

**FAKULTETA ZA VARSTVO OKOLJA**

DIPLOMSKO DELO

**PRISOTNOST CINKOVEGA PIRITIONA V KOZMETIKI IN  
UGOTAVLJANJE NJEGOVE POTENCIALNE TOKSIČNOSTI**

ŠPELA HVAŠTJA

VELENJE, 2023

**FAKULTETA ZA VARSTVO OKOLJA**

DIPLOMSKO DELO

**PRISOTNOST CINKOVEGA PIRITIONA V KOZMETIKI IN  
UGOTAVLJANJE NJEGOVE POTENCIALNE TOKSIČNOSTI**

ŠPELA HVAŠTJA  
Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentorica: viš. pred. dr. Anja Bubik

VELENJE, 2023

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študentka Fakultete za varstvo okolja **Špela Hvastja** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

**Prisotnost cinkovega piritiona v kozmetiki in ugotavljanje njegove potencialne toksičnosti**

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

**Presence of zinc pyrithione in cosmetics and determination of its potential toxicity**

Mentorica: **viš. pred. dr. Anja Bubik**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Diplomskim redom FVO.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat FVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.



Prof. dr. Boštjan Pokorny  
dekan



Fakulteta za varstvo okolja  
Trg mladosti 7 | 3320 Velenje  
t: 03 898 64 10 | e: info@fvo.si  
[www.fvo.si](http://www.fvo.si)



## MENTORSTVO IN IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisana **Špela Hvastja**, z vpisno številko **34190007**, študentka dodiplomskega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtorica diplomskega dela z naslovom:

**Prisotnost cinkovega piritona v kozmetiki in ugotavljanje njegove potencialne toksičnosti,**

ki sem ga izdelala pod mentorstvom viš. pred. dr. Anje Bubik.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- da oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili FVO;
- da so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili FVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na FVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala Eneja Osrajnik;
- da dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani FVO;
- da sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični.

Velenju, dne \_\_\_\_\_

Podpis avtorice: \_\_\_\_\_

## ZAHVALA

Za vso strokovno pomoč, vodenje, nasvete, potrpežljivost, upanje, vzpodbujanje in trud skozi celotno pisanje diplomskega dela, se iskreno zahvaljujem mentorici, viš. pred. dr. Anji Bubik.

Hvala Fakulteti za varstvo okolja, da so mi omogočili izvajanje eksperimentalnega dela v šolskem laboratoriju.

Hvala Eneji, ki mi je lektorirala diplomsko delo.

Hvala vsem anketirancem, ki ste sodelovali v anketi in mi omogočili pridobiti potrebne informacije.

Hvala ekipi na oddelku za analizo kemije iz podjetja Gorenje, Bernardi, Taji, Tini in Heleni ter podjetju Gorenje d.o.o., ki ste mi omogočili izvajati eksperimentalno delo z vodnimi bolhicami v vašem laboratoriju.

Hvala vsem sošolcem, ki so mi pomagali in stali ob strani skozi vsa študijska leta.

Predvsem pa iskreno hvala Mihu, Leonu, mami in ostali družini ter prijateljem, ki so mi stali ob strani, me vzpodbujali, motivirali, verjeli vame in me podpirali vse do konca mojega diplomskega dela.

Vsem iskreno hvala.

## IZVLEČEK

V diplomskem delu smo preučevali prisotnost sintetične kemikalije, cinkovega piritiona, v šamponih za nego problematičnega lasišča na slovenskem trgu. Poskušali smo tudi oceniti njegov vpliv na človeka in okolje preko določanja njegove potencialne toksičnosti na treh modelnih organizmih, ki se uporabljajo za ugotavljanje ekotoksičnih učinkov kemikalij.

V teoretičnem delu smo raziskali lastnosti in uporabo cinkovega piritiona (ZnPT) ter na podlagi Uredbe (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009, o kozmetičnih izdelkih, preučili trenutne in pretekle dovoljene koncentracije ZnPT v izdelkih za osebno nego v Evropski uniji. V preteklosti, od leta 2009 dalje, se je njegova dovoljena vrednost gibala med 0,1–2 %. Vse do 1. marca leta 2022, ko so na podlagi Uredbe EU št. 2021/1902, prepovedali nadaljnjo uporabo ZnPT v izdelkih za osebno nego, saj je bil uvrščen v skupino kemikalij kategorije CMR 1B. Za to kategorijo kemikalij obstaja znanstveni dokaz na poskusih na živalih, da je snov rakotvorna, mutagena ali strupena za razmnoževanje. Razne študije so pokazale na toksične vplive ZnPT na vodne organizme, s poudarkom na sinergističnih toksičnih vplivih ob prisotnosti drugih kemikalij. V študijah, ki so raziskovale vpliv ZnPT na zdravje človeka, pa se je izkazalo, da lahko škoduje in zavira pravilno delovanje kožnih celic, ko je ta nanešen topično.

V praktičnem delu smo najprej s pomočjo spletne ankete pridobili splošne podatke o uporabi izdelkov za nego las, o težavah z lasiščem in o uporabljenih šamponih. Podatki so nam pomagali pri nadaljnji terenski analizi pri raziskovanju prisotnosti ZnPT v šamponih na spletu in v trgovinah. V anketi se je izkazalo, da ima kar 1/3 anketirancev težave s prhljajem in se jih večji delež nagiba k uporabi izdelkov blagovne znamke *Head & Shoulders*, ki je ena najbolj komercializiranih znamk za reševanje težav s prhljajem. Vsem navedenim znamkam šamponov anketirancev smo pregledali sestavine, vendar prisotnosti ZnPT v naših trgovinah nismo zasledili. Smo pa zasledili vsebnost ZnPT v manjšem obsegu v spletnih trgovinah.

Nato smo želeli preučiti še potencialno toksičnost ZnPT na žive organizme s pomočjo eksperimentalnih metod na organizmih *Allium cepa L.*, *Lipidium* in *Daphnia magna* ter uporabili 6 različnih koncentracij ZnPT (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM in 100 µM). Pri čebulah *Allium cepa L.* je bil vpliv akutne toksičnosti pri celični delitvi opazen, saj se je skozi ves čas (3., 5. in 7. dan) rast koreninic sorazmerno z višanjem koncentracije zmanjševala. Prav tako so bili opazni izraziti toksični učinki ZnPT na vodne bolhe *Daphnia magna*, pri katerih smo že po 24 urah izpostavljenosti koncentracijam mikromolarnega območja opazili 100 % umrljivost bolh. Med rezultati eksperimentalnih metod je odstopal test na vrtno krešo *Lipidium*, saj smo v času izpostavljenosti ZnPT (48 in 72 ur) opazili zaviralni učinek rasti pri najvišji in najnižji koncentraciji (100 µM in 1 nM), pri ostalih dolžinah poganjkov pa ni bilo opaznega zaviranja rasti, temveč je bila rast celo zelo uspešna.

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je bila prepoved uporabe ZnPT v kozmetičnih izdelkih učinkovita, hkrati pa tudi upravičena, saj tudi naši eksperimentalni rezultati kažejo na njegov akutni toksični učinek v vodnih okoljih.

**Ključne besede:** cinkov piriton, kozmetični izdelki, toksičnost, prhljaj, vodna okolja

## ABSTRACT

In our thesis, we studied the presence of a synthetic chemical, zinc pyrithione, in shampoos for the care of problematic scalp on the Slovenian market. We also tried to assess its impact on humans and the environment by determining its potential toxicity on three model organisms used to assess the ecotoxic effects of chemicals.

In the theoretical part, we investigated the properties and use of zinc pyrithione (ZnPT) and, on the basis of Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, examined the current and past permitted concentrations of ZnPT in personal care products in the European Union. In the past, since 2009, its permissible value has ranged from 0.1 to 2%. This changed on 1<sup>st</sup> March 2022 when ZnPT was banned from further use in personal care products on the basis of EU Regulation No 2021/1902, as it was classified as CMR category 1B chemicals. For this category of chemicals, there is scientific evidence in animal experiments that the substance is carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction. Various studies have shown toxic effects of ZnPT on aquatic organisms, with emphasis on synergistic toxic effects in the presence of other chemicals. However, studies investigating the impact of ZnPT on human health have shown that it can damage and inhibit the proper functioning of skin cells when applied topically.

In the practical part of the thesis, we first obtained general data through an online survey on the use of hair care products, scalp problems, and shampoos used. The data helped us in further fieldwork, in researching the presence of ZnPT in shampoos available both online and in stores. In the survey, it turned out that as many as 1/3 of respondents have problems with dandruff and a significant part of them tend to use products from the *Head & Shoulders* brand, which is one of the most commercialized brands for solving dandruff problems. We checked the ingredients of all the shampoo brands listed by the respondents and we did not find the presence of ZnPT in our stores. However, we found the presence of ZnPT to a lesser extent in online stores.

We then wanted to investigate the potential toxicity of ZnPT to living organisms using experimental methods on *Allium cepa L.*, *Lipidium* and *Daphnia magna*, using 6 different concentrations of ZnPT (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM and 100 µM). In *Allium cepa L.* onions, the effect of acute toxicity on cell division was observed as root growth decreased proportionally with increasing concentration over time (day 3, 5 and 7). In addition, pronounced toxic effects of ZnPT on *Daphnia magna* water fleas were observed, with a 100% flea mortality rate observed as early as 24 hours after exposure to micromolar range concentrations. Among the results of the experimental methods, the test on the garden crest *Lipidium* differed, because during the exposure to ZnPT (after 48 and 72 hours) we observed a growth inhibitory effect at the highest and lowest concentration (100 µM and 1 nM), while in other shoot lengths there was no noticeable growth inhibition; growth was, in fact, very successful.

Based on the obtained results, we can conclude that the ban on the use of ZnPT in cosmetic products was effective and at the same time justified, as our experimental results also indicate its acute toxic effect in aquatic environments.

**Key words:** zinc pyrithione, cosmetics, toxicity, dandruff, aquatic environments

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	NAMEN IN CILJI .....	1
1.2	HIPOTEZI .....	2
<b>2</b>	<b>CINKOV PIRITION</b> .....	<b>3</b>
2.1	ZNPT V KOZMETIKI .....	5
2.1.1	<i>Luskavica</i> .....	5
2.1.2	<i>Prhljaj</i> .....	5
2.2	ZNPT IN ZAKONODAJA .....	6
2.3	VPLIVI ZNPT NA ZDRAVJE OKOLJA .....	8
2.4	VPLIVI ZNPT NA ZDRAVJE LJUDI.....	10
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>12</b>
3.1	TERENSKA ANALIZA IZDELKOV ZA NEGO LASIŠČA.....	12
3.2	<i>IN VITRO</i> OCENA POTENCIALNE TOKSIČNOSTI ZNPT .....	12
3.2.1	<i>Priprava raztopin ZnPT</i> .....	15
3.2.2	<i>Čebulni test Allium cepa L. (Allium test)</i> .....	16
3.2.3	<i>Kalitveni test vrtno kreše Lepidium (Lepidium test)</i> .....	17
3.2.4	<i>Test strupenosti na vodne bolhe Daphnia magna (Daphnia test)</i> .....	18
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO</b> .....	<b>20</b>
4.1	TERENSKA ANALIZA IZDELKOV ZA NEGO LASIŠČA.....	20
4.2	<i>IN VITRO</i> OCENA POTENCIALNE TOKSIČNOSTI CINKOVEGA PIRITIONA.....	26
4.2.1	<i>Čebulni test Allium cepa L. (Allium test)</i> .....	26
4.2.2	<i>Kalitveni test vrtno kreše Lepidium (Lepidium test)</i> .....	32
4.2.3	<i>Test strupenosti na vodne bolhe Daphnia magna (Daphnia test)</i> .....	35
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>4342</b>
<b>9</b>	<b>PRILOGE</b> .....	<b>4645</b>



## KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Cinkov piriton (ZnPT) kot prepovedana substanca na seznamu ECHA.....</i>	7
<i>Slika 2: Pripomočki za pripravo raztopin.....</i>	13
<i>Slika 3: Pripomočki za izvedbo Allium testa .....</i>	13
<i>Slika 4: Cinkov piriton v prvotni embalaži .....</i>	14
<i>Slika 5: DMSO v prvotni embalaži.....</i>	14
<i>Slika 6: Vseh 9 pripravljenih raztopin ZnPT (zavite v folijo) .....</i>	15
<i>Slika 7: Založna (stock) raztopina v bučki .....</i>	15
<i>Slika 8: Dan postavitve čebulnega testa (Allium cepa L.) .....</i>	<del>36</del> 16
<i>Slika 9: Rezultati čebulic po 24 urah namakanja v testni raztopini.....</i>	17
<i>Slika 10: Dan postavitve kalitvenega testa vrtno kreše (Lepidium) .....</i>	18
<i>Slika 11: Rezultati Lipidium testa po 24 urah in s koncentracijo ZnPT 1 nM.....</i>	18
<i>Slika 12: Priprava poskusa test strupenosti na vodnih bolhah (Daphnia magna).....</i>	19
<i>Slika 13: Slikane sestavine šampona L'oreal – scalp advanced serie expert, med katerimi je naveden ZnPT, na spletnem mestu .....</i>	21
<i>Slika 14: Slikane sestavine šampona Psoren, med katerimi je naveden ZnPT na spletnem mestu.....</i>	21
<i>Slika 15: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Na kaj ste pozorni pri nakupu šampona za lase? (možnih več odgovorov)«.....</i>	23
<i>Slika 16: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Na katero znamko šampona pomislite, ko slišite besedo PRHLJAJ? (možnih več odgovorov)«.....</i>	24
<i>Slika 17: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Imate morda težave s prhljajem ali z luskavico?«... </i>	24
<i>Slika 18: Allium test – rast koreninic po 3 dneh .....</i>	27
<i>Slika 19: Allium test – rast koreninic po 5 dneh .....</i>	28
<i>Slika 20: Allium test – rast koreninic po 7 dneh .....</i>	29
<i>Slika 21: Allium test – prikaz vpliva ZnPT na rast korenin v 3, 5 in 7 dneh. ....</i>	30
<i>Slika 22: Rast čebulic pod vplivom ZnPT po 3.dneh (A, D, G), 5.dneh (B, E, H) in 7.dneh (C, F, I) v primerjavi s kontrolo. Kontrolne čebulice so v spodnji vrstici (slike G, H in E), zgornje slike (A, B, C) so čebule, izpostavljene najnižji koncentraciji ZnPt (C6 = 1 nM) ter vmesne (D; E in F) čebule, izpostavljene najvišji koncentraciji ZnPT (C1 = 100 µM). ....</i>	31
<i>Slika 23: Lipidium test – kaljenje vrtno kreše po 48h .....</i>	32
<i>Slika 24: Lipidium test – kaljenje vrtno kreše po 72h .....</i>	33
<i>Slika 25: Kalitev vrtno kreše pod vplivom ZnPT (C1 ali C6) po 48 in 72h urah v fotografijah ....</i>	34
<i>Slika 26: Štetje negibnih Daphnia bolhic po 24 urah .....</i>	35
<i>Slika 27: Daphnia test – odstotek preživetja vodnih bolhic .....</i>	36

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Fizikalno - kemijske lastnosti ZnPT (Medmrežje 3; medmrežje 4).....	43
<b>Preglednica 2:</b> Založna in delovne raztopine ZnPT z vsebnostjo DMSO .....	16
<b>Preglednica 3:</b> Šamponi, najdeni na slovenskih spletnih mestih, ki so vsebovali ali vsebujejo ZnPT.....	20
<b>Preglednica 4:</b> Prikaz števila v % individualne starostne skupine anketirancev .....	22
<b>Preglednica 5:</b> Prikaz števila v %, kako pogosto si anketiranci umivajo lase tedensko .....	22
<b>Preglednica 6:</b> Prikaz števila uporabljenih izdelkov za nego las v %.....	22
<b>Preglednica 7:</b> Prikaz odgovorov na vprašanje: »Ali zaradi zgoraj omenjenih težav uporabljate določen šampon? Kateri?« .....	25
<b>Preglednica 8:</b> Količina kemikalij, za katere anketiranci sklepajo, da so v povprečju vsebovani v večini šamponov, v % .....	26
<b>Preglednica 9:</b> Odstotek preživetja vodnih bolh po 24- in 48-urni izpostavitvi ZnPT .....	35

# 1 UVOD

Dandanes so socialna omrežja postala pogosto uporabljena med večino populacije na Zemlji, preko katerih se izmenjujejo novice oziroma informacije ne le o življenjskih slogih, temveč tudi o uporabi raznih izdelkov. Med temi izdelki so pogosto omenjeni izdelki za osebno nego oziroma kozmetični izdelki, ki jih potrošniki pogosto uporabljamo kot zaupanja vredne in popularne. Izdelki za osebno nego in kozmetični izdelki so zmesi kemikalij, med katerimi poznamo tiste, ki so dokazano varne za uporabo, v poplavi vseh izdelkov in kemikalij pa seveda lahko najdemo tudi tiste, ki predstavljajo tveganje za zdravje ljudi, pa tudi za okolje.

Sicer se zakonodaja na področju kozmetike v zadnjih letih zaostruje oziroma izboljšuje v prid uporabnika, a še vedno lahko zasledimo v določenih skupinah izdelkov tudi nezaželene kemikalije oz. kemikalije, katerih uporabo že povezujemo z nekim tveganjem za zdravje ljudi ali okolja. Na splošno je lahko vsebnost določene kemikalije v kozmetičnih izdelkih prepovedana, lahko je omejena glede na koncentracijo v posameznih izdelkih, lahko pa je postopek omejevanja uporabe kemikalije še v postopkih ocenjevanja. *Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih* (UL L 342 22.12.2009, str. 59) je glavni zakonodajni okvir za kozmetične izdelke, ki so dani na trg v Evropski uniji. Ta uredba uvaja pravila, s katerimi morajo biti skladni vsi kozmetični izdelki, dostopni na trgu, da se zagotovi delovanje notranjega trga in visoka raven varovanja zdravja ljudi.

Ena od mnogih uporabljenih kemikalij v industriji za osebno nego je tudi cinkov piriton (ZnPT). Ta sintetična kemikalija se je do nedavnega uporabljala kot glavna učinkovina za več vrst kožnih težav – dermatitis, prhljaj, luskavico (psorijaza), ekceme, lišaje, glivice, suho kožo, atopijski dermatitis itd. Poleg pogoste uporabe v kozmetiki se je ZnPT aktivno uporabljal tudi kot barvilo za zunanjo uporabo za zaščito pred plesnijo in algami, saj je njegova topnost v vodi zelo nizka. Ker se ZnPT pod vplivom ultravijoličnih žarkov zelo počasi razgrajuje, se je pogosto uporabljal tudi za ladijske premaze, saj je premaz zdržal več let. Z leti so različne študije pokazale na toksični potencial ZnPT, zato se njegova uporaba v EU postopoma omejuje oz. celo prepoveduje (Medmrežje 1).

