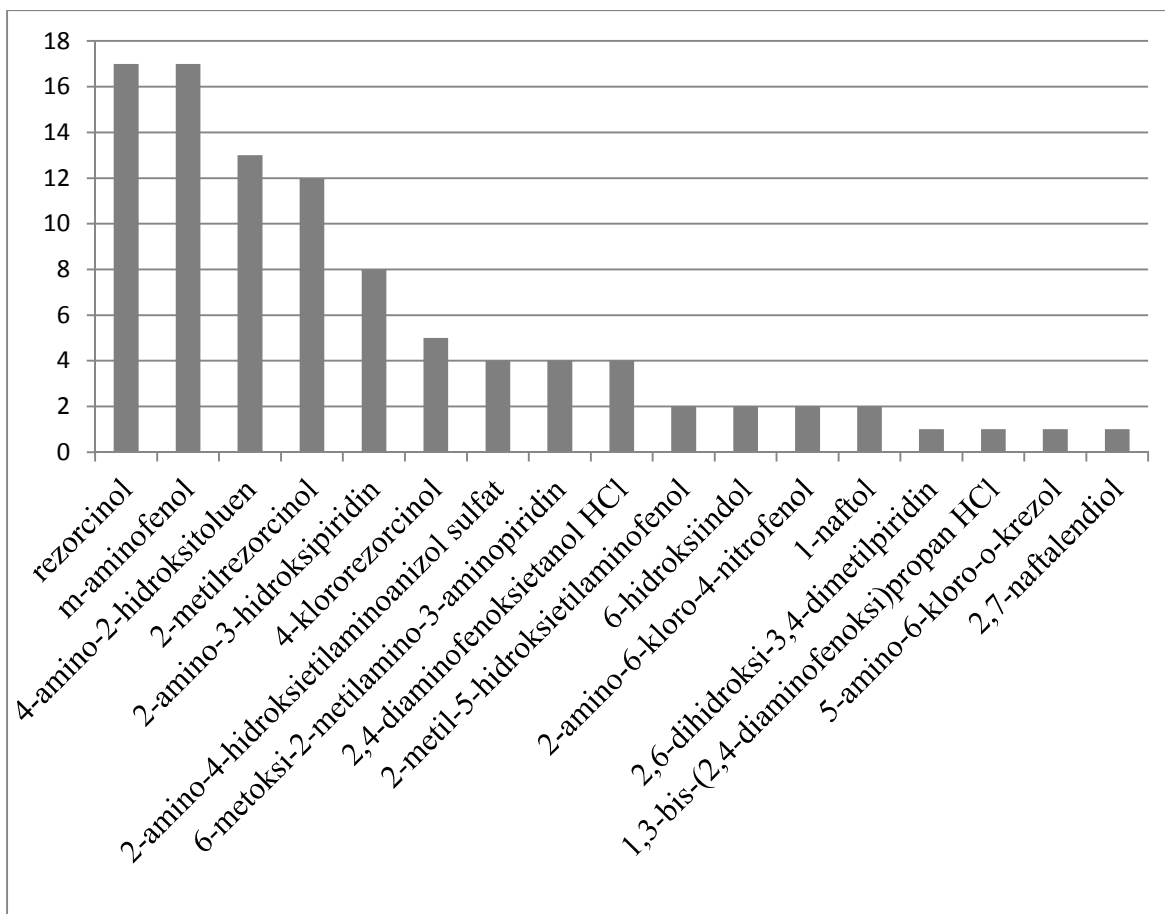
Graf 2: Primarni intermediati in število izdelkov, v katerih se pojavljajo

4.1.2. BARVNI MODIFIKATORJI

Vsi barvni modifikatorji, ki so jih izdelki vsebovali, so bili s strani SCCS in SCCP že pregledani in so del priloge III Uredbe o kozmetičnih izdelkih. Za 23,53% modifikatorjev ni podatka o sposobnosti povzročanja preobčutljivosti ali pa so testiranja nezadostno izvedena, zato o teh sestavinah ni podatkov. Tri najpogostejše sestavine, ki se pojavljajo v več kot polovici izdelkov, so močni alergeni. Izmed prisotnih barvnih modifikatorjev je 11,76% razvrščenih med ekstremne in 35,71% med močne alergene (16).

Tabela VIII: Barvni modifikatorji in delež izdelkov, v katerih se pojavljajo

Sestavina (INCI)	Število izdelkov, v katerih se pojavlja	Delež izdelkov [%]
m-aminofenol	17	56,67
rezorcinol	17	56,67
4-amino-2-hidroksitoluen	13	43,33
2-metilrezorcinol	12	40,00
2-amino-3-hidroksipiridin	8	26,67
4-klororezorcinol	5	16,67
2,4-diaminofenoksietanol HCl	4	13,33
2-amino-4-hidroksietilaminoanizol sulfat	4	13,33
6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin	4	13,33
1-naftol	2	6,67
2-amino-6-kloro-4-nitrofenol	2	6,67
2-metil-5-hidroksietilaminofenol	2	6,67
6-hidroksiindol	2	6,67
1,3-bis-(2,4-diaminofenoksi)propan HCl	1	3,33
2,6-dihidroksi-3,4-dimetilpiridin	1	3,33
2,7-naftalendiol	1	3,33
5-amino-6-kloro-o-krezol	1	3,33



Graf 3: Barvni modifikatorji in število izdelkov, v katerih se pojavljajo

4.2. ALKALNE SNOVI IN OKSIDANTI

Po prekursorjih barvil smo zbrali še podatke o uporabljenih oksidantih in alkalnih snoveh. Kot oksidant se v vseh primerih uporablja vodikov peroksid. Alkalna snov, ki se najpogosteje pojavi (v 66,67% izdelkov), je amonijev hidroksid. Druga najpogostejša snov, ki se pojavi v 36,76% izdelkov, je etanolamin. Trije izdelki vsebuje kombinacijo amonijevega hidroksida in etanolamina. Amonijev klorid se je pojavil v dveh izdelkih, v katerih je prva komponenta izdelka, ki vsebuje prekursorje barvil, uprašena. To so običajno izdelki, ki so po mešanju z razvijalcem v obliki pene.

Tabela IX: Uporabljene bazične snovi in oksidanti

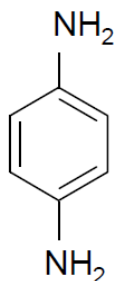
BAZIČNA SNOV	ŠT. IZDELKOV	DELEŽ IZDELKOV [%]
amonijev hidroksid	20	66,67
etanolamin	11	36,67
amonijev klorid	2	6,67
OKSIDANT		
Vodikov peroksid	30	100,00

5. TOKSIKOLOŠKI PROFILI SNOVI

V nadaljevanju predstavljamo tri najpogostejše uporabljena barvila, najbolj uporabljen oksidant in bazično snov. Za večino neželenih učinkov, katerih posledica je ACD, je kriv PPD, zato smo vključili tudi tega. Pregledali smo razpoložljive podatke o iritaciji, alergenosti, karcinogenosti in genotoksičnosti, dermalni absorpciji, akutni toksičnosti, toksičnosti po ponovljivi aplikaciji, toksikokinetiki, fizikalno-kemijskih lastnostih in predstavili tudi uporabo vsake snovi.

5.1. p-FENILENDIAMIN

PPD je primarni intermediat, ki je najbolj znan zaradi alergenega delovanja. Snov se nahaja v prilogi III pod zaporedno številko 8a. Koncentracija uporabe je omejenana največ 2% kot prosta baza, ko je prva komponenta zmešana z razvijalcem. V izdelkih se lahko pojavi kot prosta baza, v obliki sulfata ali dihidroklorida. Če izdelek vsebuje PPD, je potrebno na embalaži dodati opozorila, da izdelek lahko povzroči alergijo, vsebuje fenilendiamine in da gane smemo uporabljati za barvanje trepalnic ali obrvi. Dodana so še opozorila, da izdelka ne smemo uporabljati v primeru razdraženega lasišča, izpuščajev na obrazu ali predhodnih reakcij na barve ali črn tatu s kano. Izdelki s PPD niso namenjeni mlajšim od 16 let (24).



Slika 6: Strukturna formula PPD

Tabela X: Fizikalno-kemijske lastnosti PPD

Molekulska masa	108,14 g/mol
Parni tlak	< 1 mm Hg (21 °C)
Izgled	Bel do svetlo vijoličen prašek
Temperatura tališča	139-141 °C
Temperatura vrelišča	267 °C
Porazdelitveni koeficient (log Pow)	-0,31
Absorpcijski maksimum	281,9 nm

- Iritacija in korozivnost

Nanos 2,5% raztopine na kožo zajca ni povzročil iritacije ali korozivnosti, na očesu pa se je pri eni od treh živali pojavila rahla iritacija očesne veznice. Izračunan primarni iritacijski indeks je bil 0,3/8, zato PPD ne spada med iritante. Bolj kot zaradi posledic iritacije je PPD znan kot alergen (25).

- Alergenost

Alergenost PPD dokazujejo tako laboratorijski testi kot epidemiološke študije. V eni izmed študij so keratinocite izpostavili necitotoksičnim koncentracijam PPD in opazili, da ta

povzroči lipidno peroksidacijo. Zaradi velikega števila radikalov se sproži imunski odziv. Več avtorjev navaja ob prisotnosti PPD aktivacijo številnih encimov in tudi pri kombinaciji PPD in vodikovega peroksida (19). Za oceno varnosti je pomembno vedeti, kako alergena je snov. S testom LLNA so pokazali, da PPD spada med ekstremne alergene, saj je izračunana EC3 vrednost znašala 0,06% (25). Izvedena je bila tudi študija, v kateri so opazovali mejno vrednost senzitivizacije pri 15 ljudeh z alergijo na PPD. Vrednost ED10, pri kateri je opažena preobčutljivost pri 10% osebkov, je znašala 38 ppm (19).

Laboratorijske rezultate potrjujejo tudi podatki številnih epidemioloških študij. PPD je vključen v Evropsko osnovno skupino alergenov namenjenih krpičnem testiranju v vseh državah, razen v Nemčiji, zato je podatkov o tej snovi veliko. V Nemčiji PPD za testiranje ni dovoljen, ker v testih uporabljamo 1% raztopino, ki lahko povzroči senzitivizacijo (25).