## 1.1 Namen in cilji

Namen diplomskega dela je bil preučiti uporabo cinkovega piritona (ZnPT) v izdelkih za osebno nego in kozmetiki, s poudarkom na izdelkih za nego las, ter oceniti njegovo potencialno toksičnost.

Specifični cilji diplomskega dela so bili:

- ugotoviti, ali oz. kako pogosto lahko ZnPT še najdemo v izdelkih za nego lasišča;
- preveriti pogostost uporabe specifičnih izdelkov za nego las ter ovrednotiti potencialno uporabo ZnPT;
- preveriti ozaveščenost uporabnikov glede prisotnosti in pomena ZnPT in kemikalij v izdelkih za nego las;
- z različnimi eksperimentalnimi *in vitro* pristopi preučiti njegov toksični potencial, predvsem na vodna okolja.

## 1.2 Hipotezi

Pred pričetkom dela smo si postavili dve delovni hipotezi:

**H1:** Cinkovega piritiona v izdelkih za nego las ne najdemo več pogosto in je prisoten v manj kot 20 % vseh pregledanih izdelkov, ki so v uporabi.

**H2:** Cinkov piriton povzroča akutne toksične učinke na izbranih testnih organizmih in njegov vpliv s koncentracijo narašča.

## 2 CINKOV PIRITION

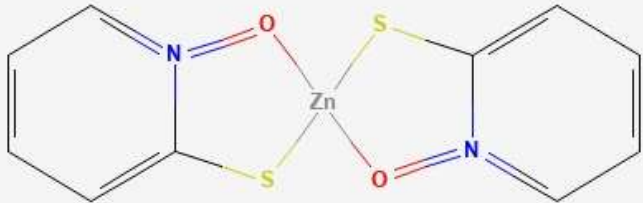

Cinkov pirition (v nadaljevanju ZnPT) je sintetična kemikalija, ki se uporablja že od tridesetih let prejšnjega stoletja. Prvotno se je uporabljal kot antibakterijsko in protiglivično sredstvo, najpogosteje v povezavi s kožnimi težavami oz. boleznimi ljudi. Njegova primarna nemedicinska uporaba pa je kot sestavina zunanjih barv za zaščito pred plesnijo in algami (Med mrežje 2).

Kemijsko je ZnPT kompleks, sestavljen iz cinkovih (2+) ionov in piritionskih ligandov. Ligandi so vezani na cinkove ione prek kisikovih in žveplovih središč. Značilnost ZnPT je, da v trdnem agregatnem stanju tvori simetrični dimer. To pomeni, da sta v kompleksu povezani dve enaki molekuli (Drugbank). V naravi ga najpogosteje najdemo kot mineral sfalerit (Pubchem). Fizikalno-kemijske lastnosti ZnPT so podane v Preglednici 1.

Pokazano iz več študij ima ZnPT še eno pomembno fizikalno-kemijsko lastnost. Ta lastnost je fotodegradacija. To pomeni, da se pri izpostavitvi UV-svetlobi prične relativno hitro razgrajevati (Dallas in sod., 2018) zaradi procesa, imenovanega fotoliza, z razpolovnim časom  $8,3 \pm 0,9$  minut v umetni morski vodi (Marcheselli in sod., 2010).

ZnPT je nagnjen k fotodegradaciji še posebej takrat, kadar je izpostavljen valovnim dolžinam med 320 in 355 nanometri. Raziskave so pokazale, da ima ZnPT v sterilni morski vodi kratko razpolovno dobo, ki znaša le 7 do 8 minut, ko je izpostavljen sončni svetlobi, vendar pa lahko ostane stabilen tudi več kot 48 ur v temnih pogojih (Soon in sod., 2019). Globina morske vode prav tako vpliva na degradacijo ZnPT. ZnPT se hitreje razgrajuje na plitvejših globinah morske vode, pri čemer se razpolovna doba povečuje, ko se globina morske vode povečuje. Pri globini morske vode, večje od 2 metrov, ni bila opažena večja fotodegradacija, kar kaže, da ostane ZnPT stabilen pri večjih globinah, kjer je prodor sončne svetlobe omejen (Soon in sod., 2019).

Preglednica 1: Fizikalno - kemijske lastnosti ZnPT (Medmrežje 3; Medmrežje 4)

<b>FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI</b>	
Ime	Cinkov Pirition (ZnPT)
Molekularna formula	$C_{10}H_8N_2O_2S_2Zn$
Molska masa	317,7 g/mol
Videz	a) oblika: fini prah b) barva: bež
Vonj	Brez
Tališče	267 °C
Vrelišče	/ oz. razpade
Gostota	1,76 g/cm <sup>3</sup> pri 20,1 °C
Topnost v vodi	0,00493 g/l pri 20 °C
Kemijska struktura	 <p>Vir slike: PubChem (<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>)</p>
Piktogrami	 <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> akutna strupenost</li> <li><input type="checkbox"/> zelo strupeno (smrtno)</li> <li><input type="checkbox"/> strupeno</li> <li><input type="checkbox"/> snovi, ki so jedke za kovine</li> <li><input type="checkbox"/> jedko (povzroca hude opekline kože in poškodbe oči)</li> <li><input type="checkbox"/> hude poškodbe oči</li> <li><input type="checkbox"/> okolju nevarno</li> <li><input type="checkbox"/> akutna strupenost za vodno okolje</li> <li><input type="checkbox"/> kronična strupenost za vodno okolje</li> <li><input type="checkbox"/> povzročitelj preobcutljivosti dihal</li> <li><input type="checkbox"/> mutageno</li> <li><input type="checkbox"/> rakotvorno</li> <li><input type="checkbox"/> strupeno za razmnoževanje</li> <li><input type="checkbox"/> strupeno za posamezne organe</li> <li><input type="checkbox"/> nevarnost pri vdihavanju</li> </ul>

## 2.1 ZnPT v kozmetiki

V kozmetični industriji se cink in njegove soli uporabljajo že dolgo časa in v različnih kategorijah izdelkov. V preteklosti je bil ena od najpogosteje uporabljenih cinkovih soli cinkov piriton, ki se je uporabljal že od leta 1930 (Pinto, 2021).

Cink, tako v elementarni obliki kot v oblikah soli, se že stoletja uporablja v terapevtske namene. Topični pripravki, kot so cinkov oksid, kalamín ali cinkov piriton (ZnPT), se uporabljajo kot pomirjujoča sredstva ali kot aktivna sestavina šamponov proti prhljaju (Gupta in sod., 2014). ZnPT pa se je zaradi svojih antibakterijskih, protimikrobnih in protiglivičnih lastnosti pogosto uporabljal za zdravljenje prhljaja, seboroičnega dermatitisa (vrste prhljaja), psoriaze (luskavice) ter kot negovalno sredstvo in kot konzervans v kozmetiki (Gallagher, 2020; Pinto, 2021).

### 2.1.1 Luskavica

Luskavica je pogosta, dolgotrajna (kronična) kožna bolezen, ki povzroča izpuščaje s srbečimi, luskastimi madeži, najpogosteje na kolenih, komolcih, trupu in lasišču (Medmrežje 5).

Cinkov piriton lahko deluje kot pozitivna učinkovina pri določenih vrstah dermatitisa in luskavici. Dokazali so, da je krema z 0,25-% vsebnostjo ZnPT lahko zelo učinkovita pri zdravljenju lokalizirane plakaste psoriaze. Izraz »lokalizirana plakasta psoriza« se nanaša na lise psoriaze, ki so omejene na določena področja kože. Ugodni učinki cinkovega piritona so bili pripisani njegovemu antiproliferativnemu delovanju. To pomeni, da je cinkov piriton lahko zaviral hitro rast in razmnoževanje kožnih celic, ki prispevajo k nastanku plakov psoriaze (Gupta in sod., 2014).

Študije so pokazale, da se v izdelkih za topični nanos, ki vsebujejo 0,25-% ZnPT, le-ta lahko uporablja kot učinkovina proti luskavici (Sadeghian in sod., 2011).

### 2.1.2 Prhljaj

Prhljaj je stanje kože, ki predvsem vpliva na lasišče. Simptomi prhljaja so luščenje povrhnje kože in včasih blago srbenje. Hujša oblika tega stanja se imenuje seboroični dermatitis (Medmrežje 6) in pomeni kronično obliko ekcema. Vključuje vnetje kože in je pogosto povezan z rdečico, srbenjem in mastnimi ali luskastimi madeži na lasišču, obrazu in drugih delih telesa (Medmrežje 7).

ZnPT lahko zavira rast kvasovk, ki so glavni dejavnik prhljaja. Zato ga najdemo v mnogih šamponih, ki so namenjeni negi lasišča s prhljajem, saj ima protiglivično, protibakterijsko in protimikrobno delovanje, kar pomeni, da lahko uniči glivice, bakterije in mikroorganizme, ki prispevajo k srbečemu in luskastemu lasišču (Medmrežje 8).

Študije so pokazale, da ima ZnPT negovalni učinek proti prhljaju. Že v študiji leta 1985 se je pokazalo postopno zmanjševanje prhljaja na strani lasišča, kjer se je uporabljal šampon z vsebovanim cinkovim piritonom v koncentraciji 1 %, v primerjavi z drugo stranjo lasišča, kjer so uporabljali placebo šampon (brez ZnPT) (Marks in sod., 1985). Prav tako so v raziskavi Gupta in sod. (2014) ugotovili, da cinkov piriton v šamponih s koncentracijo 1 % omogoča zdravljenje seboroičnega dermatitisa, saj ima citotoksično delovanje (substancia ali proces, ki deluje toksično na celico – zaviranje rast) na vrste kvasovke (*Pityriasis versicolor*), ki so povezane s prhljajem, ter pomaga pri lažšanju simptomov. Poleg tega je ZnPT pokazal, da preprečuje ponavljajoče težave, povezane s prhljajem, kot so luščenje, srbenje in draženje (Gupta in sod., 2014).

Izkazalo se je, da ima cinkov piriton prav tako pozitivne učinke na vrsto kvasovke *Malassezia*, ki se pogosto pojavljajo pri težavah s prhljajem in seboroičnim dermatitisom. Učinkovit je predvsem, če se ga nanese direktno na točno določena mesta kože, kjer te kvasovke prebivajo, kot so površina lasišča in lasni mešički (Mangion in sod., 2021).

## 2.2 ZnPT in zakonodaja

ZnPT je dokazan kot človeku dobra učinkovina za specifične vrste kožnih težav. Vendar se je z leti njegova uporaba v kozmetični industriji zmanjševala v skladu z EU zakonodajo. V skladu z *Uredbo (ES) št. 1223/2009* je bila sprva uporaba ZnPT omejena; dokončno pa se je uporaba omejila tudi na podlagi *Uredbe EU št. 2021/1902*, ko se je njegova uporaba po marcu 2022 v kozmetičnih izdelkih prepovedala (Slika 1).

V Evropski uniji (EU) se je pričelo razvijanje zakonodaje na področju kemikalij okoli leta 1960, kjer je skupnost sprejela direktivo o klasifikaciji, pakiranju in označevanju nevarnih spojin ter nadgradila poudarek na sami nevarnosti kemikalij. Nato je bila leta 2007 sprejeta *Uredba (ES) št. 1907/2006 – Registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij (REACH)* za izboljšanje zakonodajnega okvira o kemikalijah EU (Štumberger, 2010) (REACH). Cilji Uredbe REACH so izboljšanje varovanja zdravja ljudi in okolja pred tveganji kemikalij, okrepitev konkurenčnosti kemijske industrije EU in spodbujanje alternativnih metod za oceno nevarnosti snovi, da bi se zmanjšalo število testiranj na živalih (ECHA).

Nedolgo po sprejetju REACH se je sprejela tudi *Uredba št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih (Uredba 1223/2009)*, ki med drugim dovoljuje, omejuje ali prepoveduje uporabo določenih kemikalij v kozmetičnih izdelkih. Glede ZnPT je *Uredba št. 1223/2009* leta 2009 najprej zastavila omejitve kemikalije ZnPT v kozmetičnih izdelkih. Dovoljene vrednosti so bile največ 1 % samo za izdelke, ki se izperejo, kot je šampon za lase. V ostalih izdelkih, ki se ne uporabljajo za usta, pa največ 0,5 %. V izdelkih, ki so namenjeni lasem in se jih ne odstranjuje, pa je dovoljen le 0,1 % te sestavine (Regulation (EC) No 1223/2009, Medmrežje 9).

Leta 2014 pa vse do 2018 je SCCS (angl. *Scientific Committee on Consumer Safety*) zagovarjal mnenje, da je ZnPT v koncentracijah vse do 2 % v izdelkih za nego las za izpiranje varen za uporabo kot sredstvo proti prhljaju. Dne 14. septembra 2018 pa je Odbor za oceno tveganj pri ECHA sprejel mnenje, v katerem je predlagal usklajeno razvrstitev in označevanje ZnPT kot snovi CMR (Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic) pod kategorijo 1B, ki ponazarja kemične snovi, za katere obstajajo znanstveni dokazi na živalih, da so rakotvorne, mutagene ali strupene za razmnoževanje na ravni EU v skladu z *Uredbo (ES) št. 1272/2008*. Skladno z uredbo EU o kozmetiki (*Uredba (ES) št. 1223/2009*) je uporaba snovi CMR v kozmetičnih izdelkih prepovedana, razen če so izpolnjeni določeni pogoji, vključno s pogoji, da ni na voljo ustrezne alternative (kot je dokumentirano v analizi alternativ) in da je bila snov ocenjena in ugotovljena kot varna s strani SCCS (Pinto, 2021; Medmrežje 9).



Hvastja, Š.: Prisotnost cinkovega piritiona in ugotavljanje njegove potencialne toksičnosti, VVO, Velenje 2023

Dne 29. oktobra 2021 je bila objavljena *Uredba Komisije (EU) 2021/1902* v Uradnem listu Evropske unije, ki je vključevala spremembe v Prilogi II, III in V Evropske uredbe o kozmetiki (št. 1223/2009). Te spremembe so privedle do izbrisa cinkovega piritiona iz Priloge III in Priloge V, kjer je bil dovoljen kot konzervans v nekaterih kozmetičnih izdelkih, vključno z izdelki za nego las. SCCS je sicer potrdil njegovo varnost, vendar ni bilo dokazano, da ni na voljo ustreznih alternativ za izdelek proti prhljaju v izpiralnih izdelkih za lase. Ker je bil ZnPT dodan na seznam snovi, ki so prepovedane v kozmetičnih izdelkih, je od 1. marca 2022 dalje ZnPT prepovedano uporabljati v kozmetičnih izdelkih, ki so na voljo na trgu EU (Pinto, 2021; Medmrežje 10).

The screenshot shows the ECHA website interface. At the top, there is a navigation bar with the ECHA logo and menu items: 'O nas', 'Kontakt', 'Delovna mesta', and a search box. Below the navigation bar are four main categories: 'ZAKONODAJA', 'POSVETOVANJA', 'INFORMACIJE O KEMIKALIJAH', and 'PODPORA'. The 'INFORMACIJE O KEMIKALIJAH' category is selected, leading to a page titled 'Cosmetic Products Regulation, Annex II - Prohibited Substances'. The page includes a breadcrumb trail: 'ECHA > Informacije o kemikalijah > EUCLEF > Cosmetic Products Regulation, Annex II - Prohibited Substances'. Below the title, there is a section for 'RELEVANT LEGISLATION' with a link to 'Cosmetic Products Regulation'. A paragraph states: 'This list contains substances which are banned from use in any cosmetic products marketed for sale or use in the European Union.' The main content area features a table for 'Pyrithione zinc' with the following details: EC / List no: 236-671-3, CAS no: 13463-41-7. A table below provides further specifications:

	Ref No.	1670
	Product type, body parts	All cosmetic products
	Maximum Threshold	0 %
	Notes	Applies from 1 March 2022

Slika 1: Cinkov pirition (ZnPT) kot prepovedana substanca na seznamu ECHA (Medmrežje 11)

## 2.3 Vplivi ZnPT na zdravje okolja

Poznano je, da je cinkov pirition vsestranska kemikalija, ki ni samo sestavni del raznih šamponov proti prhljaju, ki se po uporabi izpirajo v odtok oz. komunalne odpadne vode. Hkrati se uporablja v drugih izdelkih, med katerimi so tudi barve za preprečevanje nastanka oblog oziroma organizmov na površinah, ki so izpostavljene vodi, npr. na ladjah. Med te obloge sodijo alge, bakterije, glive in školjke.

Zaradi te izpostavitve vodnim okoljem pa obstajajo skrbi glede vpliva ZnPT na okolje.

Ker se ZnPT še zmeraj v veliki meri uporablja v kozmetični industriji v ZDA, so količine te kemikalije, ki odteka iz gospodinjstev ali drugih dejavnosti do čistilnih naprav lahko velike in posledično vplivajo na mikroorganizme v čistilnem sistemu (Bays in sod., 2020). Zato so s študijo pokazali, da ZnPT v čistilnih napravah (ČN) ne predstavlja večjega bremena za delovanje sistemov čiščenja, saj se preden doseže mikroorganizme (MO), za katere je nevaren, že večji delež razgradi v neznane spojine ter v okolje preide le v majhnem deležu (2,3–5,9 %) (Bays in sod., 2020).

Bolj problematičen pri izpostavitvi vodnemu okolju je direkten prenos kemikalije prek raznih premazov, barv, oblačil, čistil ipd. V sladkovodnem okolju se ZnPT sicer hitreje razgradi in je posledično tveganje manjše, je pa zato slanovodno okolje toliko bolj na udaru (Bays in sod., 2020).

Čeprav v ČN morda res ni večjih tveganj za škodo MO, se je treba zavedati vpliva ZnPT na žive organizme v ekosistemu, ki niso konstantno pod nadzorom človeka, in kako lahko to nanje vpliva. V študiji so raziskali vpliv ZnPT na imunske celice podgan, ko so izpostavljene tej kemikaliji, in vpliv ZnPT, ko so podgane izpostavljene oksidativnemu stresu. Oksidativni stres je biološki proces, ki se pojavi v telesu, ko prevladujejo prosti radikali oziroma nestabilne molekule, ki lahko poškodujejo druge celice, beljakovine, maščobe in celo DNK. Običajno so prosti radikali uravnoteženi z antioksidanti oziroma molekulami, ki lahko nevtralizirajo proste radikale (Oyama in sod., 2012). Rezultati so pokazali, da podgane, ki so bile v nevtralnem stanju izpostavljene nizki koncentraciji (3  $\mu\text{M}$ ) ZnPT, niso pokazale citotoksičnega učinka, kar pomeni, da kemikalija ni povzročila škode ali smrti celic podgan. Za nastanek oksidativnega stresa pri podganah so uporabili kemikalijo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (vodikov peroksid). Pri podganah z oksidativnim stresom, ki so bile izpostavljene še nanomolarnim koncentracijam (10 nM ali več) ZnPT, pa so rezultati pokazali povečano smrtnost imunskih celic. V tem primeru lahko govorimo o sinergičnem učinku. To pomeni, da je bil njihov skupen vpliv na celice večji, torej postane ZnPT bolj strupen v kombinaciji s kemikalijami, kot je  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ki povzročajo oksidativni stres. Ti rezultati nam povedo, da ima lahko ZnPT, ki se izloča iz ladijskih premazov ali drugih virov citotoksične vplive na vodno okolje, še posebej, ko je med organizmi prisoten oksidativni stres (Oyama in sod., 2012).

V študiji Bao in sod. (2014) so zaznali podobne sinergične lastnosti ZnPT. Tokrat so raziskovali hkratno prisotnosti ZnPT in bakra (Cu), saj se njuna kombinacija pogosto uporablja na trupih ladjih v obliki premazov za preprečevanje rasti organizmov, kot so alge in školjke. Za testne organizme so izbrali ceponožne rake (*Tigriopus japonicus*), saj so del ekosistema v obalnem morskem okolju, kjer je prav tako večja uporaba premazov proti obraščanju. Izvedena sta bila akutni in kronični test na omenjenih morskih organizmih, kjer so rezultati pokazali močne sinergične toksične učinke. Že nizke koncentracije Cu v prisotnosti ZnPT so pokazale dramatično povečano smrtnost organizmov. Rezultati kronične izpostavljenosti so pokazali, da lahko kombinacija ZnPT in Cu povzroča hude poškodbe ceponožnih rakov, vključno s povečano smrtnostjo ličink in z zamikom v razvoju. Ta sinergija je delno posledica reakcije med Cu in ZnPT, kjer nastane bakrov pirition (CuPT), ta pa ima bolj strupene lastnosti od ZnPT (Bao in sod., 2014).

Poleg uporabe premazov za ladje proti obraščanju v morskem okolju se ti premazi prav tako uporabljajo na plovilih, izpostavljenih sladkovodnim okoljem, kot so reke in jezera. Taka vodna okolja so habitat mnogih organizmov, med katerimi je tudi riba zebrica (*Danio rerio*), ki je bila uporabljena v raziskavi Zhao in sod. leta 2020. V raziskavi so ugotavljali, ali ZnPT vpliva na delovanje jeter rib zebric, ki so bile izpostavljene kemikaliji tri tedne. Jetra so pomemben del organizma, ki vsebujejo metabolite oziroma molekule, ki sodelujejo v različnih presnovnih procesih. Ti procesi omogočajo razstrupljanje škodljivih snovi, presnovo hranil (ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin) za proizvodnjo energije in za proizvodnjo žolča, ki pa pomaga pri prebavi. Ugotovitve so razkrile pomembne spremembe v presnovi jeter, izpostavljenih ZnPT, pri čemer so zaznali spremembe pri 172 snoveh v jetrih. Nastala škoda se je prav tako odražala v tem, kako so jetra obdelovala sladkorje in energijo. Pomemben del raziskave je pokazal, da se je negativen vpliv razlikoval glede na spol ribe zebrice, saj so bila jetra samcev bolj prizadeta od samic. Ti rezultati sprememb kažejo, da ZnPT lahko potencialno moti normalne presnovne procese vodnih organizmov (Zhao in sod., 2020).

Soon in sod. (2019) so v svoji raziskavi potrdili, da se ZnPT na sončni svetlobi, ki oddaja UV-žarke, razgrajuje. Omenjajo tudi, da se lahko ZnPT kemično preoblikuje v prisotnosti drugih kovinskih ionov in je deležen procesov biodegradacije in hidrolize. Biodegradacija in hidroliza sta biološka in kemična procesa, pri katerih se ZnPT lahko razgradi, pri tem pa nastajajo različni metaboliti. Ti metaboliti so nove spojine s svojimi lastnostmi, te lastnosti pa so lahko toksične ali stabilne. Čeprav ima ZnPT v odvisnosti od globine in motnosti vodnega okolja možnost razgradnje, se v nasprotnem primeru lahko nabira v vodnih stolpcih ali sedimentih, če se nahaja v globini ali pa je vodno telo motno do te mere, da UV-žarki ne prodirajo dovolj globoko. Znano je, da ZnPT deluje toksično na širok spekter morskih organizmov, vključno z algami, školjkami, morskimi ježki, mnogoščetinci, rakci in ribami, saj se vplivi kažejo že pri zelo nizkih (mikro) koncentracijah (Soon in sod., 2019).

Je pa treba upoštevati, da se organizmi med seboj drastično razlikujejo in s tem ZnPT ne predstavlja vsem organizmom enako velikega tveganja. V raziskavi Nunes in sod. (2015) so testirali vpliv ZnPT na ribo gambuzijo (*Gambusia holbrooki*) po kratki izpostavljenosti (96 ur). Izkazalo se je, da je ZnPT vplival na spremembe tkiv v jetrih in škrgah ribe, ampak so bile te spremembe vse reverzibilne. Prav tako nakazuje, da oksidativni stres morda ni glavni toksični učinek izpostavljenosti kemikaliji ZnPT (Nunes in sod., 2015).

Prav zato so potrebne še nadaljnje natančne raziskave za celovito razumevanje tveganja ZnPT za organizme, predvsem pa za vodne organizme, ki so lahko večkrat izpostavljeni izdelkom z vsebnostjo ZnPT. Kot pravijo študije, je treba razumeti toksične mehanizme ZnPT in oceniti učinke kemikalije, ki ima vpliv na različne organizme v realnih pogojih. Zaradi uporabe ZnPT v premazih, izdelkih za osebno nego in drugih virov lahko uporaba teh produktov neposredno prenese kemikalijo v vodna okolja, kar predstavlja skrb ter ekotoksikološke učinke za vodne ekosisteme (Nunes in sod., 2015).

## 2.4 Vplivi ZnPT na zdravje ljudi

Cink je mikroelement, ki je ključen za različne funkcije kože, vključno z vzdrževanjem zaščitne kožne pregrade, regulacijo vnetnih in protimikrobnih odzivov ter spodbujanjem celjenja ran (Lamore in sod., 2011). Cinkov piriton se pogosto uporablja v različnih izdelkih za zdravstveno in kozmetično nego kože kot učinkovina proti nekaterim težavam, kot sta luskavica in prhljaj. Čeprav se široko uporablja in velja za koristnega pri težavah s kožo, imamo še vedno omejeno znanje o njegovi morebitni toksičnosti za kožne celice.

Pri dermalni izpostavitvi človeških kožnih celic so se na limfocitih (vrsti belih krvničk) izkazali toksični učinki. Najvišja koncentracija 1000 nM prisotnega ZnPT je povzročila rahlo draženje, a pri isti koncentraciji ni bilo zaznanih genotoksičnih učinkov (poškodbe genetskega materiala) ali vplivov na proces, v katerem se celice razmnožujejo ali delijo (proliferacija). Pri koncentraciji nad 500 nM je bilo opaznih več učinkov. Opazili so povečanje sproščanja encima (laktat dehidrogenaze), kar lahko nakazuje na poškodbo celic, saj se ta encim sprošča iz poškodovanih celic. Opazni so bili tudi oksidativni stres, zmanjšana življenjska doba celic, počasnejša delitev celic (zmanjšan mitotski indeks) in zaznali so kopičenje prekomerne količine cinka znotraj celic, kar jih lahko poškoduje ali celo uniči, moti delovanje encimov, povzroči oksidativni stres, moti prenašanje signalov do celic ter lahko zavira imunski sistem. Te ugotovitve nakazujejo, da ZnPT lahko povzroči toksične učinke na človeške celice, še posebej v višjih koncentracijah (Güner in sod., 2020).

V študiji Rudolf in sod. (2011), kjer so ugotavljali učinke ZnPT na fibroblaste (vrsto kožnih celic), so prišli do podobnih ugotovitev. Po 24-urni izpostavljenosti se je pokazalo, da pri višjih koncentracijah ZnPT (500 nM in več) sproži oksidativni stres, zaznali so poškodbe DNK in kot odgovor na stres so se aktivirale poti celic, ki so del obrambnega mehanizma. Ti učinki pa lahko vodijo v celično smrt. Pri nižji uporabljeni koncentraciji (125 nM) pa so opazili, da ni povzročila oksidativnega stresa ali poškodb DNK, a je imela vpliv na prezgodnje staranje celic. Na podlagi te študije lahko trdimo, da izpostavljenost določene vrste kožnih celic (fibroblastov) različnim koncentracijam ZnPT lahko privede do celične smrti ali prezgodnjega staranja celic (Rudolf in sod., 2011).

Človeška koža je sestavljena iz več plasti. Zunanji sloj človeške kože – povrhnjica (epidermis) ima ključno vlogo kot zaščitna pregrada pred različnimi okoljskimi dejavniki, med katere spadajo tudi kemični, fizični in biološki dejavniki (Lamore in sod., 2009). V študiji so ugotovili, da že zelo nizke koncentracije ZnPT (nanomolarno območje) povzročijo visoko stopnjo občutljivosti človeških kožnih celic keratinocitov in melanocitov. To pomeni, da ZnPT sproži močan odziv toplotnega stresa, zaradi česar se geni, povezani s proteini toplotnega stresa, aktivirajo in se odzivajo na celični stres. Rezultati prav tako kažejo, da je ZnPT zmožen prodiranja skozi kožo sesalcev, pri čemer v študiji postavljajo vprašanje, ali lahko topična uporaba ZnPT dejansko deluje na in poškoduje kožne celice (Lamore in sod., 2009)

Raziskava Holmesa in sod. (2018) je preučevala vpliv ZnPT po topičnem nanosu na človeško kožo po 24 in 48 urah. Ugotovili so, da se je po nanosu ZnPT na kožo po 24 urah koncentracija cinka (Zn) v povrhnjici znatno povešala (za 3,8-krat) v primerjavi z nanosom brez ZnPT. Po 48 urah uporabe se je koncentracija povešala za kar 250-krat. Pokazali so, da je ZnPT motil normalno ravnovesje cinka v celicah kože, kar pa povzroča toksičnost celic. To pomeni, da ima lahko prekomerna koncentracija cinka v koži škodljive učinke (Holmes in sod., 2018).

V nasprotnem primeru, v raziskavi Hwanga in sod. (2021), kjer je bil uporabljen testni model kože KeraSkin™, pa so ugotovili, da pri koncentraciji 0,01 % ZnPT niso uspeli dokazati strupenosti in je povzročal le blago razdraženost kože (Hwang in sod., 2021). Poleg topičnega učinka na kožo so raziskali vpliv ZnPT na respiratorni sistem s pomočjo testnega modela SoluAirway™. Ugotovili so, da je ZnPT zelo strupen pri koncentraciji 0,01 %, če ga vdihavamo (Hwang in sod., 2021).

Kot opredeljuje ECHA, je ZnPT kot kemikalija smrtonosna za vdihavanje, strupena ob zaužitju, lahko škoduje nerojenemu otroku, povzroča poškodbe organov ob dolgotrajni ali ponavljajoči se izpostavljenosti, je zelo strupena za vodne organizme, ima dolgotrajne zelo strupene učinke na vodne organizme in povzroča resne poškodbe oči (Medmrežje 8).

Torej, če na podlagi opisanih študij povzamemo rezultate vpliva ZnPT na zdravje, lahko trdimo, da ima ZnPT škodljive učinke na človeške kožne celice pri koncentracijah, ki se gibajo v nanomolarnem območju. Prav tako ima kemikalija toksičen učinek na respiratorni sistem ob vdihavanju že pri 0,01-% deležu, kar je manj od dovoljene količine v izdelkih za osebno nego v času pred prepovedjo leta 2022. Čeprav obstaja nekaj raziskav, ki nakazujejo potencialno toksičnost ZnPT za človeško kožo, bo v prihodnosti treba izvesti še več raziskav o toksičnih učinkih kemikalije tako na človeško zdravje kot tudi na okolje.

### 3 MATERIALI IN METODE

Praktični del diplomskega dela je sestavljen iz dveh delov.

V prvem delu smo s terensko analizo preverili, ali oz. koliko se izdelki z vsebnostjo ZnPT še uporabljajo oz. ali so izdelki z vsebnostjo ZnPT (še) prisotni na našem trgu. Med naključnimi uporabniki smo preverili tudi njihove navade glede nege las, poskusili ovrednotiti potencialno uporabo ZnPT ter ugotavljali njihovo ozaveščenost glede vsebnosti kemikalij v izdelkih za nego las (3.1.).

V drugem eksperimentalnem delu pa smo potencialni toksični učinek molekule preverili s tremi različnimi *in vitro* testi: s testom akutne toksičnosti na vodnih bolhah (*Daphnia magna*) ter z ekotoksikološkima testoma – s čebulnim testom (*Allium cepa L.*) in kalitvenim testom vrtnice (*Lepidium sativum*) (3.2.).

#### 3.1 Terenska analiza izdelkov za nego lasišča

Terenska analiza je zajemala pregled izdelkov z vsebnostjo ZnPT na trgu, s poudarkom na izdelkih za psoriaro in proti prhljaju. Pregledali smo nekaj naključnih izdelkov na trgovskih policah ter pregledali dostopne podatke na spletnih straneh izbranih dobaviteljev izdelkov za nego las.

Terenski anketi smo dodali še kratek anketni vprašalnik (Priloga 1), ki je vseboval 10 vprašanj, in smo ga pripravili v obliki spletnega obrazca Google. Anketni obrazec je bil aktiven 3 mesece in smo ga naključno delili prek družbenih omrežjih in elektronskih sporočil. Namenjen je bil predvsem pridobivanju podatkov o navadah in uporabi izdelkov za nego las ter podatkov glede težav z lasmi/lasiščem in posledično težav z uporabo specifičnih izdelkov za njihovo nego.

#### 3.2 *In vitro* ocena potencialne toksičnosti ZnPT

Eksperimentalno delo je v večini potekalo v laboratoriju Fakultete za varstvo okolja. Test na vodnih bolhah pa smo zaradi razpoložljivosti opreme in materiala izvedli v podjetju Gorenje, d. o. o. Pri delu smo vseskozi uporabljali obvezno zaščitno opremo (haljo, rokavice, očala) ter s potencialno nevarnimi ali hlapnimi kemikalijami rokovali v brezprašni komori (digestoriju).

##### Pripomočki:

- mini magnetno mešalo IKA
- precizna tehtnica KERN PCB350
- čaše (100–1000 ml)
- steklenice (1000 ml)
- merilni valji (10–500 ml)
- merilna bučka z zamaškom (100–250 mL)
- kapalke
- folija
- avtomatske pipete (10 µl–10 ml)
- ravnilo
- pinceta
- spatula
- steklene epruvete
- stojalo za epruvete
- plastične in steklene petrijevke

- filter papir
- škarje
- pladenj
- nož
- alkoholni flumaster



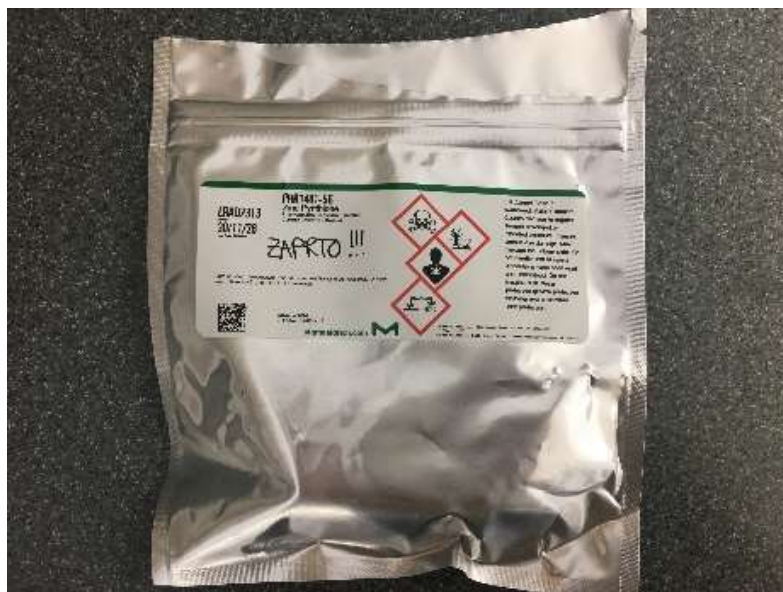
Slika 2: Pripomočki za pripravo raztopin



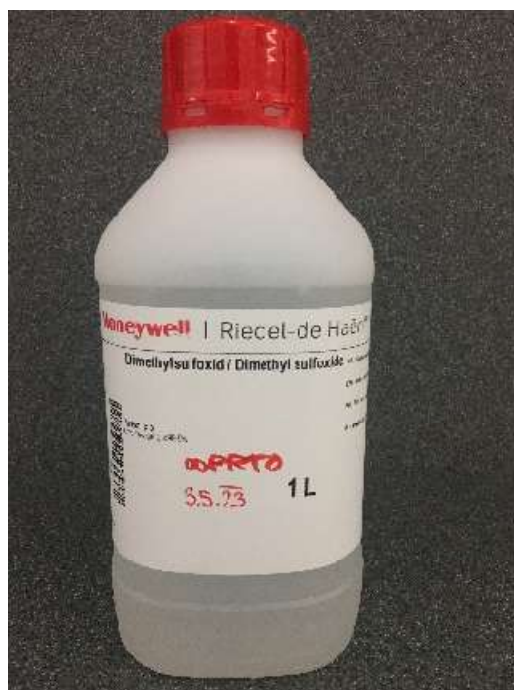
Slika 3: Pripomočki za izvedbo Allium testa

**Kemikalije:**

- cinkov pirition, ZnPT (Sigma Aldrich M, PHR1401)
- dimetilsulfoksid, DMSO (Honeywell, 41640)
- klorovodikova kislina, HCl (Sigma Aldrich, 30721)
- kromatna raztopina  $K_2Cr_2O_7$
- deionizirana voda
- razredčevalna voda (demi voda, vpihan kisik, dodane določeni minerali, Gorenje, d. o. o.)