V Nemčiji so po pregledu podatkov 36000 bolnikov z dermatitisom ugotovili, da je PPD peti najpogostejši alergen s pojavnostjo 4,8%. To kaže na to, da je PPD pri bolnikih z vnetjem kože pogostejši, saj je prevalenca v populaciji 0,2–0,5%. Delež se spreminja z geografskim področjem. Delež alergij na PPD med bolniki z dermatitisom v Aziji je 4,4%, 4,1% v Evropi in 6,0% v Severni Ameriki. Razlike se pojavljajo tudi med območji v Evropi. Višja pojavnost v južnih in srednjih predelih Evrope je razumljiva zaradi večje priljubljenosti temnejših barv (19). Čeprav se je uporaba barv za lase v zadnjih desetletjih povečala, je pojavnost alergije na PPD stabilna. To pripisujejo boljši kvaliteti vhodnih materialov, jasnejšim navodilom za uporabo, uporabi zaščitnih rokavic in opozorilom na embalaži. Kot že omenjeno, obstaja sum, da je za alergnost PPD kriv trimer Bandrowskijeva baza. Na to je pokazala študija, kjer so limfocite osebkov, alergičnih na PPD, izpostavili snovi in s samim PPD celice niso reagirale. Te teorije ne morejo potrditi, saj ob izpostavitvi ljudi, ki so alergični na PPD, Bandrowskijevi bazi nanjo reagirajo le redki in še ti običajno šibko. Zaradi tega predvidevajo, da je za alergnost kriv do zdaj še neznan produkt metaboličnega procesa v koži (25).

- Dermalna absorpcija

Za izračun MoS uporabljamo rezultate *in vivo* študije, ki je bila izvedena na 5 ljudeh in 3 opicah makaki. Na prostovoljce in živali so nanесли izdelek, v katerem je bilo 2,7% radioaktivno označenega PPD. Iz teh podatkov so avtorji izračunali maso, ki se absorbira, če z izdelkom pride v stik 700 cm² lasišča. Absorbirano količino so določili tako, da so v vzorcih urina detektirali količino izločenih metabolitov. Podatke so zbirali 7 dni oz. dokler je bilo sestavino možno zaznati. Rezultati absorpcije pri opicah in ljudeh so zelo podobni.

Celoten izločen delež znaša za ljudi $0,190 \pm 0,06\%$ in za opice $0,182 \pm 0,06\%$. Iz teh podatkov so avtorji izračunali absorbirano maso. Sistemsko je bilo tako razpoložljivih $3129 \mu\text{g PPD}$, kar na površinsko enoto kože znaša $4,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- Akutna toksičnost

V testih akutne toksičnosti so bile podgane, ki so prejele 100 mg/kg PPD , mrtve v 90 minutah po odmerjanju. Ena od dveh živali, ki je dobila odmerek 75 mg/kg je umrla v času treh ur. Živali, ki so prejele 50 mg/kg , so kazale klinične znake, kot so solzenje, piloerekcija, tresavica, nabrekanje veznice in umirjeno obnašanje. Pri 25 mg/kg so bili vidni oranžni madeži na podlagi, kjer so se podgane gibale- najbrž zaradi obarvanega urina. V tabeli XI so predstavljene vrednosti LD50 za dermalno in peroralno aplikacijo.

Tabela XI: Vrednosti LD50 za PPD

LD ₅₀ [mg/kg]	Žival	LD50 (mg/kg TT)
Peroralna aplikacija	Podgana	80
	Miš	290
	Zajec	250
Dermalna aplikacija	Podgana	170
	Zajec	200
	Pes	100

Znani so tudi primeri človeških zastrupitev, ki so pogosti predvsem v Vzhodni Afriki in Indiji. Količine zaužitega PPD, ki je tam eno glavnih barvil za lase, niso znane. Zastrupitev povzroči odpoved ledvic, angionevrotični edem in rabdomiolizo.

- Toksičnost pri ponovljivih odmerkih

V 90-dnevni študiji so podgane prejele 2, 4, 8 and 16 mg/kg/dan napram kontrolni skupini, ki je prejela deionizirano vodo. Po 90 dneh so živali ponovno stehali in usmrtili ter pregledali in stehali organe in tkiva. PPD ni vplival na težo, hranjenje, oftamološke parametre, prav tako ni povzročil smrtnih primerov. Pri živalih, ki so prejele 8 in 16 mg/kg , se je povečala masa jeter, pri istih odmerkih pa je bila pri samicah povečana tudi masa in velikost ledvic. Razen tega niso opazili histopatoloških sprememb, razen minimalne miodegeneracije pri 1 samcu in 1 samici pri najvišjem odmerku. Določili so, da je NOEL 4 mg/kg/dan in NOAEL 8 mg/kg/dan zaradi možne miodegenerativnosti. Ta parameter ne more biti izključen, ker je znano, da je to značilnost PPD in njegovih derivatov. Veliko študij namreč poroča o miodegenerativnih spremembah skeletnih mišic.

- Genotoksičnost

In vitro testiranja genotoksičnosti PPD so prinesla različne rezultate. Podatki testov povratne mutacije bakterij s *Salmonello* so si nasprotujoči. Omeniti je potrebno, da ta test za aromatske amine ni najbolj primeren, saj so ugotovili, da je na primeru barv izmed 33

pozitivnih vzorcev, bilo genotoksičnih samo 17. Nekateri avtorji navajajo pozitivne rezultate samo pri testu z dodatkom mešanice S9, medtem ko drugi z in brez mešanice. Pri tistih testih, kjer je bil *in vitro* rezultat pozitiven, *in vivo* pa negativen, prevlada slednji rezultat. Na podlagi rezultatov iz tabele XII sklepamo, da PPD ni genotoksičen.

Tabela XII: Izbrani testi genotoksičnosti za PPD

In vitro testi genotoksičnosti			
Test	Snov	Rezultat	Reference in smernica
Test povratne mutacije bakterij	PPD	+	OECD 471
	PPD + S9	+	Covance Laboratories, Harrogate, UK (2005)
<i>hprt</i> lokus	PPD	-	OECD 476
	PPD + S9	-	Covance Laboratories, Harrogate, UK (2005)
Mikronukleusnitet	PPD	+	Osnutek OECD 487
	PPD + S9	+	Covance Laboratories, Harrogate, UK (2005)
Test povratne mutacije bakterij	PPD + rezorcinol + H ₂ O ₂	+	Crebelli et al (1981)
	PPD + rezorcinol + H ₂ O ₂ + S9	-	
Test povratne mutacije bakterij	PPD + H ₂ O ₂	+	Bracher et al (1990)
	PPD + H ₂ O ₂ + S9	-	
Test povratne mutacije bakterij	PPD + 1-naftol	-	OECD 471 Sokolowski, 2009
Mikronukleusnitet	PPD + 1-naftol	-	Osnutek OECD 487
	PPD + 1-naftol + S9	-	Thyssen, White (2009)
In vivo testi genotoksičnosti			
Mikronukleusnitet	PPD	-	OECD 474 RCC-CCR, Rossdorf, Germany (2005)
Nenačrtna sinteza DNA	PPD	-	OECD 486 Thyssen, White (2009)
Nenačrtna sinteza DNA	PPD + 1-naftol	-	OECD 486 RCC-CCR, Rossdorf, Germany (2005)

PPD se metabolizira v dva glavna metabolita: N-monoacetil-p-fenilendiamin in N,N-diacetil-p-fenilendiamin. Rezultati testa povratnih mutacij v več sevih *Salmonelle* in mikronukleusnega testa nakazujejo, da metabolita nista genotoksična.

- Karcinogenost

Raztopino PPD so dvakrat tedensko topikalno nanašali na kožo miši in zajcev. Študijo so izvajali s 5% in 10% raztopino PPD v acetonu. 0,2 ml raztopine so nanесли na okrogel obrit predel kože premerom 1 cm. Rezultate so primerjali z negativno kontrolno skupino in pozitivno kontrolno skupino, pri kateri so v enakih časovnih obdobjih nanесли 0,1% raztopino 7,12-dimetilbenz(a)antracena. Mišim so raztopino nanašali do smrti, zajcem pa v obdobju 85 tednov. PPD ni vplival na življenjsko dobo in težo miši, prav tako pa v

primerjavi z obema kontrolnima skupinama pojavnost tumorjev ni bila višja. Na koži miši ni bilo opaziti epidermalne hiperplazije, razjed ali dermatitisa. Pri zajcih prav tako ni bilo sprememb, preučili pa so tudi kri in urin, kjer ni prišlo do sprememb. Rezultate te študije podpirajo tudi rezultati ostalih *in vivo* študij, v katerih PPD ni izkazoval karcinogenosti.

- Toksikokinetika

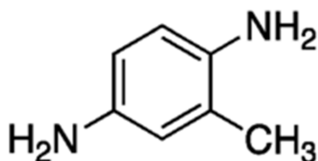
Glavna metabolita PPD sta N-monoacetil-p-fenilendiamin in N,N-diacetil-p-fenilendiamin. Po izpostavitvi rekonstruiranega človeškega epidermisa radioaktivno označenemu PPD za 24 ur so ugotovili, da 60,8% radioaktivnosti pripada acetiliranim metabolitom PPD, 20,4% PPD je ostalo nespremenjenega, 2,4% pa se je kovalentno vezalo na proteine.

Izvedene so bile študije na prostovoljcih, ki so dale informacije o izpostavitvi radioaktivno označenemu PPD. Frizerji so prostovoljcem nanесли barvo, ki je vsebovala 2% PPD, 1% rezorcinola in 1,0% m-aminofenola s časom izpostavitve 30 min. Naslednjih 48 ur so zbirali vzorce urina in krvi. V urinu se je nahajalo $0,72 \pm 0,25\%$ nanešenega odmerka, najvišja koncentracija PPD v plazmi je bila $132,6 \pm 52$ ng/mL. Več kot 90% metabolitov v urinu je pripadalo acetiliranim metabolitom (25).

5.2. TOLUEN-2,5-DIAMIN

TDA je primarni intermediat, ki prav tako kot PPD spada v skupino aromatskih aminov. V izdelkih se lahko pojavi kot prosta baza ali v obliki sulfata. V pregledanih izdelkih se je pojavil najpogosteje in sicer kar v 76,66% izdelkov. Na trgu je mogoče dobiti pripravke za krpično testiranje, saj je tudi TDA eden pogostejših alergenov. TDA pogosto navzkrižno reagira s PPD, a so te reakcije v primerjavi s PPD običajno šibkejšje. Snov se nahaja v prilogi III pod zaporedno številko 9, v izdelkih jolahko uporabljamo v koncentracijah do 3,6% (24).

Tabela XIII: Fizikalno-kemijske lastnosti TDA



Slika 7: Strukturna formula TDA

Molekulska masa	122,17 g/mol
Parni tlak	$3,40 \cdot 10^{-3}$ mm Hg (25 °C)
Izgled	Svetlo rumen do svetlo roza prašek
Temperatura tališča	64 °C
Temperatura vrelišča	273,5 °C
Porazdelitveni koeficient	-0,32

- Iritacija in korozivnost

V *in vivo* študiji na zajcih 50,6% raztopina TDA ni povzročila edema, eritema pa zaradi temne obarvanosti kože ni bilo možno oceniti. Isto raztopino so aplicirali v oko zajca brez izpiranja. TDA je povzročil edem in rdečico veznice, rahlo iritacijo šarenice in zmerno do

rahlo motnost roženice. Vsi pojavi so bili po sedmih dneh reverzibilni. Apliciran TDA je deloval iritantno na oko, kar je najbrž posledica tega, da se snov ni izprala. Prav tako pa je bil pH visok (9,71), kar je pripomoglo k iritaciji. V drugi študiji so v oko treh zajcev aplicirali 2,5% raztopino TDA. Po 10 sekundah so oko izprali in 7 dni opazovali in ocenili glede na Draizeovo ocenjevalno lestvico. Prvi in tretji dan so v dveh zajcih opazili blago iritacijo očesne veznice.