Slika 4: Cinkov pirition v prvotni embalaži



Slika 5: DMSO v prvotni embalaži



### 3.2.1 Priprava raztopin ZnPT

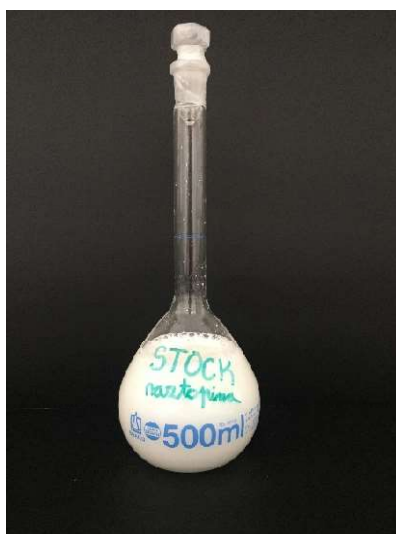
ZnPT je bil kupljen kot čista kemikalija v obliki belega prahu. Zaradi omejene topnosti v vodi smo založno (stock) koncentracijo 10 mM pripravili v 100 % DMSO in topnost zagotovili s konstantnim mešanjem na magnetnem mešalu cca 2–3 ure. Bučko smo imeli ves čas ovito v folijo, saj je ZnPT fotosenzibilen in razpada na svetlobi.

Nato smo založno raztopino redčili v deionizirani vodi (dH<sub>2</sub>O) do končnih delovnih koncentracij ZnPT:

- C1 – 100  $\mu$ M
- C2 – 10  $\mu$ M
- C3 – 1  $\mu$ M
- C4 – 100 nM
- C5 – 10 nM
- C6 – 1 nM



Slika 6: Vseh 9 pripravljenih raztopin ZnPT (zavite v folijo)



Slika 7: Založna (stock) raztopina v bučki

Volumne in koncentracije smo preračunali tako, da končna koncentracija DMSO v eksperimentih ni presegala vrednosti 0,1 % (Preglednica 2). Pri pripravi delovnih raztopin smo raztopine mešali na magnetnem mešalu v digestoriju. Ob redčenju v dH<sub>2</sub>O je raztopina postajala rahlo bele in mlečne barve. Raztopine smo pripravljali počasi in previdno (po kapljicah), da se polarnost raztopine ni prehitro spremenila in je bilo posledično oborine manj. Vse raztopine smo imeli ves čas zavite v folijo. Kontrolo je predstavljala raztopina 0,1 % DMSO v dH<sub>2</sub>O, kot negativno kontrolo smo uporabili 100 % dH<sub>2</sub>O, kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili 10 % 0,1 M HCl.

Preglednica 2: Založna in delovne raztopine ZnPT z vsebnostjo DMSO

	ZnPT		% DMSO
<b>založna C</b>	10	mM	10,59
<b>C1</b>	100	μM	0,1059
<b>C2</b>	10	μM	0,0106
<b>C3</b>	1	μM	0,0011
<b>C4</b>	100	nM	0,0001
<b>C5</b>	10	nM	0,00001
<b>C6</b>	1	nM	0,000001
<b>DMSO kontrola</b>	0		0,1059
<b>POZ kontrola</b>	0		0,0000
<b>NEG kontrola</b>	0		0,0000

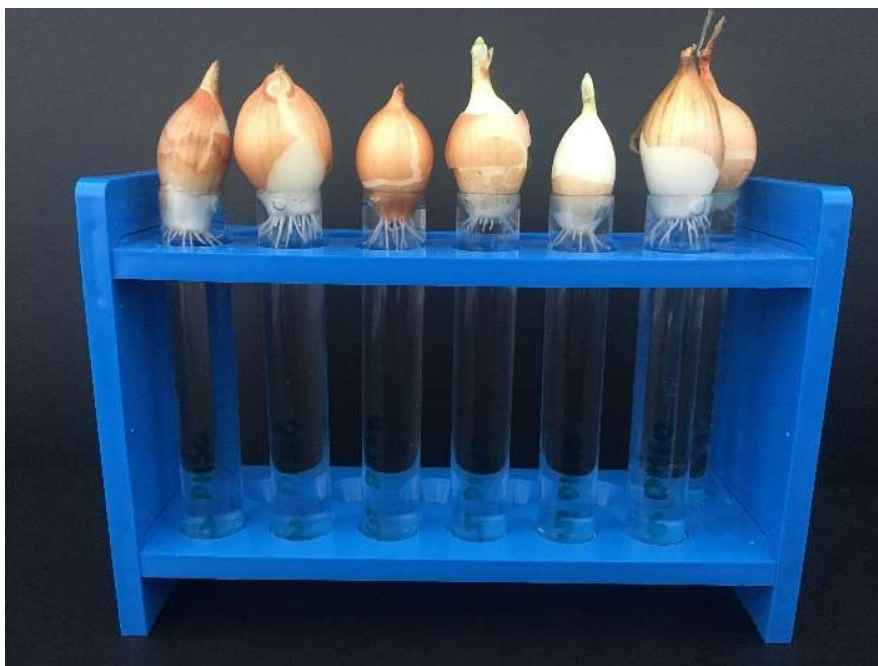
### 3.2.2 Čebulni test *Allium cepa* L. (Allium test)

Allium test smo izvedli z vsemi 6 koncentracijami ZnPT ter s tremi kontrolnimi raztopinami. Vsako koncentracijo sem testirali v 7 paralelkah.

Čebulicam smo na spodnjem olesenelem delu odrezali samo povrhnjico, a le toliko, da je bilo sveže tkivo tekom poskusa v neposrednem stiku z raztopino. Odstranili smo tudi zunanjo lupino. Pripravili smo stojala in epruvete, jih primerno označili ter napolnili z raztopinami različnih koncentracij. Spodnjo stran čebulice smo postavil na epruveto z odrezano stranjo v raztopini (Sliki 8 in 9).



Slika 8: Dan postavitve čebulnega testa (*Allium cepa* L.)



Slika 9: Rezultati čebulic po 24 urah namakanja v testni raztopini

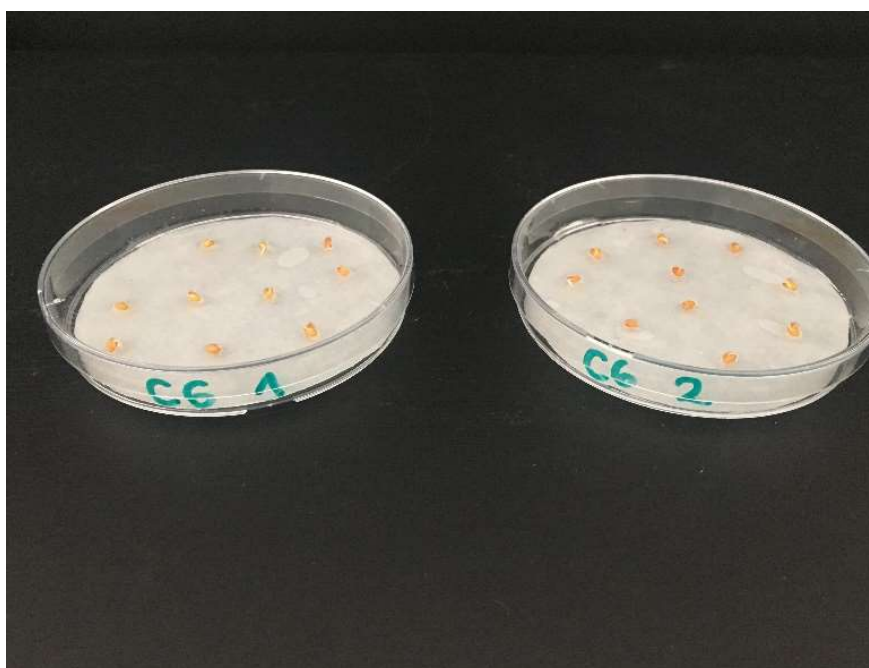
Test smo izvajali 7 dni s tremi meritvami; prvo meritev smo izvedli po treh dneh, drugo po petih in zadnjo po sedmih dneh. Pri vsaki paralelki smo z ravnilom izmerili po 10 koreninic. Prve 3 dni (do prve meritve) smo dvakrat dnevno (dopoldan, popoldan) v epruvete dodajali raztopine, saj so raztopine izhlapevale in je pomembno, da so čebulice ves čas eksperimenta potopljene v testno raztopino. Ob vsaki meritvi smo rast koreninic tudi fotografirali.

### 3.2.3 Kalitveni test vrtna kreše *Lepidium* (*Lepidium* test)

Lepidium test smo izvedli z vsemi 6 koncentracijami ZnPT ter s tremi kontrolnimi raztopinami. Vsako koncentracijo smo testirali v 2 paralelkah (A, B) s po 10 semeni vrtna kreše. Pripravili smo 18 petrijevok in jih primerno označili. Nato smo papirnate filtre obrezali in vstavili v petrijevke, v vsako petrijevko pa smo na papir položili po 10 semen vrtna kreše. Na vsak posamezen filter smo prvi dan nakapali 2 mL testne raztopine, pokrili s pokrovčki in shranili v temen prostor (Sliki 10 in 11). Po 24 h smo v vsako petrijevko dodali še po 1 mL testne raztopine. Po 48 urah smo izvedli prve meritve poganjkov ter nato ponovno dodali po 1 mL testne raztopine. Po 72 urah smo ponovno izmerili dolžino poganjkov. Ob vsaki meritvi smo poganjke tudi fotografirali.



Slika 10: Dan postavitve kalitvenega testa vrtnice (*Lepidium*)



Slika 11: Rezultati *Lepidium* testa po 24 urah in s koncentracijo ZnPT 1 nM

### 3.2.4 Test strupenosti na vodne bolhe *Daphnia magna* (*Daphnia* test)

*Daphnia* test smo izvedli z vsemi 6 koncentracijami ZnPT ter s tremi kontrolnimi raztopinami. Za redčenje smo uporabili razredčevalno vodo, ki jo ima laboratorij pripravljeno za izvedbo testov z vodnimi bolhami. Kontrolna raztopina DMSO je bila enaka kot pri ostalih testih, pozitivna in

negativna kontrola pa sta bili drugačni; pozitivna kontrola je bila kromatna raztopina, negativna pa 100 % razredčevalna voda. Vsako koncentracijo smo testirali v 2 paralelkah (A, B) (Slika 12). Eksperiment je potekal v primerno označenih velikih petrijevkah, kamor smo s pomočjo merilnega valja odmerili 30 mL posamezne raztopine. Nato smo s pomočjo manjše kapalke v manjše petrijevke dodali nekaj kapljic testne raztopine in 20 bolhic, za vsako paralelko po 10. Nato smo iz manjše petrijevke bolhice prenesli v primerno označene velike petrijevke. Ko smo vsaki paralelki dodali 10 bolhic, smo jih shranili v komoro. Po 24 urah smo izvedli meritve in preverili gibljivost bolhic.



Slika 12: Priprava poskusa test strupenosti na vodnih bolhah (*Daphnia magna*)

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 Terenska analiza izdelkov za nego lasišča

S terensko analizo v lokalnih trgovinah in drogerijah ter na spletu smo preverili, ali izdelki za nego las, predvsem tisti, ki so namenjeni negi občutljivejših las in lasišča (npr. prhljaj, luskačica), vsebujejo ZnPT.

Pregledali smo več različnih trgovin, ki prodajajo izdelke za osebno nego, kot so DM, Mercator, Mueller, Spar ipd., ter pregledali sestavine šamponov, ki jih sami uporabljamo. V pregledanih znamkah šamponov, kot so *L'Oréal*, *Precious argan*, *Head & Shoulders*, *Subrina*, *Subrina recept*, *Schwarzkopf*, *Aveon*, *Pantene*, *Garnier*, *Nivea*, *Nature box Dercos*, *Radical med*, *Isana* itd., ZnPT ni bil zaznan med sestavinami.

Ko pa smo iskali po spletnih straneh proizvajalcev najbolj znanih izdelkov za nego občutljivih las in lasišča in preverjali sestavine izdelkov, so se rezultati izkazali malo drugače. V aprilu in maju leta 2022 smo odkrili nekaj izdelkov, ki so med sestavinami še imeli naveden cinkov piriton (Preglednica 3). Ugotovitve so nas malo presenetile glede na terensko analizo, tudi zaradi tega, ker je omejitev ZnPT v okviru *Uredbe Komisije (EU) 2021/1902* pričela veljati s 1. marcem 2022. V letu 2023 smo po spletnih straneh ponovno pregledovali šampone in opazili, da skoraj večina ponudnikov med sestavinami šamponov ni imela navedenega cinkovega piritona. V obdobju spremljanja sta bili najdeni le dve izjemi, ki sta približno leto in pol po sprejeti uredbi med sestavinami še zmeraj imeli ZnPT (Slika 13 in 14).

Preglednica 3: Šamponi, najdeni na slovenskih spletnih mestih, ki so vsebovali ali vsebujejo ZnPT

Šamponi za nego občutljivih las in lasišča		
Ime šampona	Količina	Čas najdbe
<i>Head &amp; shoulders</i> - Sensitive Scalp šampon proti prhljaju	400 mL	April 2022
<i>Head &amp; shoulders</i> - Apple Fresh 2v1	360 mL	April 2022
<i>Head &amp; shoulders</i> - Men Ultra Old Spice šampon proti prhljaju	270 mL	April 2022
<i>Head &amp; shoulders</i> – Menthol	540 mL	April 2022
<i>Garnier fructis</i> – Grow strong	250 mL	Maj 2022
<i>Head and shoulders</i> – 2 in 1 classic clean	360 mL in 900 mL	Maj 2022
<i>L'Oréal</i> – Scalp advanced serie expert (Slika 13)	300 mL	Av gust 2023
<i>Psoren</i> šampon (Slika 14)	200 mL	Oktober 2023



**PREDSTAVITEV**

**LASTNOSTI**

**KONTAKT**

Šampon proti prhljaju. Pomirja lase in lasišče ter daje občutek svežine. Formula je obogatena s cinkovim piridonom in citronsko kislino, kar pomaga pri čiščenju prhljaja in zmanjšuje njegovo vidnost takoj po prvi uporabi \*. \* Klinični test na 31 osebah.

Navodilo za uporabo: Šampon nanesite na mokre lase, temeljito spenite s krožnimi gibi in nato oplaknite z vodo. Po potrebi postopek ponovite.

Sestava: AQUA / WATER | SODIUM LAURETH SULFATE | SODIUM LAURYL SULFATE | COCAMIDE MEA | GLYCERIN | SODIUM CHLORIDE | GLYCOL DISTEARATE | **ZINC PYRITHIONE** | SODIUM BENZOATE | DIMETHICONE | CARBOMER | SALICYLIC ACID | CITRIC ACID | MENTHOXYPROPANEDIOL | LINALOOL | GUAR HYDROXYPROPYLTRIMONIUM CHLORIDE | LIMONENE | BENZYL ALCOHOL | CI 42090 / BLUE 1 | SODIUM HYDROXIDE | PARFUM / FRAGRANCE

Slika 13: Slikane sestavine šampona L'Oréal – scalp advanced serie expert, med katerimi je naveden ZnPT, na spletnem mestu

**Sestavine (INCI)**

AQUA, DISODIUM LAURETH SULFOSUCCINATE, COCAMIDOPROPYL BETAINE, SODIUM CHLORIDE, GLYCERIN, SALICYLIC ACID, MYRISTYL LACTATE, ALOE BARBADENSIS LEAF EXTRACT, TROPAEOLUM MAJUS FLOWER EXTRACT, CITRUS LIMONUM PEEL OIL, PANTHENOL, CALCIUM PANTOTHENATE, **ZINC PYRITHIONE**, BIOTIN, LIMONENE, BENZOIC ACID, COCODIMONIUM HYDROXYPROPIL HYDROLIZED SILK PROTEIN, COCODIMONIUM HYDROXYPROPIL HYDROLIZED WHEAT PROTEIN, DEHYDROACETIC ACID, CITRAL, ETHYLHEXYGLYCERIN, LINALOOL.

Slika 14: Slikane sestavine šampona Psoren, med katerimi je naveden ZnPT na spletnem mestu

Ker je *Head & Shoulders* ena od najbolj trženih znamk za nego las s prhljajem, smo nato natančno preučili spletno stran te blagovne znamke. Opazili smo, da imajo različne ponudbe izdelkov za različni trg (kontinenti, države). Osredotočili smo se na razliko med trgom EU in ameriškim trgom. Velika večina izdelkov na ameriškem trgu je med sestavinami imela naveden ZnPT. Prav tako so imeli na voljo več različnih izdelkov v primerjavi s ponudbo na evropskem trgu. Izdelki, ki so se ujemali in bili v ponudbi na obeh trgih, niso imeli enakih sestavin. Na evropskem trgu ZnPT med sestavinami ni bilo. Kot nadomestilo sestavini cinkov pirition je danes pogosto uporabljen pirokton olamin.

Nato smo potrošniške navade glede nege las in tudi nakupa specifičnih izdelkov zaradi težav z lasmi oz. lasiščem preverili z anketo. V spletni anketi je sodelovalo 207 ljudi, od tega je bilo 139 (67,1 %) žensk in 68 (32,9 %) moških. Največ anketirancev je bilo starih 20–29 let, kar 72 oseb oz. skoraj 35 %, druga največja starostna skupina je bila 30–39 let (23 %). Tudi ostale starostne skupine so bile glede na spletni dostop ankete zastopane v pričakovanem deležu (Preglednica 4).

Preglednica 4: Prikaz števila v % individualne starostne skupine anketirancev

Starostna skupina	Delež (%)
10–19	15,5
<b>20–29</b>	<b>34,8</b>
30–39	22,7
40–49	13,5
50–59	8,2
Nad 60	5,3

Glede nege las nas je najprej zanimalo, kako pogosto si anketiranci umivajo lase, in večina (44 %) si jih umiva 2-krat tedensko. Zelo presenetljiv je bil rezultat, da si skoraj 10 % anketirancev lase umiva vsak dan (Preglednica 5).

Preglednica 5: Prikaz števila v %, kako pogosto si anketiranci umivajo lase tedensko

Pogostost umivanja las	Delež (%)
1-krat tedensko	19,3
<b>2-krat tedensko</b>	<b>44,0</b>
3-krat tedensko	22,2
4-krat tedensko	4,8
vsak dan	9,7

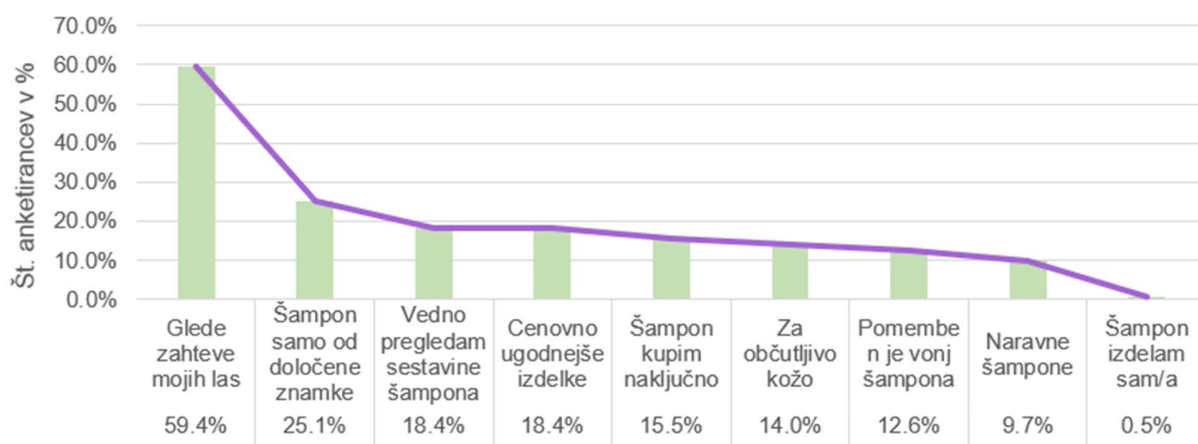
Zanimalo nas je tudi, koliko različnih izdelkov za nego las pri umivanju uporabljajo, saj je v današnjih časih veliko trženja v smeri uporabe mnogo raznolikih izdelkov za nego las, da ohranjamo "zdrave" lase in lasišče. Odgovori nam povedo, da velika večina uporablja 2 ali manj izdelkov, kar je iz vidika uporabe kemikalij zelo dober rezultat, saj se s tem izpostavljajo manjši količini kemikalij. Čeprav največji delež anketirancev uporablja le 2 produkta za nego las, nas je bolj presenetila uporaba samo enega izdelka z kar 35,7 %. Razlag za slednji rezultat je več. Lahko da se je za ta odgovor odločila večina moških anketirancev ali pa so uporabniki že ozaveščeni, da več izdelkov vedno ne vodi do boljšega rezultata pri negi las (Preglednica 6).

Preglednica 6: Prikaz števila uporabljenih izdelkov za nego las v %

Število izdelkov za nego las	Delež (%)
1 izdelek	35,7
<b>2 izdelka</b>	<b>41,5</b>
3 izdelki	16,4
4 ali več izdelkov	3,9
0 izdelkov	2,4

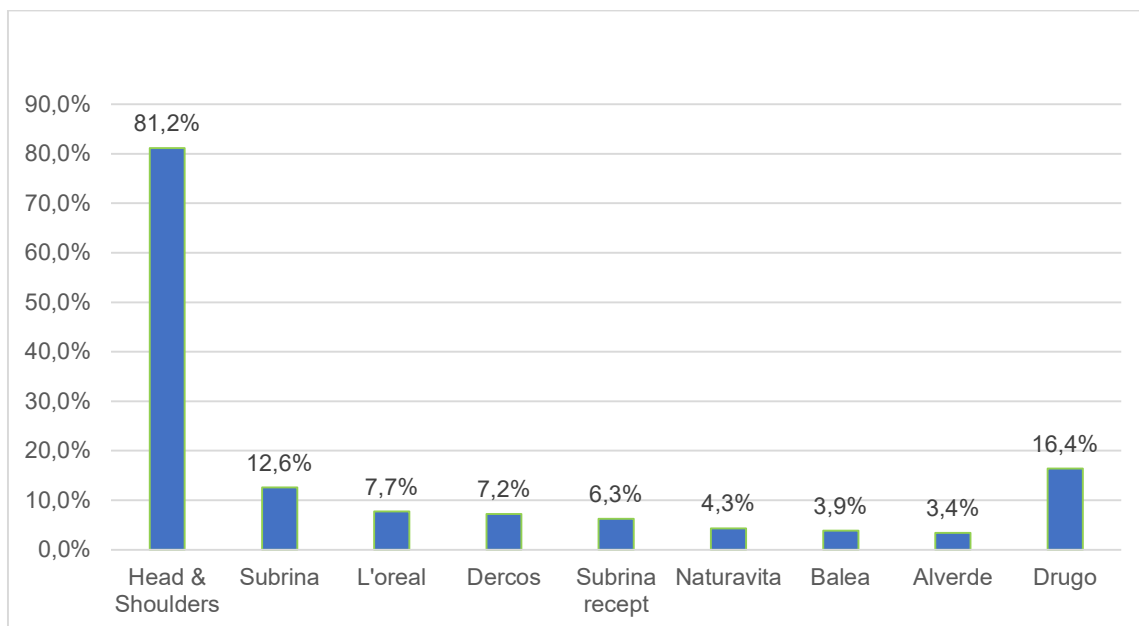


Zanimalo nas je tudi, kakšne so prioritete anketirancev pri izbiri in nakupu šampona za lase. Čeprav je bilo možnih kar 9 odgovorov in so lahko izbrali več odgovorov, najbolj izstopa odgovor, da izdelek izberejo glede na zahtevo svojih las (kar 59,4 %) (Slika 15). Čeprav je zelo malo anketirancev izbralo "naravne šampone" (9,7 %), je še zmeraj visok odstotek ljudi (18,4 %), ki so pozorni na vsebino produkta in preberejo seznam sestavin. To nam lahko pove, koliko anketirancev je ozaveščenih o pomembnosti kemikalij v izdelkih na naših trgovskih policah in kako lahko vplivajo na naše telo, saj so iz dneva v dan tudi na kozmetičnem trgu prisotne nove kemikalije, za katere tudi še ni dovolj opravljenih raziskav, da bi razumeli vse njihove pozitivne in negativne učinke na človeško telo ter okolje. Zanimivo je, da glede na sodobne spletne trende »izdelaj si sam« (angl. *DIY*) samo 0,5 % oz. 1 anketiranec uporablja doma narejen šampon.



Slika 15: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Na kaj ste pozorni pri nakupu šampona za lase? (možnih več odgovorov)«

Prav tako smo želeli razumeti, katera je tista znamka šampona, na katero anketiranci pomislijo ob besedi prhljaj. Tukaj smo želeli predvsem najti asociacije, ki jih imajo potencialni kupci. Na ta način lahko tudi sklepamo, kateri šampon bi izbrali pri pojavu težav s prhljajem. Ugotovili smo, da med anketiranci ena blagovna znamka izrazito izstopa, saj nanjo pomisli kar 81,2 % anketirancev. Ta znamka šampona je *Head & Shoulders*, ki je hkrati tudi najbolj tržena znamka za nego las na slovenskem trgu, predvsem za težave s prhljajem (Slika 16). Na Sliki 16 so navedene blagovne znamke, ki so se pojavile v več kot 3 % odgovorov, ostale smo v predstavitvi združili pod možnostjo »Drugo« (le 16,4 %). V to kategorijo smo uvrstili 34 blagovnih znamk.

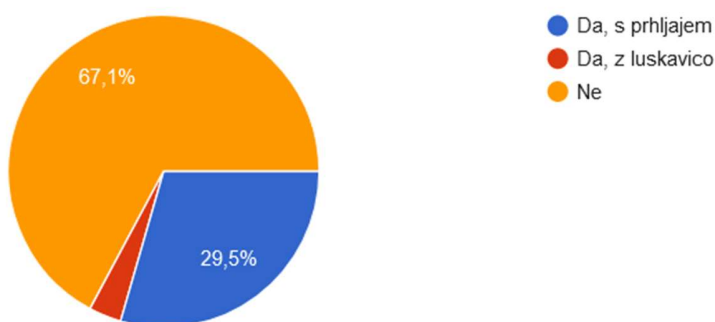


Slika 16: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Na katero znamko šampona pomislite, ko slišite besedo PRHLJAJ? (možnih več odgovorov)«

Med anketiranci smo želeli poiskati ljudi s težavami z luskavico ali prhljajem; da bi ugotovili, koliko jih je in ali pri negi las in lasišča uporabljajo kakšne specifične izdelke. Med anketiranci ima 33 % ljudi težave s prhljajem ali luskavico (Slika 17). Da ima tretjina anketirancev težave, se nam zdi kar visok odstotek. Večina le-teh se srečuje s prhljajem, manj pa z luskavico. V kolikšnem obsegu te težave imajo, nismo ugotavljali.

#### Imate morda težave s prhljajem ali z luskavico?

207 odgovorov



Slika 17: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Imate morda težave s prhljajem ali z luskavico?«

Nato smo anketirance povprašali, ali oz. katere specifične izdelke zaradi svojih težav uporabljajo. Kar 64,7 % anketirancev je odgovorilo, da težav nima, kar je bilo skladno s prehodnim vprašanjem glede prisotnih težav. Kar 18,1 % jih specifičnega izdelka ne glede na težave ne uporablja. Ali je to za nego in zdravje kože dobro, težko presodimo, saj ne vemo, v kakšnem obsegu oz. kako

intenzivno se njihove težave pojavljajo. Med ostalimi 17,2 % anketirancev, ki uporabljajo specifični izdelek, smo zasledili več blagovnih znamk (Preglednica 7).

Blagovne znamke, ki so izbrane vsaj 2-krat, smo vključili v Preglednico 7. Ostale blagovne znamke so pa uvrščene pod kategorijo »Drugo«. Teh blagovnih znamk je vseh skupaj 14, med katerimi so npr. *Tea Tree Special Shampoo*, *Belosalic*, *Watermans*, *Eucerin*, *Johnsons baby*, *Garnier* itd.

*Preglednica 7: Prikaz odgovorov na vprašanje: »Ali zaradi zgoraj omenjenih težav uporabljate določen šampon? Kateri?«*

<b>Blagovna znamka izdelka za težave s prhljajem ali luskvico</b>	<b>Delež (%)</b>
<i>Head &amp; Shoulders</i>	<b>25</b>
<i>Vichy Dercos</i>	13
<i>Ducray (Squanorm, Kelual DS)</i>	6
<i>Oranzolo</i>	6
<i>Naturavita proti prhljaju</i>	6
<i>4 kids and us</i>	6
<b>Drugo</b>	<b>41</b>

Če te rezultate primerjamo s terensko analizo in z asociacijami, lahko ugotovimo, da je blagovna znamka *Head & Shoulders*, najbolj prepoznana, tržena in zelo dobro prodajana znamka šamponov na trgu pri nas za blaženje simptomov prhljaja. Med anketiranci je ta znamka prevladovala tako pri asociaciji na težave s prhljajem kot tudi pri dejanski uporabi ob prisotnih težavah s prhljajem. Prav tako se pozna sprejeta *Uredba Komisije (EU) 2021/1902*, ki je imela vpliv na trgovine z izdelki za osebno nego, saj v nobeni od pregledanih poslovalnicah med sestavinami šamponov za nego las in lasišča nismo zasledili kemikalije cinkov piriton. Med pregledovanjem po trgovinah in spletnih straneh smo naleteli na dve izjemi, za kateri pa težko trdimo, da resnično še zmeraj vsebujeta ZnPT, čeprav je v opisu sestavin omenjen.

Kot preverjeno, se je cinkov piriton resnično odstranil iz izdelkov za problematične lase in lasišče, ampak kot že omenjeno, se je pogosteje pričela pojavljati kemikalija pirakton olamin, ki jasno postaja nadomestna kemikalija za ZnPT. Zanja bo treba prav tako izvesti razne raziskave za boljše razumevanje njenih učinkov tako na človeka kot tudi na okolje.

Ob koncu ankete smo zastavili še dve vprašanji, s katerima smo želeli pridobiti informacijo o tem, ali se potrošniki zavedajo vsebnosti kemikalij v komercialnih šamponih. Ugotoviti smo želeli, kako zelo so anketiranci v današnjih časih pozorni na vsebino oziroma sestavine šamponov ali drugih kozmetičnih izdelkov, ki jih uporabljajo v svojem vsakdanu.

Rezultati so pokazali, da se kar 94 % anketirancev zaveda uporabe večjih količin kemikalij v današnjih komercialnih šamponih. Od tega jih polovica (52 %) sklepa, da ti šamponi v povprečju vsebujejo 10–20 kemikalij (Preglednica 8).

Preglednica 8: Količina kemikalij, za katere anketiranci sklepajo, da so v povprečju vsebovani v večini šamponov, v %

Število kemikalij v šamponih	Delež (%)
Do 10	27,1
<b>Med 10 in 20</b>	<b>52,2</b>
Med 20 in 30	15
Več kot 30	5,8

Čeprav lahko število vsebovanih sestavin variira od izdelka do izdelka glede na namen in blagovno znamko, se velika večina anketirancev zaveda, da izdelki lahko vsebujejo velike količine kemikalij, kar je razvidno iz Preglednice 8. Mnogi izdelki vsebujejo tudi do 30 kemikalij, čeprav to na prvi pogled morda ni razvidno, dokler se ne seštejejo.

Je pa presenetljiva ugotovitev, da je kar 27,1 % anketirancev mnenja, da je v šamponih v povprečju prisotnih samo do 10 kemikalij. To nam pove, da se približno tretjina anketirancev pravzaprav ne zaveda ali niso seznanjeni z realno količino kemikalij, ki jih v svojem vsakdanu uporabljajo.

## 4.2 *In vitro* ocena potencialne toksičnosti cinkovega piritiona

### 4.2.1 Čebulni test *Allium cepa* L. (Allium test)

Rezultate Allium testa smo prikazali v obliki dolžin izmerjenih koreninic v odvisnosti od koncentracije ZnPT. Vrednosti smo normalizirali na kontrolo. Povzetek meritev z izbranimi statističnimi podatki je prikazan v Prilogi 2.

Ugotovili smo, da se ne glede na dolžino eksperimenta (3, 5 ali 7 dni) rast korenin najbolj značilno zmanjša pri najvišjih dveh koncentracijah – torej v koncentracijah 10 in 100  $\mu\text{M}$  (Slike 18–20). Rast korenin v primeru pozitivne kontrole (na slikah skrajno desno v rdeči barvi) je bila praktično ničelna.

Koncentracije ZnPT od 1 nM in 1  $\mu\text{M}$  so celo pospešile rast koreninic, kar je najbolj izrazito po 7 dneh (Slika 20).

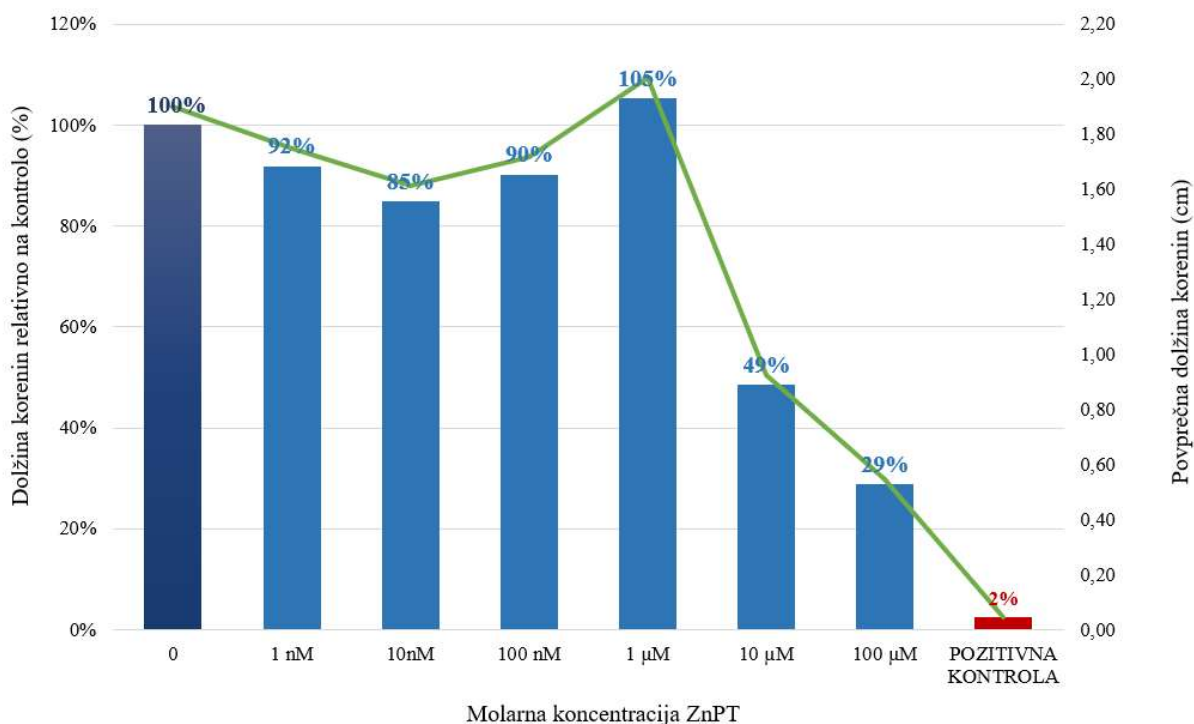
Ugotovili smo, da je bila po 3 dneh namakanja čebulic v najvišjih dveh raztopinah ZnPT (10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$ ) dolžina koreninic že na pogled precej odstopajoča od ostalih koreninic z nižjo koncentracijo ZnPT. To nam pove, da je imel ZnPT velik zaviralni učinek na delitev celic in posledično na rast koreninic v tovrstnem organizmu. In to kljub temu da je bil ZnPT sočasno izpostavljen že 72 ur sončni svetlobi, ki jo čebulice potrebujejo za uspešno rast. Pri ostalih koncentracijah (1 nM, 10 nM in 100 nM) ni bilo opaziti drastičnega zaviranja rasti koreninic. Edine koreninice, ki so rahlo odstopale od negativne kontrole (0) za kar 5 % in so prav tako bile najdaljše koreninice, so bile koreninice pri koncentraciji ZnPT 1  $\mu\text{M}$ . Poleg tega je pa zanimivo, kako je

koncentracija med 1  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$  manjša, ampak je razlika pri vplivu na rast koreninic drastično večja (za kar 56 %), če primerjamo z razliko med 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$ .