- Alergenost

Z LLNA so preverili sposobnost snovi, da povzroči preobčutljivost. Testirali so 0,5%, 1,5% in 2,8% raztopino TDA. S pomočjo pridobljenih SI so preračunali vrednost EC3, ki je znašala 0,31%. Najnižja izbrana koncentracija je bila previsoka, zato ta rezultat samo nakazuje na to, da je TDA močan alergen.

Rezultati krpičnih testiranj kažejo na visoko stopnjo alergij na TDA in soli. Skupaj s PPD je TDA med najpogostejšimi alergeni, ki povzročajo alergijo mnogo pogosteje kot ostale sestavine barv. Rezultati epidemioloških študij so pokazali, da je najvišje število alergikov med frizerji, sledijo bolniki z dermatitisom, povezanim s kozmetičnimi izdelki, in nato še naključno izbrani bolniki z dermatitisom. Primerjava rezultatov študij v tabeli XIV kaže na to, da je alergij na prosto bazo več kot na sol. V tabeli so prikazani rezultati krpičnih testov frizerjev, ki so pri delu pogosto izpostavljeni TDA. Vidimo, da je velik delež frizerjev alergičnih na TDA. Za večjo varnost sestavine je v prilogi III ob vnosu za poklicno uporabo dodano opozorilo, naj se uporabljajo rokavice.

Tabela XIV: Rezultati krpičnih testiranj frizerjev s TDA

Testna substanca	Št. pregledanih bolnikov	Pozitivni krpični testi (%)	država
TDA	597	21,4	Nemčija Uter et al (1995)
TDA (sulfat)	781	7,6	9 evropskih centrov Frosch et al (1993)
TDA (sulfat)	302	13,2	Italija Guerra (1992)
TDA TDA (sulfat)	178	18,0 8,4	Nemčija Frosch (1990)
TDA	884	24,8	Nemčija Holm (1994)

- Dermalna absorpcija

Perkutano absorpcijo barvila so izmerili s pomočjo pretočnih Franzovih difuzijskih celic. Uporabili so človeško kožo z debelino približno 400 µm. Izvedli so več testov s koncentracijami TDA 0,25%, 0,8%, 2,4% in 7,2% TDA z in brez dodatka 6% vodikovega

peroksida. Po 30-min izpostavitvi kože snovi je bila membrana sprana, tako da so meritve ponazarjale uporabo kozmetičnega izdelka. Tako pod oksidativnimi kot neoksidativnimi pogoji se je količina absorbirane snovi z višanjem odmerka povečevala. Pod oksidativnimi pogoji je bila v primerjavi z neoksidativnimi pogoji količina TDA v roženi plasti višja, količina absorbirane snovi pa nižja pri vseh koncentracijah, razen pri najnižji. Za izračun MoS uporabljamo seštevek rezultata absorpcije 2,4% raztopine pri oksidativnih pogojih in standardne deviacije. Po preračunu na koncentracijo, ki se v maksimalni količini lahko pojavi v izdelku, torej 3,6%, absorpcija tako znaša 40,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- Akutna toksičnost

Podgane so peroralno izpostavili TDA (odmerkom 0, 64, 100, 160 in 250 mg/kg). Kmalu po aplikaciji so pri živalih opazili zaspanost, otopelost, piloerekcijo, neusklajenost gibov in povečano izločanje sline. Pri 100 mg/kg je bil ritem dihanja hitrejši, nad 100 mg/kg pa se je znižal (26). LD50 po peroralnem vnosu za podgane znaša 98 mg/kg (27).

- Toksičnost pri ponovljivih odmerkih

V 90-dnevni študiji določen NOAEL je znašal 10 mg/kg/dan. Določen je bil na podlagi višanja nivoja AST, ki je povezan z miotoksičnostjo in degradacijo miocitov, ki so jo opazili pri višjih koncentracijah. Opazili so tudi spremembe mišic jezika, trebušne prepone in stegen. Ti znaki pri skupini po 28-dnevem okrevanju dneh niso bili več prisotni.

- Genotoksičnost

TDA je dobro raziskan za vse glavne tipe mutagenosti – gensko mutacijo, strukturne kromosomske mutacije in anevplodijo. Rezultati pomembnejših testov, ki so bili izvedeni po smernicah OECD, so prikazani v tabeli XV. Pri testih, ki so preučevali enake parametre in bili pozitivni *in vitro*, teh rezultatov *in vivo* testi niso mogli potrditi, saj so bili vsi negativni. Te rezultate potrjujejo tudi številne ostale študije. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da TDA *in vivo* ni genotoksičen.

Tabela XV: Izbrani testi genotoksičnosti za TDA

<i>In vitro</i>			
<i>Test</i>	<i>Snov</i>	<i>Rez.</i>	<i>Referenca</i>
Test povratne mutacije bakterij	TDA sulfat	+	OECD 471
	TDA sulfat + S9	+	Sokolowski (2003)
<i>tk</i> lokus	TDA sulfat	-	OECD 476
	TDA sulfat + S9	-	Wollny (1995)
Test kromosomskih aberacij	TDA sulfat	+	OECD 473
	TDA sulfat + S9	+	Schulz (2002)
Test nenačrtne sinteze DNA	TDA	+	Kornbrust et al (1984)
<i>In vivo</i>			
Mikronukleusnitet	TDA sulfat	-	OECD 474

			Bornatowicz (2002)
Mikronukleusntest	TDA sulfat	-	OECD 474 Völkner (1995)
Test nenačrtne sinteze DNA	TDA sulfat	-	OECD 486 Cinelli (2004)

- Karcinogenost

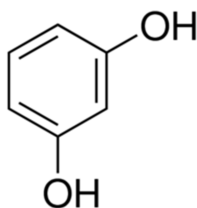
Rezultati dvoletne študije dermalnega nanosa izdeka in 78-tedenske študije s peroralnim vnosom kažejo na to, da TDA ni karcinogen. Kljub temu to ni zaključna ocena, saj tudi dodatek znanih karcinogenov, v teh primerih sta to toluen-2,4-diamin in 2,4-diaminoanizol, ni povzročil večjega števila tumorjev.

- Toksikokinetika

V *in vitro* študijah na hepatocitih treh moških osebkov, miši in podgan so ugotovili, da je glavni način metabolizma TDA N-acetilacija. Metabolizem je v človeških celicah potekal počasneje kot v živalskih, popolnoma pa se je TDA metaboliziral po štirih urah. V študiji so zaznali samo monoacetiliran produkt. Oksidativnih produktov ni bilo možno zaznati (26).

5.3. REZORCINOL

Rezorcinol se v kozmetični industriji uporablja v izdelkih za lase in sicer v šamponih in barvah za lase. Rezorcinol je barvni modifikator, ki se v izdelkih pojavlja v koncentraciji do 2,5 %, po mešanju z drugo komponento koncentracija ne sme preseči 1,25 %. Barve za lase, ki vsebujejo rezorcinol, morajo imeti na embalaži štiri opozorila: da izdelek vsebuje rezorcinol, da je potrebno po uporabi izdelka tega dobro sprati, da ga ne smemo uporabljati za barvanje trepalnic in obrvi ter da je ob stiku z očmi potrebno te dobro sprati (24).



Slika 8: Strukturna formula rezorcinola

Tabela XVI: Fizikalno-kemijske lastnosti rezorcinola

Molekulska masa	110,11 g/mol
Parni tlak	0,03 Pa (25 °C)
Izgled	Svetlo roza luske
Temperatura tališča	108 – 111 °C
Temperatura vrelišča	276 - 280 °C
Porazdelitveni koeficient	0,04 (24°C)
Absorpcijski maksimum	275,8 – 281,6 nm

- Iritacija in korozivnost

2,5% raztopina rezorcinola po 4 urni aplikaciji v pol-okluzivnih pogojih na koži zajcev ni povzročila iritacije. V naslednjih štirih opazovalnih dneh na koži živali niso opazili sprememb. Poleg iritacije kože so pomembni tudi rezultati za iritacijo sluznic, saj barve uporabljamo v bližini le-teh. V veznično vrečicozajčjegaočesa so aplicirali 2,5% raztopino

rezorcinola. Ob opazovanju rezultatov po 1, 24, 48 in 72 urah so pri dveh od treh živali na prvi ali drugi dan opazili rdečino veznice. Rezorcinol je tako povzročil blago iritacijo veznice v zajčjem očesu.

- Alergenost

Alergeni potencial so predvideli z LLNA testom. Koncentracije, preko katerih so preračunali SI vrednosti, so znašale 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % in 25 % raztopina rezorcinola v dimetilformamidu. Vrednost EC3 znaša 1,4%, kar uvršča rezorcinol med močne alergene.

- Dermalna absorpcija

Dermalno absorpcijo so določili s pomočjo Franzovih difuzijskih celic z uporabo človeške kože. Absorpcijo so ocenili pod oksidativnimi pogoji. Na membrano so nanесли formulacijo, v kateri je bilo 2,5 % rezorcinola in 2,45 % PPD. V neoksidativnih pogojih je bila prva komponenta namesto z razvijalcem zmešana z vodo, tako da je bila končna koncentracija rezorcinola v obeh primerih 1,25 %. Za oceno absorpcije je bila pod oksidativnimi pogoji masna bilanca primerna v 7/10 celicah in v vseh pod neoksidativnimi pogoji. Ker je število ustreznih celic manjše od pričakovanega, za izračun MoS uporabimo seštevek dermalne absorpcije in dveh standardnih deviacij. Perkutana absorpcija v neoksidativnih pogojih je znašala $2,95 \pm 2,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, pod oksidativnimi pogoji pa je ta $1,04 \pm 0,51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Za preračun MoS tako uporabljamo vrednost $2,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- Akutna toksičnost

Pri podganah so ugotavljali vpliv enkratnega vnosa 200, 500 in 2000 mg/kg rezorcinola. Preverili so, katera količina bi bila najboljša za študijo akutne toksičnosti. Žival, ki je prejela odmerek 2000 mg/kg, je umrla v 15 min po vnosu, po 500 mg/kg pa je žival umrla po 20 minutah. Piloerekcija in oteženo dihanje sta spremljala vnos pri 200 mg/kg, ki je bil izbran odmerek študije. Po enkratnem vnosu snovi štirim živalim so prvi dan opazili hipoaktivnost, oteženo dihanje in tresavico. Drugi dan teh znakov ni bilo več možno opaziti, zato se za maksimalno vrednost, ki v podganah ne povzroči smrti, smatra 200 mg/kg (28). Znani so tudi podatki o LD50, ki znaša po peroralnem vnosu 370 mg/kg za podgane, 750 mg/kg za zajce in 370 mg/kg za morske prašičke. Po dermalnem nanosu so ugotovili, da LD50 za zajca znaša 3360 mg/kg (29).

- Toksičnost pri ponovljivih odmerkih

Podgane so 13 zaporednih tednov prejemale 0, 40, 80 ali 250 mg/kg rezorcinola enkrat dnevno. V skupini, ki je prejemale najvišji odmerek, so občasno opazili krčevite gibe, ki so

se prvič pojavili v šestem tednu in so trajali do konca odmerjanja. Pri večini živali pri tem odmerku so opazili tudi prekomerno slinjenje in glasno dihanje. V študiji so tako določili, da NOAEL znaša 80 mg/kg/dan.

- Genotoksičnost

Genotoksičnost rezorcinola so raziskali v več testih, ki spremljajo vse vrste mutacij. Pri tistih testih, kjer je rezorcinol povzročil mutacije v bakterijskih celicah, tega v sesalskih celicah ni bilo možno potrditi. Na podlagi podatkov, ki so zbrani v tabeli XVII, sklepamo, da rezorcinol ni genotoksičen.

Tabela XVII: Rezultati testov genotoksičnosti za rezorcinol

In vitro			
Test	Snov	Rez.	Referenca
Test povratne mutacije bakterij	rezorcinol	-	Williams (2005)
	rezorcinol + S9 mix	-	
Tk lokus	rezorcinol	+	OECD 476
	rezorcinol + S9 mix	-	Sire (2004)
Mikronukleusnitest	rezorcinol	+	Osnutek OECD 487
	rezorcinol + S9 mix	-/+	Whitwell (2004)
Hprt lokus	rezorcinol	-	OECD 476
	rezorcinol + S9 mix	-	Lloyd (2009)
In vivo			
Mikronukleusni test	rezorcinol	-	OECD 474 Erexson (2005)

- Karcinogenost

Podgane so dve leti zapored prejemale 0, 112 ali 225 mg/kg petkrat tedensko. Pri samicah je bil najvišji odmerek previsok, zato so študijo začeli ponovno z odmerki 0, 50, 100 in 150 mg/kg. Paralelno je potekala študija karcinogenosti v miših, kjer so bili odmerki enaki kot pri samcih – 0, 112 in 225 mg/kg. Po 15 mesecih so iz vsake skupine živali pregledali določeno število živali. Opazili so, da rezorcinol ni povzročil višje pojavnosti tumorjev. Vnos rezorcinola ni vplival na preživelost, je pa zmanjšal telesno težo samcev za 10-15 % in samic za 11-14%. Višja smrtnost v skupinah, ki so dobivale najvišje koncentracije, je najbrž povezana z vnosom kemikalij. Tudi po koncu študije v živalih niso opazili več tumorjev, zato rezorcinol ni karcinogen (28).

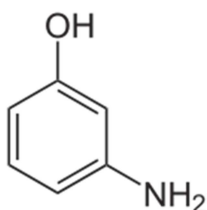
- Toksikokinetika

Podgane so peroralno prejele 112 mg/kg rezorcinola. Po 24 urah so živali usmrtili in preverili, če se snov akumulira v organih. Opazili so, da dospecifične tarčne akumulacije ni prišlo. V opazovanem času se je z urinom izločilo 90 % vnesenega odmerka, 1-2 % z blatom in 0,1 % z izdihanim zrakom kot ogljikov dioksid. Najpogostejši metabolit je bil

glukuronat, ki je predstavljal 70 % metabolitov, 10-20 % pa konjugat z žveplovo kislino, 5-10% dikonjugat žveplove in glukuronske kisline in manj kot 2 % dikonjugat z glukuronsko kislino (29).

5.4. m-AMINOFENOL

m-Aminofenol je barvni modifikator, ki se je nahajal v 56,67 % pregledanih izdelkov. Najdemo ga v prilogi III Uredbe o kozmetičnih izdelkih pod zaporedno številko 217. Priloga predvideva uporabo v najvišji koncentraciji 2,4%, kar po mešanju z razvijalcem znaša 1,2%. Za to, da zagotovimo pravo končnokonzentracijo, je potrebno na embalaži podati razmerje mešanja komponent (24).



Slika 9: Strukturna formula m-aminofenola

Tabela XVIII: Fizikalno-kemijske lastnosti m-aminofenola

Molekulska masa	109,16 g/mol
Parni tlak	/
Izgled	Bele do bež luske
Temperatura tališča	120-124°C
Temperatura vrelišča	/
Porazdelitveni koeficient	0,18 (20°C)
Absorpcijski maksimum	234 nm ($\lambda_{\max}$), 284 nm

- Iritacija in korozivnost

Po aplikaciji 2% raztopine m-aminofenola na zajčjo kožo so opazili rahlo iritacijo le pri eni živali eno uro po aplikaciji. Po 24 urah je ni bilo več moč opaziti, zato 2 % raztopina m-aminofenola ne spada med iritante. Preverili so tudi, kakšen je vpliv snovi na oko. 0,5 % raztopino so vnesli v veznično vrečico zajčega očesa. Pri dveh od treh živali so opazili rahlo oteklino in rdečico takoj po nanosu, ki je kasneje izginila. Na podlagi rezultatov so določili, da m-aminofenol v zajčjem očesu povzroči blago iritacijo.

- Alergenost

Kot večina barvil za lase, je tudi m-aminofenol sposoben povzročiti alergijske reakcije. S testom LLNA so izmerili SI pri koncentracijah od 0,5% do 25%. Določili so vrednost EC3, ki znaša 0,24%. Na podlagi tega rezultata m-aminofenol spada med močne alergene.

- Dermalna absorpcija

Z *in vitro* metodo s Franzovimi difuzijskimi celicami so določili dermalno absorpcijo najvišje predvidene koncentracije, dovoljene v izdelkih, ki znaša 2,4%. Raztopino m-aminofenola in TDA sulfata so pred nanosom zmešali z razvijalcem, ki je vseboval 6% H₂O₂. Rezultate so primerjali z enako koncentracijo m-aminofenola, ki je bil zmešan samo z vodo in opazili, da večjih razlik med paralelami ni bilo. Za izračun MoS uporabimo

količino, ki je izmerjena pod oksidativnimi pogoji. Ta za 1,2 % raztopino znaša 7,14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- Akutna toksičnost

Raziskovalci so opazovali vpliv enkratnega peroralnega vnosa 500 mg/kg m-aminofenola, ki ni povzročil smrti nobene živali. Prvi dan so pri vseh živalih opazili piloerekcijo, hipoaktivnost in dispnejo. Vsi ti znaki so drugi dan izginili. Na podlagi študije so določili, da je maksimalni odmerek, ki ne povzroči smrti, višji od 500 mg/kg (30).

LD50 po peroralnem vnosu znaša za podgane 1000 mg/kg, v drugi študiji so določili prav tako za podgane 920 mg/kg, pri miših pa je znašal 401 mg/kg (31).

- Toksičnost pri ponovljivih odmerkih

V 90 dnevni študiji so podgane peroralno prejemale 0, 20, 70, 200 ali 600 mg/kg. Nobeden od odmerkov ni povzročil smrti živali. Pri 70 mg/kg so opazili, da se nekatere podgane prekomerno slinijo. Pri višjih odmerkih so to opazili pri vseh živalih. Pri najvišjem odmerku so opazili obarvan urin pri vseh živalih in pri samicah poleg tega še obarvan rep, kar kaže na distribucijo snovi v različne dele telesa. Pri 600 mg/kg so opazili, da imajo živali anemijo. Pri 70 mg/kg so opazili spremenjeno delovanje ščitnice, in akumulacijo rjavkastega pigmenta v ledvicah. Na podlagi teh dveh podatkov je bil določen NOAEL, ki znaša 20 mg/kg/dan.

- Genotoksičnost

m-Aminofenol je povzročil mutacije v *Salmonelli* le v enem od petih sevov ob prisotnosti metabolične aktivacije. V tem sevu je bila zmožnost povzročanja mutacij šibka. Genotoksičnost m-aminofenola je ovrgel tudi *hprt* lokus test na sesalskih limfocitih, kjer ta ni deloval genotoksično. Rezultati *in vitro* mikronukleusnega testa na človeških limfocitih niso dali jasnega odgovora o genotoksičnosti snovi, zato prevlada *in vivo* rezultat, kjer m-aminofenol povzročil klastogenosti ali aneuploidije. Na podlagi teh testov sledi, da m-aminofenol *in vivo* ni genotoksičen.

Tabela XIX: Izbrani testi genotoksičnosti m-aminofenola

In vitro			
Test	Snov	Rez.	Referenca
Test povratne mutacije bakterij	m-aminofenol	-	OECD 471
	m-aminofenol + S9	+	Sire (2005)
<i>Hprt</i> lokus	m-aminofenol	-	OECD 476
	m-aminofenol + S9	-	Lloyd (2005)
Test kromosomskih aberacij	m-aminofenol	-/+	OECD 473
	m-aminofenol + S9	+	Sire (2005)
Mikronukleusnitest	m-aminofenol	-/+	OECD 487 (osnutek)
	m-aminofenol + S9	-/+	Whitwell (2005)

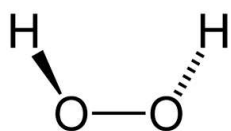
In vivo			
Mikronukleusnitest	m-aminofenol	-	OECD 474 Erexson (2005)

- Karcinogenost

Podatkov o karcinogenosti m-aminofenola ni veliko. Obstajata dve študiji na podganah in miših, v katerih so enkrat tedensko za čas 21 mesecev topikalno in peroralno aplicirali tri različne koncentracije m-aminofenola in vodikovega peroksida. V tem času niso opazili večje pojavnosti tumorjev, vendar so enako opazili v pozitivnih kontrolah, zato te študije ne dokazujejo tega, da m-aminofenol ni karcinogen (30).