Pozitivna kontrola pa je imela, kot smo predvideli, minimalno rast. Malo slabšo rast smo opazili tudi pri meritvi s koncentracijo ZnPT 10 nM, ki je bila le za 15 % slabša od negativne kontrole.

Pri ekotoksikoloških testih z živimi organizmi je treba upoštevati več dejavnikov, ki imajo lahko vpliv na končne rezultate in na katere težko popolnoma vplivamo. Taki dejavniki so lahko deformacija organizma, malenkost preveč odrezana oz. poškodovana čebulica, čebulice so tudi različne velikosti, lahko imajo mehansko poškodbo, so bolj mlade ali stare, je na njih celo biološka napaka ipd. Zaradi takšnih dejavnikov so potrebni večkratni neodvisni eksperimenti, ki nam zagotovijo bolj zanesljive in natančne rezultate.

Po 5 dneh smo opazili, da se koncentracije v nM območju opazno približujejo dolžini negativne kontrole, med katerimi je koncentracija 1 nM prerasla kontrolo za 1 %, koncentracija 1  $\mu\text{M}$  pa tokrat ne presega kontrole v dolžini. Zanimivost še zmeraj ostaja pri koncentraciji 1  $\mu\text{M}$ , ki drastično meri za 58 % več od 10  $\mu\text{M}$  (Slika 19). Med 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$  je pa razlika le za 20 %, enako kot pri prvi meritvi (3. dan).



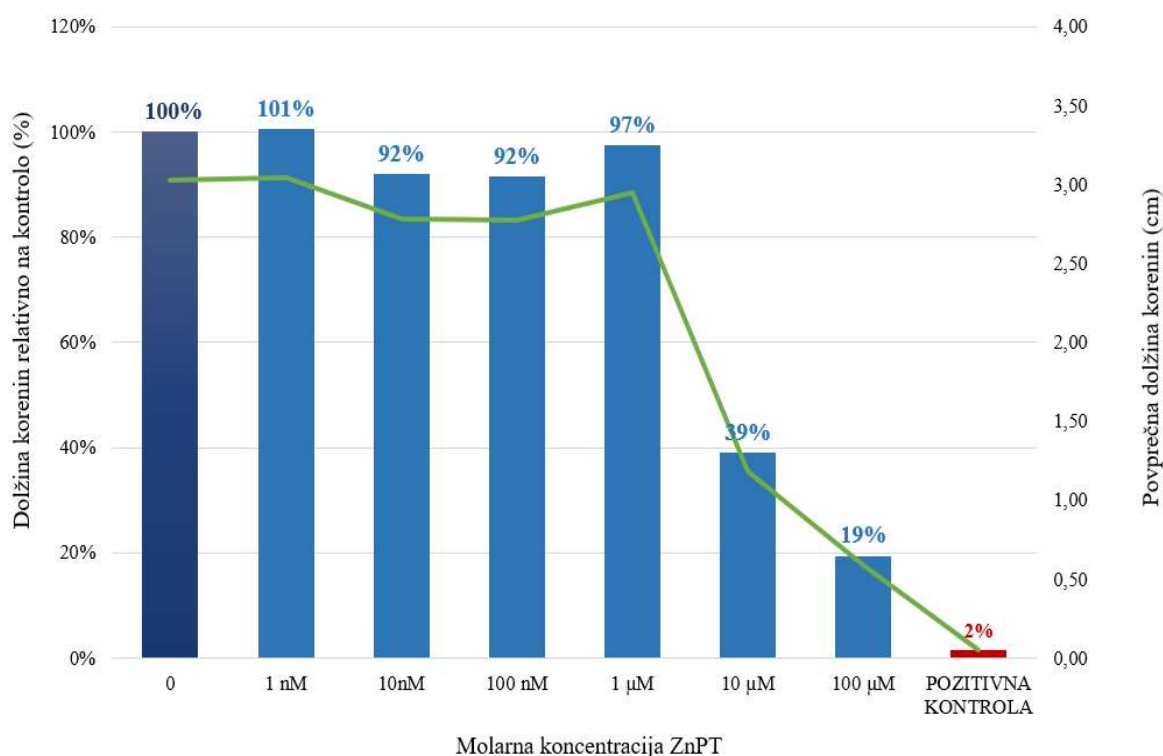
Slika 18: Allium test – rast koreninic po 3 dneh

Pri zadnji meritvi (7. dan) so rezultati opazno drugačni od prve meritve (3. dan). Vse koreninice, namočene v koncentracijah od 1 nM do 1  $\mu\text{M}$ , so zrasle do te mere, da so presegale rast negativne kontrole; koncentracija 1 nM je negativno kontrolo presegla kar za 18 %. Razlika med 1  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$  se je še zmeraj večala, 7. dan se je razlikovala za kar 59 %. Tu se pokaže kako »tanka je meja« med koncentracijama 1  $\mu\text{M}$  in 10  $\mu\text{M}$ , saj tu lahko že manjše dodane količine vplivajo izredno zaviralno na rast organizma. Pri najvišji koncentraciji (100  $\mu\text{M}$ ) je bila rast koreninic še najbolj uspešna na prvi dan meritve, nato se je rast nekoliko upočasnila z vsako novo meritvijo,

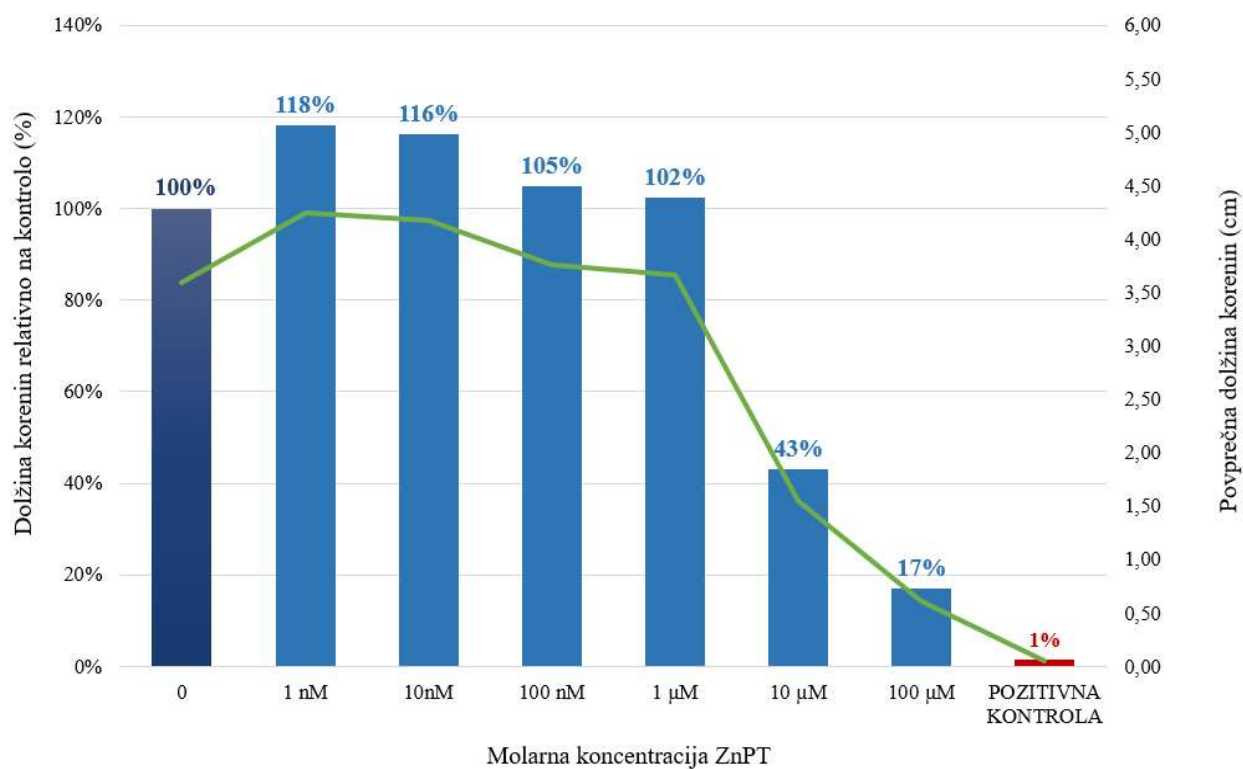
saj se je pri prvi meritvi od negativne kontrole razlikovala za 71 %, pri zadnji meritvi pa kar za 83 %.

Zadnja meritev nam lepo prikazuje postopno sorazmerno upadanje rasti koreninic z višanjem koncentracije ZnPT, v kateri so bile namočene. Z rezultati zadnje meritve lahko trdimo, da ZnPT resnično ima toksične učinke na tovrstne organizme, saj se učinek ZnPT z naraščanjem njegove koncentracije stopnjuje. Vplivi so drastični predvsem, ko se približujemo koncentracijam na območju od 1  $\mu\text{M}$  do 10  $\mu\text{M}$ .

Kot predvideno, so rezultati pri pozitivni kontroli pokazali, da rast koreninic ni bila uspešna oz. so na 7. dan meritve čebulice pričele že plesnети..

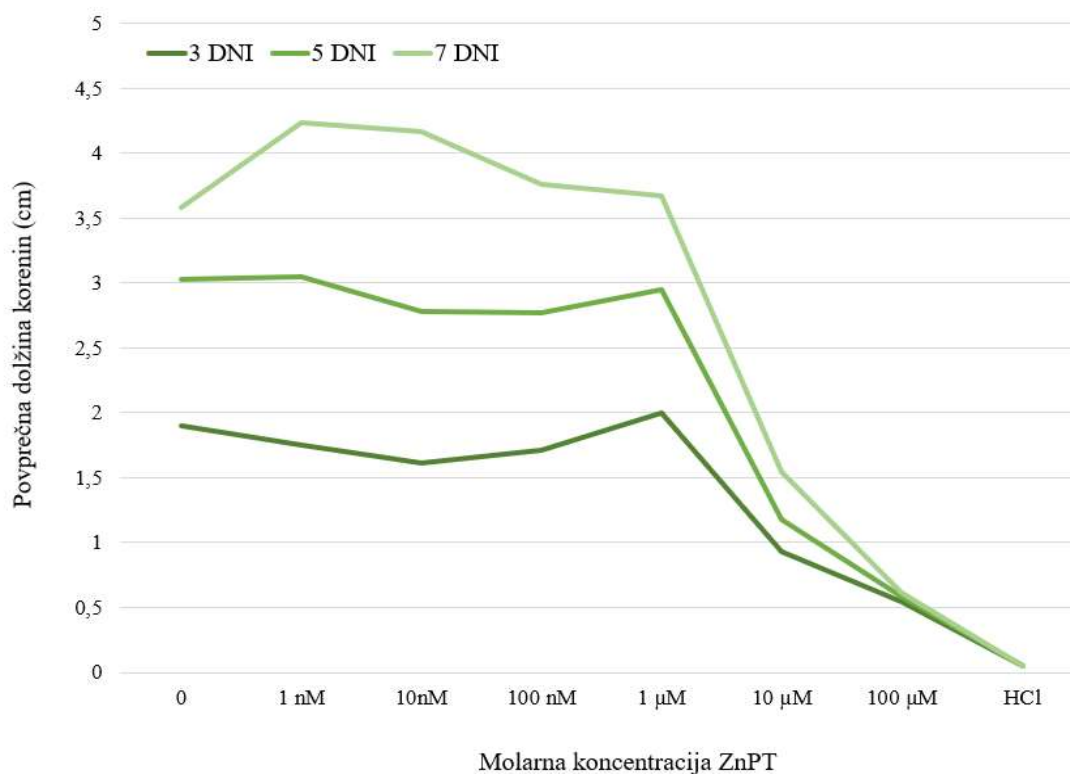


Slika 19: Allium test – rast koreninic po 5 dneh



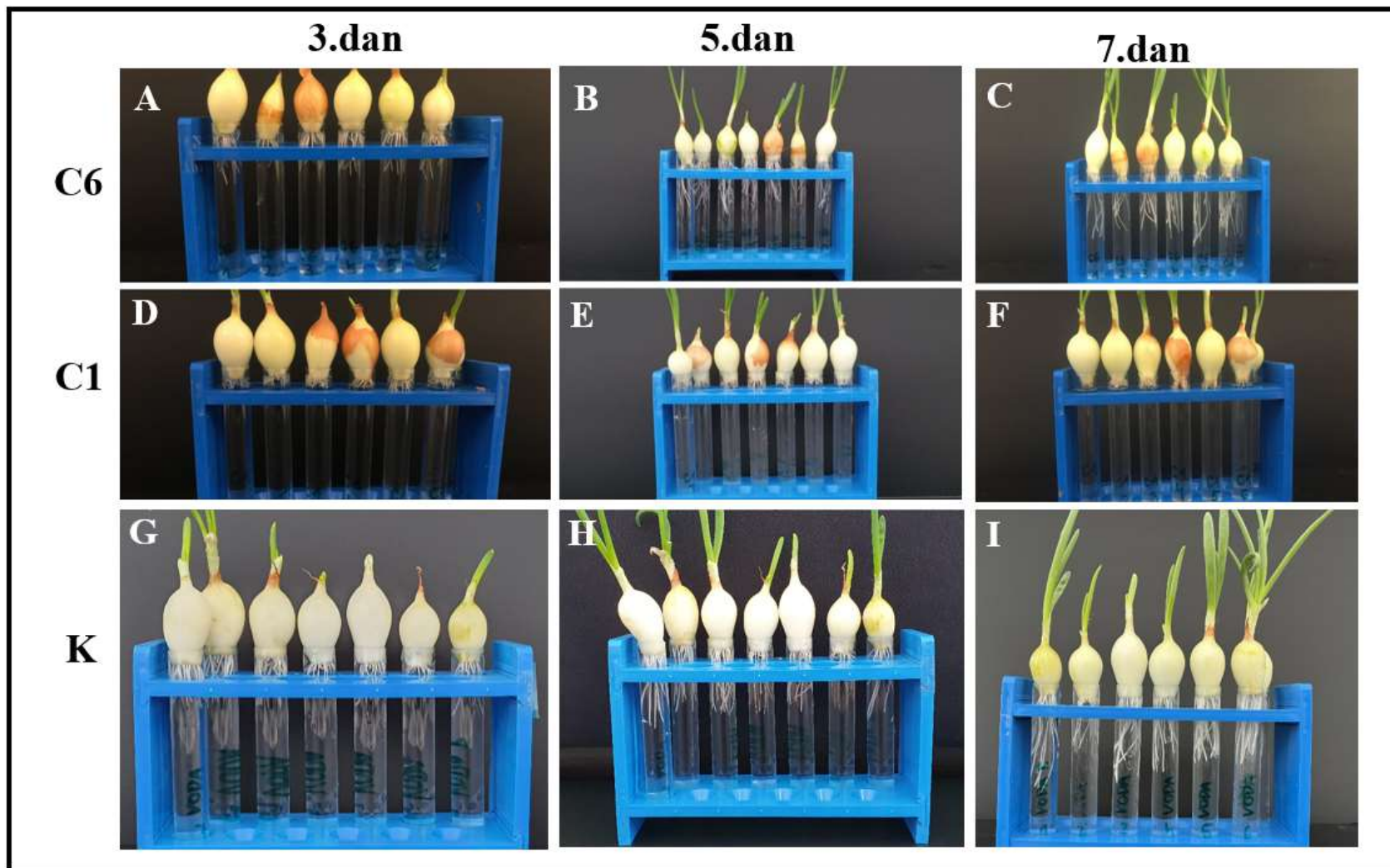
Slika 20: Allium test – rast koreninic po 7 dneh

Če primerjamo rast koreninic po dnevih med seboj, lahko opazimo podoben trend na Slikah 21 in 22, kjer vidimo razliko v dolžini koreninic, ki so v epruveti. Pri najvišjih dveh koncentracijah je rast minimalna, v primeru pozitivne kontrole rasti skoraj ni bilo (Slika 21). Če izračunamo odstotek prirastka rasti med dnevi 3 in 7, opazimo, da je prirastek v kontroli 89 %, v najnižjih 3 koncentracijah celo večji kot 100 %. V najvišjih dveh koncentracijah, kjer je učinek ZnPT najbolj očiten, pa le 67 % (10  $\mu\text{M}$ ) oz. 12 % (100  $\mu\text{M}$ ).



Slika 21: Allium test – prikaz vpliva ZnPT na rast korenin v 3, 5 in 7 dneh.





Slika 22: Rast čebulic pod vplivom ZnPT po 3.dneh (A, D, G), 5.dneh (B, E, H) in 7.dneh (C, F, I) v primerjavi s kontrolo. Kontrolne čebulice so v spodnji vrstici (slike G, H in I), zgornje slike (A, B, C) so čebule, izpostavljene najnižji koncentraciji ZnPT (C6 = 1 nM) ter vmesne (D; E in F) čebule, izpostavljene najvišji koncentraciji ZnPT (C1 = 100  $\mu$ M).

#### 4.2.2 Kalitveni test vrtno kreše *Lepidium* (Lepidium test)

Rezultate Lipidium testa smo prikazali v obliki dolžin izmerjenih korenin v odvisnosti od koncentracije ZnPT. Vrednosti smo normalizirali na kontrolo. Povzetek meritev z izbranimi statističnimi podatki je prikazan v Prilogi 3.

Rezultati testov z vrtno krešo so pokazali drugačen trend vpliva ZnPT na njeno kalitev kot je imel ZnPT v *Allium* testu vpliv na rast korenin (oz. celično delitev). Kalitev je bila najnižja ravno pri najnižji koncentraciji ZnPT; in sicer za 24 % po 48 urah in 27 % po 72 urah. Trend kalitev je v obeh časovnih intervalih zelo primerljiv (Sliki 23 in 24).

Po 72 urah se izrazita sprememba opazi tudi pri najvišji koncentraciji, kjer se kalitev zmanjša za 33 % (Slika 24).