5.5. VODIKOV PEROKSID

Vodikov peroksid je široko uporabljen oksidant, saj ga uporabljamo tako v gospodinjstvu kot v raznih industrijskih panogah. Med drugim lahko uporabimo za beljenje oblačil, odstranjevanje madežev, beljenje lesne kaše, za dezinfekcijo vode in odpadkov ali kot intermediat v proizvodnji kemikalij. Tudi v kozmetiki lahko uporabljamo za več namenov in zaradi potencialnih škodljivih učinkov so koncentracije, dovoljene za uporabo, omejene za različne namene(32). V izdelkih za usta je za beljenje zob ali za uporabo v ustnih vodica koncentracija omejena na 0,1%. Za beljenje zob lahko uporabimo tudi višje koncentracije v območju od 0,1 do 6%, vendar so ti izdelki namenjeni le za prodajo zobozdravnikom, saj njihov nadzor zagotavlja varno in primerno uporabo. Višje koncentracije so dovoljene v izdelkih za utrjevanje nohtov, kjer lahko uporabimo koncentracije, ki ne presegajo 2%. V namen protimikrobnega delovanja ga lahko uporabimo tudi na koži, kjer je najvišja dovoljena koncentracija 4%. V kozmetičnih izdelkih vodikov peroksid najpogosteje uporabimo v barvah za lase, saj z oksidacijo melanina razbarva las ter s sočasno oksidacijo barvil omogoči nastanek barve. V izdelkih za lase je vodikov peroksid dovoljen v koncentraciji do 12%. (10)



Slika 10: Strukturna formula vodikovega peroksida

Tabela XX: Fizikalno-kemijske lastnosti vodikovega peroksida

Molekulska masa	34,0 g/mol
Parni tlak	4,8 mm Hg (30 °C)
Izgled	Brezbarvna tekočina
Temperatura tališča	-0,4 °C
Temperatura vrelišča	150,2°C
Porazdelitveni koeficient	/

- Iritacija in korozivnost

Nižje koncentracija vodikovega peroksida na koži ne pustijo posledic, pri koncentracijah višjih od 10 % ta lahko deluje iritativno. Če pride v stik s kožo več kot 50 % raztopina,

deluje vodikov peroksid na kožo korozivno in povzroči nastanek opeklin in mehurjev (32). Na zajčji koži nanos 8% vodikovega peroksida po 24-urni okluziji ni povzročal iritacije. Nato so nanесли na ista mesta za čas 4 ur še 10 % in 35 % raztopino vodikovega peroksida. Prva je povzročila zelo blago iritacijo, medtem ko je druga koncentracija povzročila blago iritacijo (33).

V stik z barvami za lase in posledično peroksidom lahko pridejo tudi oči. Če je koncentracija peroksida manjša od 3 %, ta ne poškoduje oči, ampak povzroči le bolečino v očesu. Vodikov peroksid deluje do očesa korozivno, ko je koncentracija višja od 10 %. Višje koncentracije povzročijo opekline in razjedo ali perforacijo očesa. V namen varnosti mora biti na embalaži dodano opozorilo, da je v primeru stika izdelka z očmi te potrebno temeljito izprati (32). V Draizovem testu na zajčjih očeh je bila 5 % raztopina blago iritativna, 8 % zmerno iritativna in 10 % visoko iritativna, zato bi lahko slednja povzročila poškodbe oči.

- Alergenost

V testu GPMT vodikovemu peroksidu niso mogli dokazati alergenosti 3 ali 6 % raztopini. Tudi epikutani testi s 3 % raztopino na vzorcu 156 frizerjev niso dali niti enega pozitivnega rezultata.

- Dermalna absorpcija

Vodikov peroksid je bilo v dermisu možno zaznati le ob aplikaciji velikih količin na kožo za daljši čas ali ob prisotnosti inhibitorja katalaze. Ugotovili so, da je absorpcija transepidermalna in ne zajema absorpcije preko kožnih priveskov. Že nižje koncentracije vodikovega peroksida povzročijo dermalni emfizem, kar vidimo kot belo obarvano področje na območju stika s snovjo. Mukozne membrane so za vodikov peroksid zelo permeabilne, ampak zaradi hitrega metabolizma je količina, ki vstopi v krvni obtok, neznana. Vodikov peroksid se skozi kožo absorbira v manjšem obsegu, zato smatramo, da se absorbira 1% nanešene količine (33).

- Akutna toksičnost

V primeru zaužitja vodikovega peroksida lahko koncentracije manjše od 3 % povzročajo rahlo iritacijo gastrointestinalnega trakta in bruhanje. Koncentracije višje od 30 % pa povzročajo mehurje, izzovejo bruhanje, v hujših primerih tudi bruhanje krvi (32). LD50 je pri podganah po peroralnem vnosu višji od 600 mg/kg, pri zajcih pa je po dermalnem nanosu višji od 630 mg/kg.

- Toksičnost pri ponovljivih odmerkih

V 90-dnevni študiji so podgane peroralno prejemale odmerke od 6 – 60 mg/kg/dan. Študija je bila izvedena z raztopinami v območju od 0,06 do 0,6% vodikovega peroksida. Zaradi nižje teže podgan in znižanega nivoja katalaze v plazmi pri odmerkih višjih od 30 mg/kg so določili, da je NOAEL 20 mg/kg/dan (33).

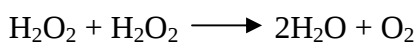
- **Karcinogenost**

Pri pregledu poklicne izpostavljenosti vodikovem peroksidu so ugotovili, da so snovi najbolj izpostavljeni frizerji, belilci tekstila in krznarji. Opazovali so vpliv vodikovega peroksida na pojavnost raka vendar povezave niso našli. Obstaja pa nekaj dokazov o karcinogenosti v živalih. Študije na miših so pokazale, da je vodikov peroksid po peroralnem vnosu povzročil tako benigne kot maligne spremembe dvanajstnika. Študije dermalnega in subkutanega vnosa pa kažejo, da vodikov peroksid ni deloval karcinogeno. Mednarodna agencija za raziskave raka je tako vodikov peroksid razvrstila v skupino 3, kjer se nahajajo snovi, za katere obstajajo dokazi o karcinogenosti v živalih, vendar za ljudi dokazov ni.

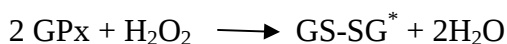
- **Toksikokinetika**

Vodikov peroksid razgrajujeta encima katalaza in glutathion peroksidaza (GPx), ki sta prisotna v človeških tkivih. V telesu vodikov peroksid nastaja v encimsko kataliziranih reakcijah z oksidazami ali s superoksid dismutazo, ki odstranjuje superoksidni radikal. Ta je običajen stranski produkt celičnega dihanja (34). Najvišja koncentracija katalaz se nahaja v dvanajstniku, jetrih, vranici, ledvicah, krvi, mukoznih membranah in ostalih zelo prekrvavljenih tkivih.

Katalaza vodikov peroksid razgradi do vode in kisika, kar prikazuje naslednja reakcija.



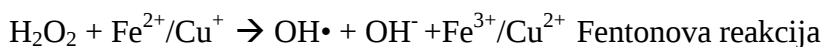
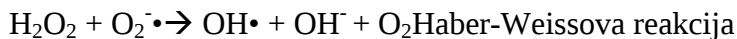
Poleg katalaze vodikov peroksid razgrajuje tudi GPx ki poleg vodikovega peroksida razgrajuje tudi organske peroksidge. V primerjavi s katalazo je GPx bolj učinkovita pri nižjih koncentracijah vodikovega peroksida. Pri reakciji se GPx oksidira in reducira vodikov peroksid do vode. Oksidirani GSH regenerira glutathion reduktaza, ki za to porablja NADPH.



* oksidirana oblika glutathiona

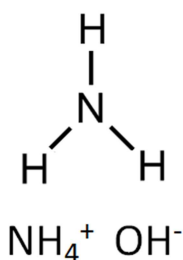
Sam vodikov peroksid celic ne poškoduje, vendar lahko potečeta Haber-Weissova ali ob prisotnosti železa ali bakra Fentonova reakcija. Pri reakcijah nastane hidroksilni radikal, ki

lahko poškoduje komponente celic, saj ni na voljo antioksidanta, ki bi radikal odstranil (33).



5.6. AMONIJAK

Amonijak je brezbarven plin, ki je tudi naraven del okolja, saj se nahaja v vodi, zraku in prsti in je vir dušika za rastline in živali. Uporabljamo ga v mnogih izdelkih za dom, gnojilih, pri izdelavi plastičnih materialov in tudi v kozmetiki (35). V izdelkih se lahko nahaja v koncentracijah do 6%. V kozmetičnih izdelkih ponavadi uporabljamo amonijev hidroksid, ki je vodna raztopina amonijaka (10, 35). V barvah za lase amonijak omogoča prodiranje barvil v lase, saj povzroči razmak celic kutikule in tako ustvari pot barvilu in oksidantu v korteks las (8).



Slika 11: Strukturna formula amonijaka (zgornaj) in amonijskega hidroksida (spodaj)

Tabela XXI: Fizikalno-kemijske lastnosti amonijaka

Molekulska masa	17,03 g/mol	
Parni tlak	2204 mm Hg (25 °C)	29% raztopina amonijaka
	6460 mm Hg (20 °C)	
Izgled	brezbarven plin z ostrim vonjem	
Temperatura tališča	- 77 °C	
Temperatura vrelišča	- 33 °C	
Porazdelitveni koeficient	0,23	

- Iritacija in korozivnost

Amonijak je do kože in oči iritativen v količinah, ki jih uporabljamo v gospodinjstvu. Pri višjih koncentracijah pa deluje korozivno tako do kože kot oči. V tabeli XXII so prikazane mejne vrednosti, pri katerih amonijak povzroči posledice (35).

Tabela XXII: Meje vrednosti amonijaka za toksikološke učinke(35)

Ppm	mg snovi/m ³ zraka	Znaki in simptomi
50	35	Blaga iritacija oči, nosu in grla
100	70	Hitra iritacija oči in zgornjih dihalnih poti
700	488	Takojšnja iritacija oči in grla
1500	1045	Edem zgornjih dihalnih poti in kašelj
2500	1742	Ogroža življenje

- Akutna toksičnost

Amonijaku smo ob uporabi barv izpostavljeni preko vdihovanja snovi, dermalnega nanosa, prav tako pa obstaja možnost, da izdelek pride do oči. V primeru inhalacije manjše količine

amonijaka ta lahko povzroči nenadno kratko sapo in kašelj. Večje količine imajo hujše posledice, saj lahko pride do edema ali opeklin zgornjih dihalnih poti, zaradi zožitve zgornjih dihalnih poti lahko pride do piskajočih zvokov pri dihanju in redko tudi akutne poškodbe pljuč. Izpostavitve očesa amonijaku lahko povzroči iritacijo in nabrekanje veznice, poškodbe epitelijske roženice ali izgubo vida. Največji del amonijaka pride poleg las v stik s kožo. Izpostavljenost manjšim količinam povzroči predvsem iritacijo ali opekline druge stopnje (35). Znana je tudi vrednost LD50, ki znaša za podgane peroralno 350 mg/kg (36).

- Genotoksičnost

Študijo, pri kateri so opazovali pojavnost kromosomskih aberacij in izmenjavo sestrskih kromatid, so izvedli z vzorci krvi 22 delavcev, ki so delali v tovarni gnojil. Opazili so povišano frekvenco kromosomskih aberacij in izmenjavo sestrskih kromatid, ki se je v obeh primerih večala z daljšo izpostavljenostjo. V tabeli XXIII so predstavljene nekatere študije genotoksičnosti. Ker so pri vseh študijah rezultati šibko pozitivni, smatramo, da ima amonijak morda genotoksično delovanje (36).

Tabela XXIII: Testi genotoksičnosti za amonijak

In vitro			
Test	Snov	Rez.	Referenca
Bakterijski test povratnih mutacij	amonijak	+	Demerec et al (1951) Samo pri zelo visokih koncentracijah
Test kromosomskih aberacij	amonijev klorid	+	Rosenfeld (1932)
In vivo			
Mikronuklearni test	amonijak	+	Yadav and Kaushik (1997)

- Karcinogenost

IARC amonijaka ni razvrstil med karcinogene, saj razen enega primera raka v nosu poročanj o tem ni. Pri tem so se bolniku po akutni izpostavitvi amonijaku v nosu na mestu rane razvile rakavespremembe. Kljub temu so rezultati dvoletne študije s svinjami pokazali, da povečana količina amonijaka v zraku lahko morda pripomore k nastanku raka, vendar za to dokazov ni (37).

- Toksikokinetika

Amonijak, ki nastane v prebavnem traktu ali je endogenega izvora, se tam tudi absorbira. Vdihan amonijak se zadrži v zgornjih dihalnih poteh, kjer se ga nekaj absorbira, 70-80 % pa se izloči z izdihanim zrakom. Najmanj amonijaka se absorbira, če ta pride v stik s kožo. Po tem, ko pride v krvni obtok, se del najprej v ledvicah pretvori v glutation in ureo. Nato

se razporedi po celém telesu. Po peroralnem vnosu se v treh dneh izloči 70% z urinom, lahko pa se izloči tudi s potenjem in izdihanim zrakom (35).

5.7. OCENA VARNOSTI BARVIL

V pregledanih izdelkih se je nahajalo 25 različnih sestavin. Tiste sestavine, ki so se pojavile najpogosteje in so najbolj ali najmanj problematične s stališča neželenih učinkov, smo ovrednotili glede varnosti uporabe s pomočjo podatkov in osnovnih toksikoloških parametrov. V tabeli XXIV so poleg MoS zbrane tudi vrednosti LD50 in NOAEL teh sestavin; v tabeli XXV pa podatki o njihovi iritativnosti ali korozivnosti ter alerginem potencialu.

Tabela XXIV: LD50, NOAEL in MoS vrednosti izbranih sestavin (25-31, 38-49)

SNOV	LD50 [mg/kg] *	NOAEL [mg/kg/dan]**	SED [mg/kg]	MoS
1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat	> 2000	250	0,02	12500
2,4-diaminofenoksietanol HCl	1000	20	0,04	500
2-amino-3-hidroksipiridin	500	30	0,02	1500
2-metilrezorcinol	390	100	0,02	5000
4-amino-2-hidroksitoluen	3600	180	0,03	6000
4-amino-m-krezol	870	60	0,4	150
4-klororezorcinol	369	70	0,08	625
6-hidroksiindol	> 600	100	0,08	750
6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin	650	50	0,07	714
m-aminofenol	1000	20	0,07	286
p-aminofenol	375	10	0,07	143
N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat	107	90	0,002	2500
PPD	80	8	0,04	200
Rezorcinol	370	80	0,02	4000
TDA	98	10	0,4	18

* peroralno, podgana

** 90-dnevna študija, podgana

Oceno varnosti sestavine potrdi MoS. Izračuni za predstavljene sestavine so navedeni v prilogi III diplomski nalogi. PPD in TDA imata najnižje vrednosti LD50 in NOAEL, vendar to ne velja za MoS. Pri izračunu upoštevamo tudi količina dermalno absorbirane snovi, zato je izračun tega parametra smiseln. Vse snovi, razen TDA, imajo ustrezen MoS. Pri TDA je izračun kljub zadnji zakonski spremembi koncentracije MoS nizek, vendar obstaja veliko podatkov o toksikokinetiki. Za takšen izračun morata biti nivoja snovi v plazmi podobna, s tem, da mora biti rezultat v živalih višji. V tem primeru izračun poteka drugače, zahtevan MoS pa je 25. Po preračunu rezultatov študij so izračunali

koncentracijo, pri kateri je dosežena zahtevana meja. To je 2,24%. V izdelkih TDA lahko uporabljamo v koncentraciji do 2%, zato je tudi zahtevan MoS, ki temelji na toksikokinetiki, zagotovljen. Glede na MoS so najvarnejše snovi 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat, 2-metilrezorcinol in 4-amino-2-hidroksitoluen.

Barve za lase pogosto povzročijo iritacijo lasišča. Zanimivo je, da s stališča iritacije spadajo 6-hidroksiindol, PPD in rezorcinol med najvarnejše, saj s testi niso dokazali iritativnega delovanja. Manj varni so 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat, 2-metilrezorcinol in 4-klororezorcinol, saj delujejo iritativno na kožo, zadnji dve snovi pa sta še zelo iritativni ali celo korozivni do očesa. Poleg iritacije je pomemben parameter, ki ga moramo upoštevati pri oceni varnosti uporabe, alergeni potencial. Čeprav sta PPD in 6-hidroksiindol s stališča iritacije med najvarnejšimi, to ne velja za alergeno, saj spadata med ekstremne alergene. V tabeli XXV lahko vidimo, da samo ena snov ne povzroča alergij. To je 2-amino-3-hidroksipiridin.

Tabela XXV: Primerjava iritativnih, korozivnih in alergeni lastnosti snovi (25, 26, 28, 30, 38- 41, 43-59)

Snov	Iritacija in korozivnost	Alergenost
1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat	Iritacija kože in oči	Močan
2,4-diaminofenoksietanol HCl	Blaga iritacija očesa	Zmeren
2-amino-3-hidroksipiridin	Iritacija očesa	Ni alergen
2-metilrezorcinol	Blaga iritacija kože, močan iritant očesa (nerazredčen)	Zmeren
4-amino-2-hidroksitoluen	Iritacija oči	Zmeren
4-amino-m-krezol	Možna blaga iritacija očesa	Zmeren
4-klororezorcinol	Iritacija kože, koroziven do očesa	Zmeren
6-hidroksiindol	Ni iritativen	Ekstremen
6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin	Rahla iritacija kože	Zmeren
m-aminofenol	Blaga iritacija očesa	Močan
N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat	Iritacija oči	Nepravilno izvedene študije, je alergen
p-aminofenol	Iritacija kože in oči	Nepravilno izvedene študije, rezultati nakazujejo, da je močan alergen
PPD	Ni iritativen	Ekstremen
rezorcinol	Ni iritativen	Močan
TDA	Blaga iritacija očesa	Močan

Za nobeno od snovi ne moremo reči, da je popolnoma varna. Kot najvarnejšo snov smo izbrali 2-amino-3-hidroksipiridin. Ima visok MoS, LD50 ter je edina sestavina, ki ne deluje alergeno, vendar lahko povzroči iritacijo oči. Na podlagi MoS sledi 1-hidroksietil-4,5-

diamino pirazol sulfat, saj ima ta najvišji NOAEL, LD50 in MoS. Nevarnost predstavlja le povzročanje alergij, saj spada med močne alergene. Kot zelo varno snov bi označili tudi 4-amino-2-hidroksitoluen, saj ima ta drugi najvišji MoS, visok LD50, vendar lahko povzroči iritacijo oči in je zmeren alergen.

Najmanj varne sestavine smo izbrali na podlagi alergenega delovanja, saj je to zaslužno za večji delež poročenih neželenih učinkov. Kot najmanj varno snov smo označili PPD, saj ima najnižji LD50 in NOAEL ter v primerjavi z ostalimi barvili tudi nižji MoS. Kljub temu, da ni iritant, je ekstremen alergen. Naslednja snov je TDA, ki prav tako kot PPD ni iritant, je pa ekstremen alergen. TDA ima poleg nizkih LD50 in NOAEL še prenizek MoS, ki pa je ob upoštevanju toksikokinetike primeren.

Vse uporabljene sestavine so z vidika genotoksičnosti, teratogenosti in kancerogenosti varne, težavo povzročajo le preobčutljivostne reakcije. Za čim manjše število neželenih učinkov bi morali uporabniki upoštevati opozorila na embalaži in navodila za uporabo, saj je večji del neželenih učinkov posledica nepravilne uporabe izdelka. Med najtežje neželene učinke spada alergijski kontaktni dermatitis, zato se SCCS nadalje usmerja na natančnejše ocenjevanje alergenega potenciala barvil in določanja mejne vrednosti, do katere naj barvila ne bi povzročala neželenih učinkov. Čeprav sedaj obstaja model sporočanja resnih neželenih učinkov, bi bilo primerno vzpostaviti tudi sistem sporočanja vseh neželenih učinkov in obveščanje uporabnikov o tem, saj bi s tem pridobili tudi celovitejšo sliko o neželenih učinkih in zmanjšali število le-teh.

6. SKLEP

V diplomskem delu smo pregledali sestavine 31 izdelkov za barvanje las, ki vsebujejo oksidativna barvila in ki se nahajajo na našem tržišču in jih ne uvrščamo med profesionalne barve za lase. Predvsem smo želeli ugotoviti, kako varne za uporabo so posamezne sestavine v tovrstnih izdelkih. Ugotovitve lahko strnemo v naslednjih točkah:

- V 30 različnih izdelkih se je pojavilo 25 različnih prekurzorjev oksidativnih barvil. Od tega je bilo 8 sestavin primarnih intermediatov in 17 barvnih modifikatorjev. V vseh izdelkih se je kot oksidant pojavil vodikov peroksid, kot bazična snov je bil najpogosteje uporabljen amonijev hidroksid, ki ga je vsebovalo 66,67 % izdelkov.
- Izmed 8 primarnih intermediatov se je v izdelkih najpogosteje nahajal toluen-2,5-diamin in njegova sol, ki sta se pojavila v 77,67 % izdelkov. Pogosteje je

uporabljena sol, ki se je nahajala v 18 izdelkih izmed 23. Naslednja sestavina, ki se je uporabila pogosto, je 1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat, ki se je nahajal v 26,67 % izdelkov. Primarni modifikatorji so bili v splošnem močni alergeni, saj je 54,35% pregledanih primarnih intermediatov ekstremnih alergenov, 45,65 % pa močnih alergenov.