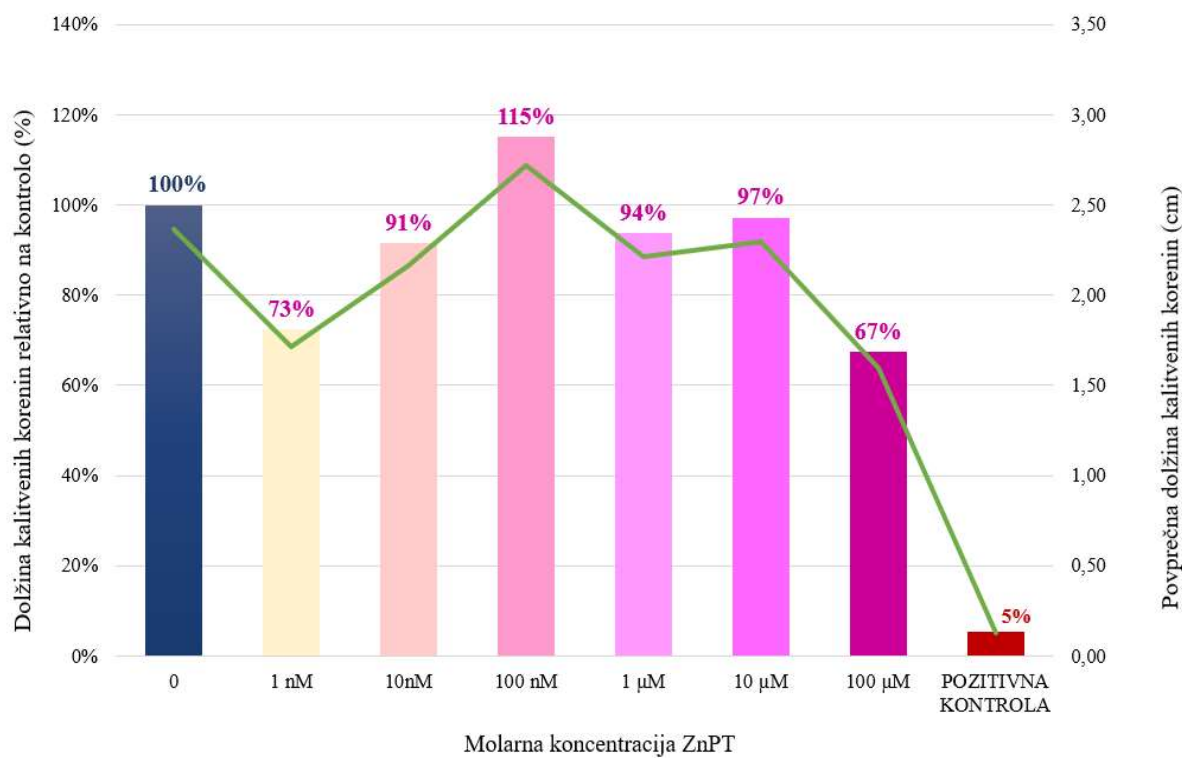
Na podlagi dobljenih rezultatov izmerjenih korenin lahko sklepamo, da neke pričakovane zmanjšane/upočasnjene kalitve sorazmerno z naraščanjem koncentracije ZnPT nismo opazili. Po 48 urah je bila najnižja rast pri najnižji koncentraciji (1 nM), kar je nepričakovano. Po 72 urah pa smo opazili najnižjo rast korenin pri najvišji koncentraciji ZnPT (100  $\mu$ M); a tik za njo z le 6 % razlike je bila pa najnižja koncentracija.

Tokrat sončna svetloba ni imela direktnega stika z Lipidium testom, saj so se meritve izvajale v zasenčenem predelu laboratorija, v času izpostavljenosti raztopini ZnPT pa so bili kalčki v zatemnjenem prostoru. Trdimo lahko, da fotodegradacija ni imela vpliva na ZnPT v vzorcih.

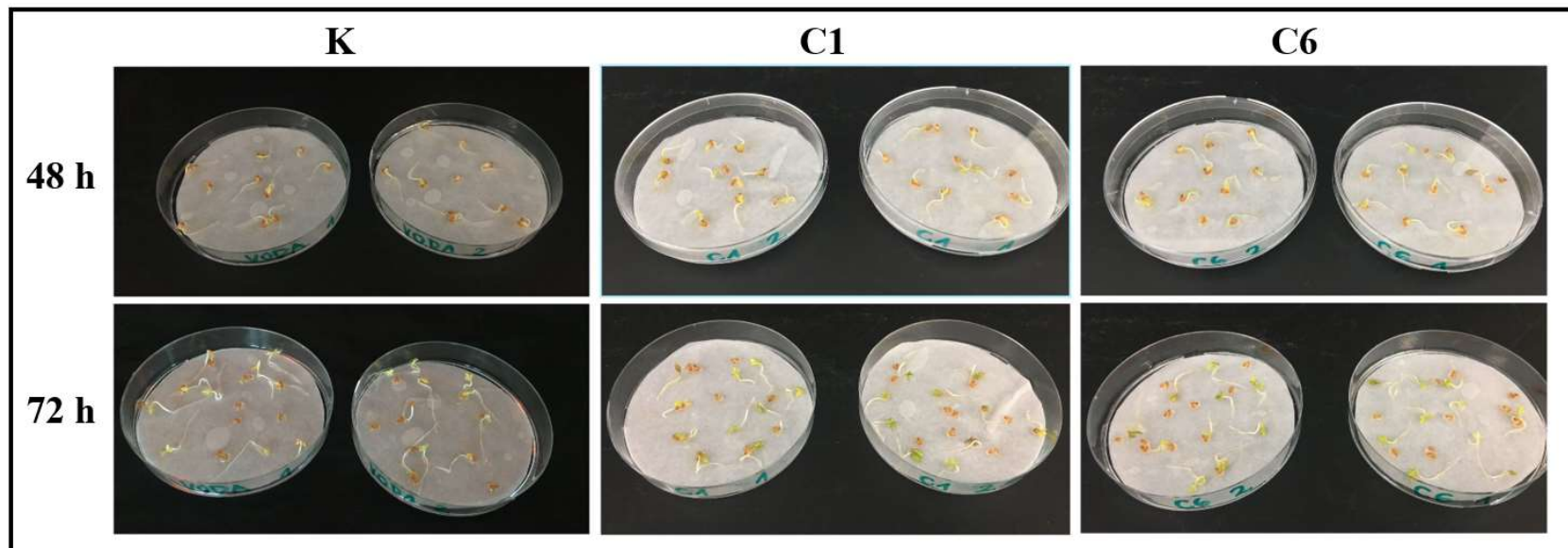
Prav tako smo opazili, da je v primerjavi z vsemi raztopinami koncentracija ZnPT 100 nM pri obeh meritvah (48 ur in 72 ur) sprožila najbolj učinkovito kalitev, pri drugi meritvi po 72 urah je celo presegala negativno kontrolo za kar 15 %. Iz tega lahko sklepamo, da ZnPT na tovrstni organizem ne vpliva toksično oz. je zaviralni učinek minimalen. Zaznani učinki niso skladni z rezultati *Allium* testa oziroma sam kalitveni test ni tako občutljiv in zanesljiv. Najverjetneje bi morali imeti še več paralelk in poskus še neodvisno vsaj dvakrat ponoviti.



Slika 23: Lipidium test – kaljenje vrtno kreše po 48h



Slika 24: Lipidium test – kaljenje vrtno kreše po 72h



Slika 25: Kalitev vrtno kreše pod vplivom ZnPT (C1 ali C6) po 48 in 72h urah v fotografijah

#### 4.2.3 Test strupenosti na vodne bolhe *Daphnia magna* (Daphnia test)

Glede na zahtevane pogoje eksperimenta smo vsem raztopinam ZnPT najprej izmerili vrednosti pH in koncentracijo raztopljenega kisika. Optimalne so vrednosti pH med 7,3 in 8,3 ter koncentracija raztopljenega kisika okrog 8 mg/L. Vse pripravljene raztopine so ustrezale tem pogojem, zato smo vplive na gibljivost vodnih bolh zaradi teh dejavnikov lahko izločili.

Rezultate Daphnia testa smo prikazali s preživetjem bolh v odvisnosti od koncentracije ZnPT (Preglednica 9, Slika 26).

Preglednica 9: Odstotek preživetja vodnih bolh po 24- in 48-urni izpostavitvi ZnPT

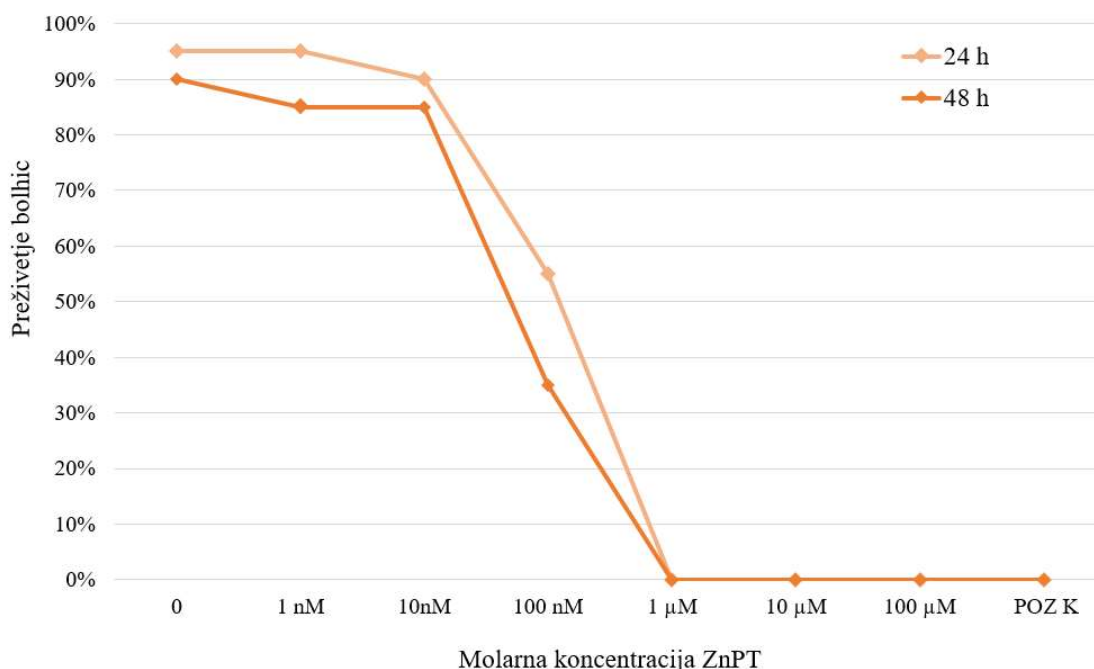
	KONTROLA	C6	C5	C4	C3	C2	C1	POZ K
		1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM	Kromatna raztopina
24 h	95 %	95 %	90 %	55 %	0 %	0 %	0 %	0 %
48 h	90 %	85 %	85 %	35 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Že po 24 urah izpostavitve smo zaznali 100 % umrljivost vodnih bolh, izpostavljenih ZnPT v mikromolarnem območju. Nasprotno pa so koncentracije v nanomolarnem območju pokazale več kot 50 % gibljivih oz. preživelih bolhic. Z naslednjim dnevom (po 48 urah) so se rezultati pri najnižjih dveh koncentracijah spremenili le za 5 %, kar še zmeraj predstavlja več kot 50 % preživelih. Pri tretji najnižji koncentraciji (100 nM) pa je bila razlika večja, in sicer za kar 20 % v primerjavi s prvo meritvijo, kar pa je predstavljalo manj kot 50 % preživelih vodnih bolh. To pomeni, da je bila po 48 urah že pri koncentraciji 100 nM preživelost vodnih bolhic manjša kot 50 %, kar lahko predstavlja skrb za bolj ranljive organizme v okolju, kot so *Daphnia magna*.



Slika 26: Štetje negibnih *Daphnia* bolhic po 24 urah

Ugotovili smo, da so najvišje tri koncentracije (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$ ) in pozitivna kontrola povzročile 100 % negibnost bolhic. Pri koncentraciji 100 nM so bili rezultati zaskrbljujoči, saj je bila že po 24 urah umrljivost skoraj polovična. Po 48 urah pa se je umrljivost že dvignila na 65 %, kar pomeni, da če bi vodne bolhice bile izpostavljene v okolju pri koncentraciji 100 nM, bi po dveh dneh več kot polovica izpostavljenih poginila, kar pa lahko predstavlja veliko škodo za ekosistem. Najnižji koncentraciji (1 nM in 10 nM) pa nimata večjega toksičnega vpliva na tovrstne vodne organizme, saj je umrljivost po 24 urah le 5–10 %. To pomeni, da ne predstavlja večjih skrbi, saj je umrljivost zelo nizka (Slika 27).



Slika 27: *Daphnia* test – odstotek preživetja vodnih bolh

Če primerjamo slednje rezultate z *Allium* testom, lahko vidimo, da so si rezultati med seboj precej podobni pri najvišjih dveh koncentracijah, z izjemo tretje najvišje pri vodnih bolhah, saj imata koncentraciji opazno velik vpliv na razvoj in delovanje na tovrstne organizme. Pri obeh rezultatih se prav tako pojavi drastično povečanje učinkov ZnPT na testni organizem, smo pa ta padec pri vodnih bolhah zaznali že med koncentracijama 100 nM in 1  $\mu\text{M}$ .

Po primerjavi *Lipidium* in *Daphnia* testa pa smo ugotovili, da ni veliko podobnosti pri rezultatih, le pri najvišji koncentraciji je razvidno, da ZnPT negativno vpliva na organizme, vendar so pri *Lipidium* testu njegovi učinki enaki ali celo večji pri najnižji koncentraciji.

To nam pove, da se živi organizmi med seboj lahko zelo razlikujejo in so s tem tudi zelo različno občutljivi na škodljive dejavnike, ki so lahko prisotni v okolju. Razberemo lahko tudi, da ZnPT na organizme, kot je *Lipidium* oz. vrtna kreša, nima večjega in zaskrbljujočega vpliva, kot ga lahko ima na *Daphnia magna*.

Že študije so pokazale, da ZnPT vpliva na žive organizme zelo raznoliko, saj na nekatere nima vpliva, pri drugih pa lahko sproži hude nevrotoksične učinke ali smrt, kar pa lahko celo variira vpliv med spoloma (Zhao in sod., 2020).

## 5 SKLEPI

Cinkov piriton je sintetična kemikalija, ki ima antibakterijske, protiglivične in protimikrobne lastnosti, zato se je pogosto uporabljal kot komercializirano učinkovina v izdelkih za blaženje kožnih težav, v kozmetiki za problematične lase in lasišče ter v raznih premazih za plovila kot preventiva proti vodnim organizmom, kot so alge. Njegova uporaba v kozmetičnih izdelkih je bila že od leta 2009 dalje omejena na 0,1 % do maksimalno 2 % masni oz. volumski delež izdelka, z leti pa so se te meje spreminjale. Leta 2021 se je zaradi sprejetja *Uredbe Komisije (EU) 2021/1902* njegova uporaba v Evropski uniji prepovedala in prepoved je stopila v veljavo 1. marca 2022.

Cilj tega diplomskega dela je bilo ugotoviti, s pomočjo ankete in terenskega dela, kako pogosto se cinkov piriton po sprejeti Uredbi še najde v izdelkih za nego lasišča. Katere blagovne znamke so med anketiranci priljubljene, ko pride do težav z lasiščem, kot je prhljaj? Kako ozaveščeni so anketiranci o prisotnosti kemikalij in morebitnem ZnPT v uporabljenih izdelkih? Preučiti smo želeli tudi potencialno toksične učinke ZnPT s pomočjo z različnih ekotoksikoloških eksperimentalnih *in vitro* testov in tako bolje razumeti njegove vplive na vodna okolja.

Na podlagi pridobljenih rezultatov s pomočjo ankete, pregledovanja izdelkov za nego lasišča v trgovinah in eksperimentalnih *in vitro* poskusov na organizmih *Allium cepa L.*, *Lipidium* in *Daphnia magna* lahko ovrednotimo dve hipotezi, ki smo si jih zastavili pred začetkom dela.

**Hipoteza 1: Cinkovega piritona v izdelkih za nego las ne najdemo več pogosto in je prisoten v manj kot 20 % vseh pregledanih izdelkov, ki so v uporabi.**

Na podlagi rezultatov, pridobljenih od anketirancev in terenskega pregledovanja šamponov, namenjenih problematičnemu lasišču in lasem, lahko **hipotezo 1 potrdimo**. V anketi smo sodelujoče povprašali o blagovnih znamkah, ki jih uporabljajo zaradi težav, kot je prhljaj, oz. katere izdelke bi uporabljali, če bi imeli težave. Pridobili smo tudi podatke o blagovnih znamkah, ki jih povezujejo z besedo prhljaj. V trgovinah in na spletnih straneh smo pregledali sestavine šamponov vseh blagovnih znamk, ki so jih navedli anketiranci. Ugotovili smo, da blagovne znamke, ki so bile med anketiranci največkrat izbrane, niso vsebovale kemikalije cinkov piriton. Če povzamemo prisotnost ZnPT v izdelkih na terenu, ugotovimo, da je bila vsebnost ZnPT v letu 2022 definitivno nižja od 20 %, medtem ko v letu 2023 na terenu ZnPT praktično nismo več našli. Prisotnost sestavine ZnPT na spletu bi bilo smiselno preveriti pri spletnemu ponudniku oz. blagovni znamki. Torej hipoteza drži, da v izdelkih za nego las ne najdemo več pogosto ZnPT in je prisoten v manj kot 20 % vseh pregledanih izdelkov, ki se uporabljajo med anketiranci.

**Hipoteza 2: Cinkov piriton povzroča akutne toksične učinke na izbranih testnih organizmih in njegov vpliv s koncentracijo narašča.**

Z opravljenimi eksperimentalnimi metodami lahko **hipotezo 2 delno potrdimo**. Toksični učinki ZnPT na *Allium cepa L.* se skozi vse tri meritve (3. dan, 5. dan in 7. dan) postopoma dobro opazi – višja koncentracija ZnPT ima večji zaviralni učinek na rast organizma. Ta pojav je najbolj izrazit ob primerjavi najnižje koncentracije (1 nM) z najvišjo (100 µM), saj se pri zadnji meritvi (7. dan) v povprečju dolžine koreninic razlikujejo kar za 101 %.

Prav tako smo toksičen vpliv z naraščajočo koncentracijo ugotovili na vodnih bolhah *Daphnia magna*. Kako zelo toksičen vpliv ima ZnPT na tovrstne vodne organizme se je pokazalo že pri

izpostavitvi po 24 urah, kjer smo pri najvišjih treh koncentracijah (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$ ) zaznali 100 % umrljivost izpostavljenih bolh v obeh paralelkah. Koncentracija 100 nM je bila prav tako že po 24 urah precej blizu območja letalne doze 50 (LD50), po 48 urah pa je že presegala LD50 oz. negibnih je bilo kar 65 % bolh. Pri koncentraciji 1 nM in 10 nM se je število negibnih bolhic zmanjševalo vzporedno z nižanjem koncentracije.