- Bolj raznolika skupina od primarnih intermediatov je skupina barvnih modifikatorjev. V pregledanih izdelkih se je nahajalo 17 različnih snovi, od teh najpogosteje rezorcinol in m-aminofenol, ki sta se oba pojavila v 56,67 % izdelkov. V primerjavi s primarnimi intermediiati so glede alergnosti barvni modifikatorji v splošnem manj problematični, saj je 11,76% ekstremnih alergenov in 35,71% močnih alergenov.
- Povprečno se v pregledanih izdelkih nahaja po 5 prekurzorjev barvil. Ugotovili smo, da 83,33 % izdelkov vsebuje vsaj štiri prekurzorje ali več.
- Izmed sestavinami, ki se nahajajo v pregledanih izdelkih, smo med podrobneje opisanimi določili, da je najvarnejša snov 2-amino-3-hidroksipiridin, ki je edino barvilo, ki ni alergen. Barvilo je bilo uporabljeno v 43,33 % izdelkov. Najmanj varna snov je PPD, saj ima poleg visoke stopnje povzročanja alergij nizke tudi ostale toksikološke parametre. Pojavil se je v 6,67 % izdelkov.
- Za varno uporabo izdelka bi morali uporabniki slediti navodilom za uporabo in upoštevati opozorila. Za večjo učinkovitost navodil za uporabo in samotestiranja bi moral biti postopek testiranja standardiziran.
- Kljub omejitvi uporabe barvil se neželeni učinki še vedno pojavijo. Z obdelavo podatkov in ukrepi se ukvarja področje kozmetovigilance, ki razen poročanja o resnih neželenih učinkih, ni regulirano. Skupni sistemi poročanja o neželenih učinkih v državah ali med različnimi podjetji bi lahko pomagali omejiti tudi manj resne neželene učinke.

7. LITERATURA

- 1) <http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/cosmetic-products/hair-dye-products/> (dostopano 4. 5. 2013)
- 2) Bhushan B: Biophysics of Human Hair, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010: 1-19.
- 3) http://www.hair-science.com/_int/_en/topic/topic_sousrub.aspx?tc=root-hair-science^portrait-of-an-unknown-element^superb-chemistry&cur=superb-chemistry (dostopano 4. 5. 2013)
- 4) KusumaS, Vuthoori RK, Piliang M, Zins JE: Skin Anatomy and Physiology. Plastic and Reconstructive Surgery; 2010: 161-171
- 5) <http://lcsdanatomyphysiology.wikispaces.com/file/view/epidermal%20cells.jpg/398912072/393x449/epidermal%20cells.jpg> (dostopano 10. 7. 2013)
- 6) <http://sylviah810.files.wordpress.com/2010/11/skin.jpg> (dostopano 10. 7. 2013)
- 7) Elias PM: The skin barrier as an innate immune element. Semin Immunopathol; (2007) 29:3–14
- 8) Ghosh P, Sinha AK: Hair Colors: Classification, Chemistry and a Review of Chromatographic and Electrophoretic Methods for Analysis. Analytical Letters; 2208: 41: 2291–2321
- 9) Salvador A, Chisvert A: Analysis of Cosmetic Products, Elsevier Science, Amsterdam, 2007: 190-209.
- 10) Uredba (ES) št.1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih
- 11) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on Intermediates and reaction products of oxidative hair dye ingredients formed during hair dyeing, 21 January 2009
- 12) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/cosmetic-products/hair-dye-products/safety-strategy/index_en.htm (dostopano 10. 5. 2013)
- 13) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation, 8th Revision, 11 December 2012
- 14) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Memorandum on the classification and categorization of skin sensitizers and grading of test reaction, 20 September 2005

- 15) Izvedbena direktiva Komisije 2012/21/EU z dne 2. avgusta 2012 o spremembi prilog II in III k Direktivi Sveta 76/768/EGS v zvezi s kozmetičnimi izdelki zaradi prilagoditve tehničnemu napredku
- 16) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Memorandum on hair dye chemical sensitisation, 26 February 2013
- 17) Verma V, Snah SN: Contact Dermatitis. InnovAiT. 2009: vol. 2 no. 6 336-341
- 18) Johansen JD et al. (eds.): Contact Dermatitis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011: 629-638.
- 19) Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF: Allergic contact dermatitis. International Immunopharmacology 2002; 2: 201–211
- 20) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on sensitivity to hair dyes - consumer self testing, 18 December 2007
- 21) Colipa Guidelines on the Management of Undesirable Event Reports, 23 August 2005
- 22) http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/guidelines/sue_en.htm
(dostopano 26. 5. 2013)
- 23) Krasteva M, Bons B, S Tozer S, Rich K et al.: Contact allergy to hair colouring products: The cosmetovigilance experience of 4 companies (2003–2006). Eur J Dermatol 2010; 20 (1): 85-95
- 24) Uredba Komisije (EU) št. 344/2013 z dne 4. aprila 2013 o spremembi prilog II, III, V in VI k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o kozmetičnih izdelkih
- 25) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on p-phenylenediamine, 26-27 June 2012
- 26) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on toluene-2,5-diamine, 26-27 June 2012
- 27) <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=E881D83A-BDB5-82F8-FC0C3629CEAE4ABA>
(dostopano 10. 6. 2013)
- 28) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on resorcinol, 23 March 2010
- 29) <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=E87C14D5-BDB5-82F8-FB860E88EA32A177>
(dostopano 15. 6. 2013)

- 30) Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), 19 December 2006, Opinion on m-aminophenol COLIPA N° A15
- 31) <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+2586> (dostopano 18. 6. 2013)
- 32) Health Protection Agency Compendium of Chemical Hazards: Hydrogen Peroxide. 2009.
- 33) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products and tooth whitening products, 18 December 2007
- 34) International Agency for the Research on Cancer (IARC), Hydrogen Peroxide. Vol 71, In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 1999, IARC: Lyon
- 35) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2004). Toxicological Profile for Ammonia.
- 36) Health Protection Agency Compendium of Chemical Hazards: Ammonia. 2011.
- 37) <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+162> (datum dostopa: 2. 8. 2013)
- 38) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on 1-hydroxyethyl-4,5-diamino pyrazole sulfate, 13-14 December 2011
- 39) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on 2,4-diaminophenoxyethanol dihydrochloride and sulfate, 21 September 2010
- 40) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on 2-amino-3-hydroxypyridine, 15 April 2008
- 41) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on 2-methylresorcinol, 16 December 2008
- 42) <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7152> (dostopano 6. 7. 2013)
- 43) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on 4-Amino-2-hydroxytoluene, 10 October 2006
- 44) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on 4-amino-m-cresol, 20 September 2005
- 45) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on 4-chlororesorcinol, 23 March 2010

- 46) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on 6-Hydroxyindole, 28 March 2006
- 47) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on 6-methoxy-2-methylamino-3-amino pyridine HCl, 15 April 2008
- 48) SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on paminophenol, 13-14 December 2011
- 49) SCCP (Scientific Committee on Consumer Products), Opinion on N,N-bis(2-hydroxyethyl)-*p*-phenylenediamine sulfate, 20 June 2006

Priloga I – seznam 76 snovi, ki jih lahko uporabljamo v barvah za lase

Tabela XXVI: seznam 76 barvil, ki jih lahko uporabljamo v barvah za lase (1, 16)

	INCI ime	Zaporedna številka snovi v Prilogi III	CAS številka	Alergenost: kategorije (SCCS)
1	N-fenil-p-fenilendiamin	8	101-54-2; 2198-59-6; 4698-29-7	ekstremna
2	p-fenilendiamin	8a	106-50-3	ekstremna
3	2,6-dihidroksietilaminotoluen	9	149330-25-6	NP*
4	toluen-2,5-diamin	9a	95-70-5	ekstremna
5	1-naftol	16	90-15-3	močna
6	Rezorcinol	22	108-46-3	močna
7	Acid Yellow 23	189	1934-21-0	zmerna
8	Acid Blue 9	190	3844-45-9	NP
9	Curry Red	191	25956-17-6	NP
10	Acid Red 18	192	2611-82-7	NP
11	Acid Red 52	193	3520-42-1	NP
12	Acid Red 33	194	3567-66-6	NP
13	Acid Blue 62	195	4368-56-3	NP
14	HC Blue No.11	196	23920-15-2	NT**
15	HC Yellow No.10	197	109023-83-8	NT
16	3-metilamino-4-nitro-fenoksietanol	198	59820-63-2	NP
17	HC Blue No. 2	199	33229-34-4	
18	HC Violet No.2	200	104226-19-9	zmeren
19	2-kloro-6-(etilamino)-4-nitrofenol	201	131657-78-8	zmeren
20	1,3-bis-(2,4-diaminofenoksi)propan, 4 HCl	202	74918-21-1 81892-72-0	Zmeren
21	6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin HCl	203	90817-34-8 83732-72-3	Močan
22	dihidroksiindolin HBr	204	29539-03-5	Zmeren
23	4-hidroksilpropilamino-3-nitrofenol	205	92952-81-3	NP
24	HC Orange No.2	208	85765-48-6	močan
25	2-hidroksietilamino-5-nitroanizol	209	66095-81-6	NP
26	4-amino-3-nitrofenol	215	610-81-1	ekstremen
27	2,7-naftalendiol	216	582-17-2	zmeren
28	m-aminofenol	217	591-27-5; 51-81-0; 68236-81-6	močan
29	2,6-dihidroksi-3,4-dimetilpiridin	217	84540-47-6	
30	2-hidroksietilpikramska kislina	222	99610-72-7	
31	p-metilaminofenol	223	150-75-4; 55-55-0	Zmeren
32	HC Blue No. 12	225	104516-93-0; 132885-85-9	Zmeren
33	3-amino-2,4-diklorofenol HCl	227	61693-42-3	Zmeren
34	Fenilmetilpirazonon	230	89-25-8	Močan
35	2-metil-5-hidroksietilaminofenol	232	55302-96-0	NP

36	Hidroksibenzomorfolin	234	26021-57-8	NP
37	HC Red No. 13	237	94158-13-1	Zmeren
38	2,6-dimetoksi-3,5-piridindiamin HCl	238	56216-28-5	Močan
39	HC Violet No 1	239	82576-75-8	Močan
40	1,5-naftalendiol	241	83-56-7	Zmeren
41	hidroksipropil bis(<i>N</i> -hidroksietil- <i>p</i> -fenilendiamin) HCl	242	128729-28-2; 128729-30-6	Močan
42	4-amino-2-hidroksitoluen	243	2835-95-2	Močan
43	2,4-diaminofenoksietanol	244	66422-95-5; 70643-20-8	Zmeren
44	2-metilrezorcinol	245	608-25-3	Zmeren
45	4-amino- <i>m</i> -krezol	246	2835-99-6	Močan
46	2-amino-4-hidroksietil aminoanizol sulfat	248	83763-48-8; 83763-47-7	NT
47	hidroksietil-3,4-metilendioksianilin HCl	249	94158-14-2	Močan
48	3-nitro- <i>p</i> -hidroksietilaminofenol	250	65235-31-6	Ekstremen
49	4-nitrofenil aminoetilurea	251	27080-42-8	NT
50	2-amino-6-kloro-4-nitrofenol	252	6358-09-4	Močan
51	<i>N,N</i> -bis(2-hidroksietil)- <i>p</i> -fenilendiamin sulfat	253	54381-16-7	Močan
52	4-klororezorcinol	254	95-88-5	Zmeren
53	2,4,5,6-tetraaminopirimidin sulfat	255	5392-289; 1004-74-6	NT
54	hidroksietil- <i>p</i> -fenilendiamin sulfat	256	93841-25-9	Močan
55	Dihidroksiindol	257	3131-52-0	Ekstremen
56	5-amino-4-kloro- <i>o</i> -krezol	258	110102-85-7	NT
57	6-hidroksiindol	259	2380-86-1	Ekstremen
58	2,3-indolindion	260	91-56-5	Zmeren
59	2-amino-3-hidroksipiridin	261	16867-03-1	Ni alergen
60	1-acetoksi-2-metoksinaftalen	262	5697-02-9	Močan
61	2-metil-1-naftol	263	7469-77-4	Močan
62	Acid Yellow 1	264	846-70-8	Zmeren
63	4-nitro- <i>o</i> -fenilendiamin sulfat	265	99-56-9	Ekstremen
64	HC Red No. 7	266	24905-87-1	Zmeren
65	HC Yellow No. 4	267	59820-43-8; 52551-67-4	NP
66	HC Yellow No. 2	268	4926-55-0	NT
67	HC Orange No. 1	269	54381-08-7	NP
68	HC Red No. 1	270	2784-89-6	Ekstremen
69	HC Yellow No. 9	271	86419-69-4; 141973-33-3	NT
70	HC Yellow No. 7	272	104226-21-3	NT
71	HC Yellow No. 13	273	10442-83-8	NP
72	Basic Yellow 57	274	68391-31-1	NT
73	Disperse Black 9	275	20721-50-0	NT
74	HC Blue No 14	276	99788-75-7	NP
75	HC Red No.10 + HC Red No.11	277	95576-89-9; 95576-92-4	NT
76	hidroksietil-2-nitro- <i>p</i> -toluidin	278	100418-33-5	NT

*NP = ni podatkov

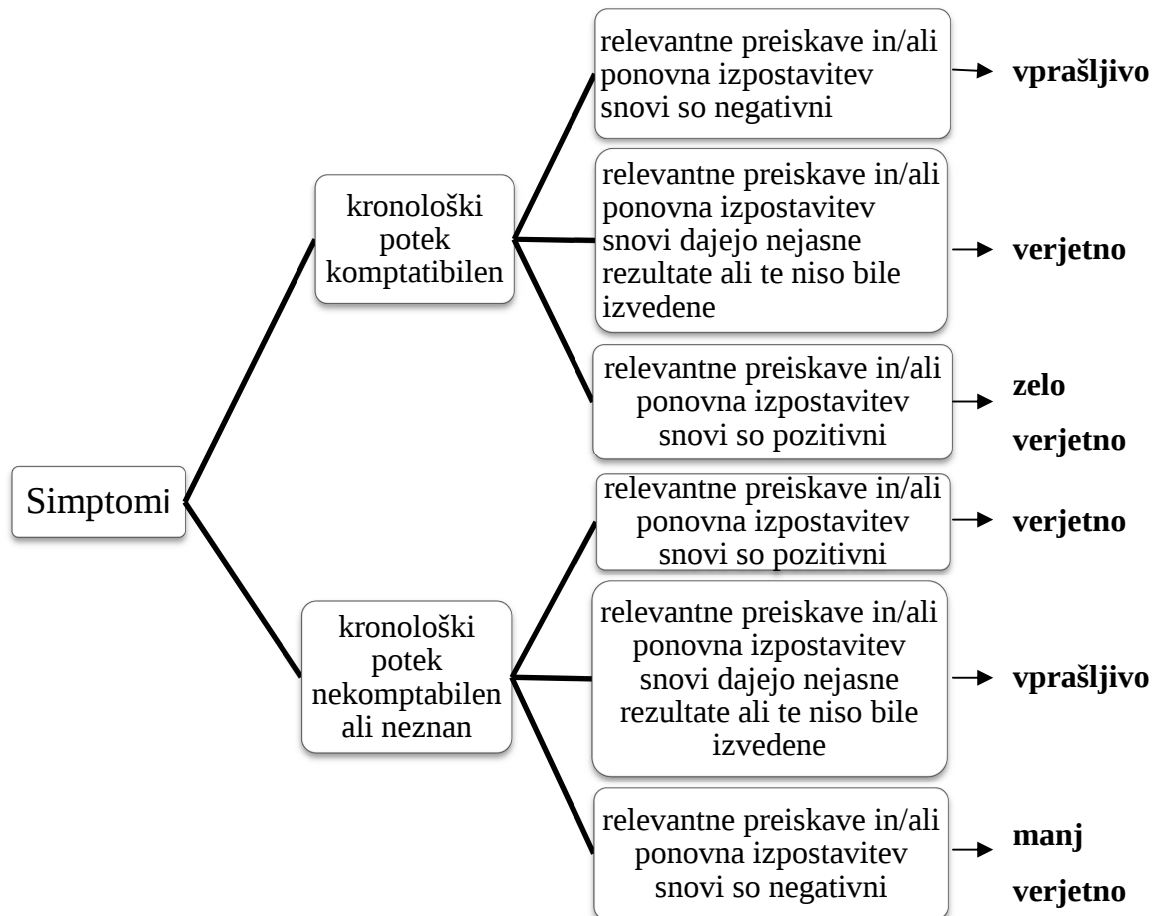
**NT = nepravilno izvajanje testov

Priloga II – A- informacije, ki jih prijava neželenih učinkov običajno vsebuje, in B- način, kako si pomagamo z odločitvenim drevesom za določitev ocene vzročnosti(13)

A

- Datum izpostavitve
- Uporabnik:
 - ime ali začetnice
 - kontaktni podatki
 - spol in starost
 - informacije o alergijah, zdravstvenih težavah, predhodnih težavah s kozmetičnimi izdelki...
 - informacije o osebi, ki neželene učinke sporoča, če to ni uporabnik (ime, kontaktni podatki, poklic)
- Kozmetični izdelek, ki naj bi povzročil težave
 - kategorija izdelka
 - točno ime
 - serijska številka
- Okoliščine ob uporabi
 - trajanje aplikacije
 - v primeru neustrezne rabe izdelka: zaporedje dogodkov, ki so pripeljali do neželenega učinka
- Neželeni učinek
 - znaki/simptomi
 - kronološki potek
 - resnost dogodka
 - zdravniška diagnoza (če je na razpolago)
 - rezultati zdravniškega pregleda in/ali ponovne izpostavitve snovi
 - kliničen potek dogodka in zdravljenje, če je do tega prišlo

B- Odločitveno drevo za oceno vzročnosti



Kompatibilen kronološki potek: zaporedje dogodkov od uporabe izdelka in od prenehanja uporabe izdelka in izzvenitje simptomov iz medicinskega pogleda ustreza neželenemu učinku

Priloga III – izračun MoS sestavin, predstavljenih v tabeli XXIV

(25, 26, 28, 30, 38- 41, 43-49)

$$MoS = \frac{NOAEL}{SED}$$

$$SED = \frac{DA \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times SSA \times F}{60 \text{ kg}}$$

DA [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] – dermalna absorpcija

SSA[cm^2] – površina kože nanosa izdelka = 580 cm^2

F [dan^{-1}] – pogostost aplikacije – zaradi uporabe na 28 dni se pri barvah za lase pogostost uporabe izpusti

PPD

NOAEL = 8 mg/kg

DA = $4,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

$$SED = \frac{4,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,04 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{8 \text{ mg/kg TT}}{0,04 \text{ mg/kg TT}} = 200$$

TDA

DA = $40,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

NOAEL = 10 mg/kg

NOAEL = $6,9 \text{ mg/kg}$ (popravljen za biorazpoložljivost)

$$SED = \frac{40,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,4 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{6,9 \text{ mg/kg}}{0,4 \text{ mg/kg}} = 17$$

rezorcinol

DA = $2,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

NOAEL = 80 mg/kg

$$SED = \frac{2,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,02 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{80 \text{ mg/kg}}{0,020 \text{ mg/kg}} = 4000$$

m-aminofenol

$$DA = 7,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{NOAEL} = 20 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{7,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,07 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{20 \text{ mg/kg TT/dan}}{0,07 \text{ mg/kg TT/dan}} = 286$$

2-metilrezorcinol

$$DA = 2,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{NOAEL} = 100 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{2,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,02 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{100 \text{ mg/kg}}{0,02 \text{ mg/kg}} = 5000$$

4-klororezorcinol

$$DA = 8,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{NOAEL} = 50 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{8,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,08 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{50 \text{ mg/kg}}{0,08 \text{ mg/kg}} = 625$$

2,4-diaminofenoksietanol hidroklorid

$$DA = 4,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{NOAEL} = 20 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{4,33 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,04 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{20 \text{ mg/kg}}{0,04 \text{ mg/kg}} = 500$$

6-hidroksiindol

$$DA = 8,09$$

$$\text{NOAEL} = 60 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{8,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,08 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{60 \text{ mg/kg}}{0,08 \text{ mg/kg}} = 750$$

6-metoksi-2-metilamino-3-aminopiridin

$$DA = 7,59 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$LOAEL = 50 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{7,59 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,07 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{50 \text{ mg/kg TT/dan}}{0,07 \text{ mg/kg TT/d}} = 714$$

p-aminofenol

$$DA = 6,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$NOAEL = 10 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{6,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,07 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{10 \text{ mg/kg}}{0,07 \text{ mg/kg}} = 143$$

1-hidroksietil-4,5-diamino pirazol sulfat

$$DA = 1,953 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$NOAEL = 250 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{1,953 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,02 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{250 \text{ mg/kg}}{0,02 \text{ mg/kg}} = 12500$$

4-amino-m-krezol

$$DA = 41,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$NOAEL = 60 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{41,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,4 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{60 \text{ mg/kg}}{0,04 \text{ mg/kg}} = 150$$

4-amino-2-hidroksitoluen

$$DA = 3,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$NOAEL = 180 \text{ mg/kg}$$

$$SED = \frac{3,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,03 \text{ mg/kg}$$

$$MoS = \frac{180 \text{ mg/kg}}{0,03 \text{ mg/kg}} = 6000$$

2-amino-3-hidroksipiridin

$$DA = 1,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{NOAEL} = 30 \text{ mg}/\text{kg}$$

$$SED = \frac{1,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,02 \text{ mg}/\text{kg}$$

$$MoS = \frac{30 \text{ mg}/\text{kg}}{0,02 \text{ mg}/\text{kg}} = 1500$$

N,N-bis-(2-hidroksietil)-p-fenilendiamin sulfat

$$DA = 0,252 \mu\text{g}/\text{cm}^2$$

$$\text{NOAEL} = 5 \text{ mg}/\text{kg}$$

$$SED = \frac{0,252 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times 10^{-3} \text{ mg}/\mu\text{g} \times 580 \text{ cm}^2}{60 \text{ kg}} = 0,002 \text{ mg}/\text{kg}$$

$$MoS = \frac{5 \text{ mg}/\text{kg}}{0,002 \text{ mg}/\text{kg}} = 2500$$