Če analiziramo *Lipidium* test, vidimo, da kaljenje oz. rast koreninic z višanjem koncentracije postopoma ne upada. Opazili smo, da imajo najvišje tri koncentracije vseeno manjši zaviralni učinek na tovrstni organizem. Vendar pa opazimo večji zaviralni učinek pri koncentraciji 1 nM in 10 nM že po 48 urah izpostavljenosti. Po 72 urah so pa rezultati najnižje (1 nM) in najvišje (100  $\mu\text{M}$ ) koncentracije zelo podobni, saj se dolžina poganjkov razlikuje le za 6 %. Na takšne rezultate lahko vpliva marsikaj. Tu bi lahko upoštevali biološko napako, morda so bila nekatera semena malo bolj stara in druga bolj mlada, lahko so bila posamezna semena mehansko poškodovana, različnih velikosti ipd., ali pa ZnPT nima večjega toksičnega vpliva na tovrstni organizem.. V takšnih primerih je zato treba poskuse večkrat ponoviti v več paralelkah za bolj natančne in zanesljive rezultate.

Lahko torej delno potrdimo hipotezo 2, saj cinkov piriton povzroča akutne toksične učinke na izbranih organizmih za test toksičnosti, kot sta *Allium cepa L.* in *Daphnia magna*, saj vpliv na njih s koncentracijo narašča. Izjema v tem primeru je *Lipidium* test, kjer učinkov nismo uspeli natančno in pričakovano ovrednotiti.



## 6 POVZETEK

V diplomskem delu smo raziskovali kemijske lastnosti cinkovega piritiona (ZnPT), njegovo uporabo in njegov potencialno toksični učinek na človeka in okolja, saj se uporablja v raznih izdelkih za problematično lasišče in v premazih plovil za preprečevanje kopičenja organizmov na trupu plovila. Za boljše razumevanje njegovih vplivov na vodne organizme in za ugotavljanje prisotnosti ZnPT v kozmetičnih izdelkih za nego las smo uporabili eksperimentalne metode na organizmih *Allium cepa L.*, *Lipidium* in *Daphnia magna*, sestavili anketo in na terenu pregledali šampone, ponujene na slovenskih trgih za težave s prhljajem ali luskavico.

Z rezultati ankete smo ugotovili, da ima med 207 sodelujočimi težave s prhljajem kar 30 %, z luskavico pa 3,4 %. Prav tako smo pridobili imena blagovnih znamkah šamponov, ki jih uporabljajo, imena znamk, ki bi jih uporabili ob morebitni težavi, ter imena znamk, ki jih z asociacijo povezujejo s prhljajem. Blagovnim znamkam, ki so jih navedli anketiranci, in znamkam, ki se tržijo za pomoč pri težavnih laseh in lasišču, smo v trgovinah in po spletnih straneh pregledali kemijske sestave. Izkazalo se je, da nobena blagovna znamka, z izjemo dveh, ni vsebovala cinkovega piritiona, kar je bilo pričakovano, saj je EU v okviru *Uredba Komisije (EU) 2021/1902* leta 2021 sprejela, da se uporaba kemikalije ZnPT po 1. marcu 2022 prepove. Čeprav so študije pokazale negativne učinke ZnPT na celično delovanje in toksičen vpliv na dihalni sistem človeka, je, skrb glede negativnih učinkov kozmetičnih izdelkov z vsebnostjo ZnPT na človeka povsem odveč zaradi *Uredbe 1223/2009* in strogih regulacij REACH. Ko pa smo med pregledovanjem najbolj prodajanega šampona proti prhljaju, *Head & Shoulders*, primerjali EU trg z ameriškim, smo naleteli na novo kemikalijo pirokton olamin, ki jo trenutno uporabljajo kot nadomestno kemikalijo cinkovemu piritonu in ki naj bi imela podobne učinke pri negi težavnih las in lasišč. Tako kot za ZnPT bodo v prihodnosti na voljo razne analize in študije tudi za pirokton olamin, ki bodo pripomogle k boljšemu razumevanju lastnosti oz. potencialnih učinkov pirokton olamina na človeka in okolje.

S pomočjo eksperimentalnih ekotoksikoloških testov smo pridobili rezultate, ki so potrdili toksičen vpliv ZnPT na rast in delovanje živih organizmov. Uporabili smo šest različnih koncentracij (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM in 100 µM). Pri testu toksičnosti na *Allium cepa L.* smo opazili upadanje rasti koreninic vzporedno z naraščajočo koncentracijo skozi vse tri meritve. Izjemoma sta izstopali najvišji dve koncentraciji, saj so se meritve pri zadnjih meritvah v primerjavi s kontrolo razlikovale za več kot 50 %. Ob tem lahko trdimo, da ima ZnPT opazne negativne vplive na rast testnega organizma, vendar bolj izrazito v območju od 10 µM do 100 µM.

Prav tako so se drastični rezultati kazali pri vodnih bolhah *Daphnia magna*, saj so pri najvišjih koncentracijah izpostavljene bolhe 100 % poginile že po 24 urah. Najnižji dve koncentraciji sicer nista povzročili večje škode, saj je bilo preživelih bolh po 48 urah pri obeh koncentracijah kar 85 %. Zaskrbljujoče rezultate je pokazala tudi koncentracija 100 nM, saj se je število negibnih bolhic po prvi meritvi gibalo zelo blizu letalne doze 50, po zadnji meritvi pa jo je že presegala. Trdimo lahko, da so tovrstni organizmi zelo občutljivi na prisotnost cinkovega piritiona, predvsem v območju µM (mikromolarne) koncentracije.

Pri testu *Lipidium* so bili rezultati drugačni. Pri tem testu toksičnosti po 48 urah ni bilo tako zelo izrazitega upada rasti pri kalitvi v primerjavi z *Allium cepa* in *Daphnia magna*. Nekaj zaviranja rasti

je bilo zaznanega po 48 urah, saj rezultati niso dosegali ali presegali negativne kontrole, vendar razlika od kontrole do najslabše uspele rasti ni presegala 28 %, pri čemer smo največji učinek zaznali pri najnižji koncentraciji. Po 72 urah so bili rezultati že malo bolj jasni pri zaviranju rasti, kar je opazno pri treh najvišjih koncentracijah (1,  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{M}$ ), vendar se zavirana rast prav tako pokaže pri dveh najnižjih koncentracijah (1 nM in 10 nM). Koncentracija 100 nM je presenetljivo presegala negativno kontrolo (0) kar za 15 %. V tem primeru lahko trdimo, da bi bilo treba izvesti več bodočih analiz v več paralelkah na tovrstni organizem za boljše razumevanje, ali je organizem bolj odporen na ZnPT. Hkrati lahko sumimo tudi na biološko napako, kar pomeni, da bi bilo eksperiment smiselno še vsaj dvakrat neodvisno ponoviti.

## 7 SUMMARY

In the thesis, we investigated the chemical properties of zinc pyrithione (ZnPT), its use and its potentially toxic effect on humans and the environment, as it is used in various products for problematic scalp and in coatings of vessels to prevent the accumulation of organisms on the hull of vessels. To better understand its effects on aquatic organisms and to determine the presence of ZnPT in hair care products, we used the experimental methods *Allium cepa L.*, *Lipidium* and *Daphnia magna*, compiled a survey and field-tested shampoos offered on the Slovenian market for problems with dandruff or psoriasis.

With the results obtained from the survey respondents, we found that among the 207 participants as many as 30 % had problems with dandruff and 3.4 % with psoriasis. We also obtained the names of the brands of shampoos they use, the names of the brands they would use in the event of a problem, and the names of the brands associated with dandruff. We reviewed the chemical composition of the brands cited by the respondents and the brands that are marketed as a remedy for problem hair and scalp in stores and on websites. It turned out that with the exception of two brands, none of them contained zinc pyrithione, which was to be expected since the EU banned the use of the chemical ZnPT after 1<sup>st</sup> March 2022 in accordance with the Commission Regulation (EU) 2021/1902, adopted in 2021. Although studies have shown negative effects of ZnPT on cellular function and toxic effects on the human respiratory system, there should be no concern about humans being harmed by cosmetics containing ZnPT thanks to Regulation 1223/2009 and the strict REACH regulations. However, when reviewing the most commercialized anti-dandruff shampoo, *Head & Shoulders*, we compared the EU and the US market. Here, we came across a new chemical called piroctone olamine, which is currently used as a substitute for zinc pyrithione and is said to have similar effects in the care of problematic hair and scalp. Just as in the case of ZnPT, various analyses and studies will be available for piroctone olamine in the future, which will contribute to a better understanding of the properties and potential effects of piroctone olamine on humans and the environment.

With the help of experimental ecotoxicological tests, we obtained results that confirmed the toxic effect of ZnPT on the growth and functioning of living organisms. Six different concentrations were used (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM and 100 µM). In the *Allium cepa L.* toxicity test, a decrease in root growth was observed in parallel with increasing concentration across all three measurements. The highest two concentrations stood out, as the last measurements differed by more than 50% compared to the control. It can be argued that ZnPT has noticeable negative effects on the growth of the test organism, but they are more pronounced in the range of 10 µM to 100 µM.

Drastic results were also shown for *Daphnia magna* water fleas, with 100% of the exposed fleas dying after only 24 hours at the highest concentrations. The lowest two concentrations did not cause any significant harm, with 85% of the fleas surviving after 48 hours at both concentrations. The 100 nM concentration also showed worrying results, as it was very close to the lethal dose of 50 after the first measurement, and already exceeded it after the last measurement. It can be said that these organisms are very sensitive to the presence of zinc pyrithione, especially in the µM (micromolar) concentration range.

The results of the *Lipidium* test were different. In this 48-hour toxicity test, there was no such pronounced decline in germination growth compared to *Allium cepa* and *Daphnia magna*. Some growth inhibition was detected after 48 hours as they did not reach or exceed the negative control, but the difference from control to worst growth success was not greater than 28%, with the greatest effect seen at the lowest concentration. After 72 hours, the results were slightly clearer for growth inhibition, which was observed at the three highest concentrations (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ ), but growth inhibition was also observed at the two lowest concentrations (1 nM and 10 nM). The concentration of 100 nM was surprisingly superior to the negative control (0) by as much as 15%. In this case, we can argue that it would be necessary to perform several future analyses in several parallels on this type of organism to better understand if the organism is more resistant to ZnPT. At the same time, we can also suspect a biological error, which means that it would make sense to repeat the experiment independently at least two more times.

## 8 LITERATURA

1. Bao V. W.W., Lui G. C.S., Leung K. M. Y. (2014): *Acute and chronic toxicities of zinc pyrithione alone and in combination with copper to the marine copepod Tigriopus japonicus*. Aquatic Toxicology, 157, str. 81–93. Medmrežje: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166445X14002938>
2. Zinc Pyrithione Risk Assessment (2020). US Environmental Protection Agency Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, str.131, USA, Washington.
3. Dallas J. Lorna, Turner A., Bean P. T., Lyons P. B., Jha N. A. (2018): An integrated approach to assess the impacts of zinc pyrithione at different levels of biological organization in marine mussels. Chemosphere, 196, str. 531–539.
4. Drugbank. Medmrežje: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06815>
5. ECHA. Medmrežje: <https://echa.europa.eu/sl/regulations/reach/understanding-reach>
6. ECHA. Medmrežje: <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.033.324>
7. Gallagher G. (2020). How Pyrithione Zinc Is Used in Skin Care. Healthline. Medmrežje: <https://www.healthline.com/health/pyrithione-zinc>
8. Gupta M., Mahajan V. K., Mehta K. S., Chauhan P. S. (2014). Zinc therapy in dermatology: a review. V: Hindawi Publishing Corporation: Dermatology Research and Practice. Himachal Pradesh, 2014, št. 709152, str. 1–11.
9. Güner A., İlhan S. (2020): *Cytotoxic, genotoxic, oxidative, and irritant effects of zinc pyrithione in vitro*. Toxicological & Environmental Chemistry, 102, št. 10, str. 607–623.
10. Holmes A.M., Kempson I., Turnbull T., Paterson D., Roberts M.S. (2018): *Imaging the penetration and distribution of zinc and zinc species after topical application of zinc pyrithione to human skin*. Toxicology and Applied Pharmacology, 343, str. 10–47.
11. Hwang J., Jeong H., Jung Y., Nam K. T., Lim K. M. (2021): Skin irritation and inhalation toxicity of biocides evaluated with reconstructed human epidermis and airway models. Food and Chemical Toxicology, 150, str. 112064.
12. Lamore S. D., Cabello C. M., Wondark G. T. (2009): The topical antimicrobial zinc pyrithione is a heat shock response inducer that causes DNA damage and PARP-dependent energy crisis in human skin cells. Cell Stress Chaperones, 15(3), str. 309–322.
13. Lamore S. D., Wondark G. T. (2011): Zinc pyrithione impairs zinc homeostasis and upregulates stress response gene expression in reconstructed human epidermis. BioMetals, 24, str. 875-890.
14. Mangion S. E., Holmes A. M., Roberts M. S. (2021). Targeted Delivery of Zinc Pyrithione to Skin Epithelia, V: National Library of Medicine: Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, št. 18, str. 9730. Medmrežje: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34575891/>

15. Marcheselli M., Rustichelli C., Mauri M. (2010): Novel antifouling agent zinc pyrithione: determination, acute toxicity, and bioaccumulation in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, št. 11, str. 2583–2592.
16. Marks R., Pearse A. D., Walker A. P. (1985): The effects of a shampoo containing zinc pyrithione on the control of dandruff. *British Journal of Dermatology*, 112, št. 4, str. 415–422.
17. Medmrežje 1: Zinc pyrithione, Wikipedija.: [https://en.wikipedia.org/wiki/Zinc\\_pyrithione](https://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_pyrithione)
18. Medmrežje 2: ACS chemistry for life. Molecule of the Week Archive - Zinc pyrithione, 2014. <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/z/zinc-pyrithione.html>
19. Medmrežje 3: <https://zssszaupnikvzd.si/baza-znanja/obremenitve-pri-delu/kemijske/sistem-razvrscanja-in-oznacevanja-nevarnih-kemikalij/piktogrami-za-nevarnost/piktogrami-o-nevarnosti/>
20. Medmrežje 4: <https://echa.europa.eu/sl/subst>
21. Medmrežje 5: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/psoriasis/symptoms-causes/syc-20355840>
22. Medmrežje 6: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dandruff>
23. Medmrežje 7: <https://dermnetnz.org/topics/seborrheic-dermatitis>
24. Medmrežje 8: <https://www.healthline.com/health/shampoo-seborrheic-dermatitis#otc-shampoos>
25. Medmrežje 9: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/27abae9f-4e6c-11ec-91ac-01aa75ed71a1/language-en>
26. Medmrežje 10: <https://coslaw.eu/omnibus-iv-new-ingredients-banned-in-cosmetics/>
27. Medmrežje 11: [https://echa.europa.eu/sl/cosmetics-prohibited-substances/-/legislationlist/details/EU-COSM\\_PROD-ANX\\_II\\_PROHIB-100.033.324-VSK-G195PC](https://echa.europa.eu/sl/cosmetics-prohibited-substances/-/legislationlist/details/EU-COSM_PROD-ANX_II_PROHIB-100.033.324-VSK-G195PC)
28. Nunes B., Braga M. R., Campos J. C., Gomes R., Ramos A. S., Antunes S. C., Correia A. T. (2015): Ecotoxicological effect of zinc pyrithione in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*. *Ecotoxicology*, 24, str. 1896–1905.
29. Oyama T. M., Saito M., Yonezawa T., Okana Y. (2012): *Nanomolar concentrations of zinc pyrithione increase cell susceptibility to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes*. *Chemosphere*, 87, št. 11, str. 1316–1322.
30. Pinto M. (2021): EU Prohibition of Zinc Pyrithione in Cosmetic Products. *Critical catalyst*. Medmrežje: <https://criticalcatalyst.com/eu-prohibition-of-zinc-pyrithione-in-cosmetic-products/>
31. Pubchem. Medmrežje: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zinc-pyrithione>
32. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast). Medmrežje: <https://www.eumonitor.eu/9353000/1/j9vvik7m1c3gyxp/vibn2mp7slr0>
33. Rudolf E., Cervinka M. (2011): *Stress responses of human dermal fibroblasts exposed to zinc pyrithione*. *Toxicology Letters*, 204, št. 2–3, str. 164–173.

34. Sadeghian G., Ziaei H., Nilforoushzadeh M. A. (2011): Treatment of localized psoriasis with a topical formulation of zinc pyrithione. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 20(4), str. 187–90. Medmrežje: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367374/>
35. Soon Z. Y., Jung J. H., Jang M., Kang J. H., Jang M. C., Lee J. S., Kim M. (2019): *Zinc Pyrithione (ZnPT) as an Antifouling Biocide in the Marine Environment—a Literature Review of Its Toxicity, Environmental Fates, and Analytical Methods*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, št. 310. Medmrežje: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-019-4361-0>
36. Štumberger M., Sollner D. M. (2010): Primerjava zakonodaje za varno uporabo kemikalij v EU, ZDA in Japonskem. *Diplomska naloga.*, 2010, str. 87. Medmrežje: <https://repositorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=71034>
37. Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih (prenovitev) (Besedilo velja za EGP); *OJ L 342, 22.12.2009, p. 59–209*. Medmrežje: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/ALL/?uri=celex%3A32009R1223>
38. Uredba o izvajanju Uredbe o kozmetičnih izdelkih, *Ur. l. RS*, št. 61/2013 (79/2023 popr.). Medmrežje: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=URED6502>
39. UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/1902 z dne 29. oktobra 2021 o spremembi prilog II, III in V k Uredbi (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in Sveta glede uporabe nekaterih snovi, ki so razvrščene kot rakotvorne, mutagene ali strupene za razmnoževanje, v kozmetičnih izdelkih; Medmrežje: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1902>
40. Zakon o kozmetičnih proizvodih. *Ur. l. RS*, št. [110/03](#) – uradno prečiščeno besedilo, [47/04](#) – ZdZPZ in [91/13](#) – ZPVZKozP. Medmrežje: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=ZAKO1378>
41. Zhao Y., Meng F., Ding C., Yu Y., Zhang G., Tzeng C. (2020): *Gender-differentiated metabolic abnormalities of adult zebrafish with zinc pyrithione (ZPT) -induced hepatotoxicity*. *Chemosphere*, 257. Medmrežje: <https://sci-hub.se/10.1016/j.chemosphere.2020.127177>

## 9 PRILOGE

### Priloga 1: Anketni vprašalnik

#### Ugotavljanje naših navad pri uporabi šamponov za nego las

Pozdravljeni,

sem Špela, absolventka Fakultete za varstvo okolja. V okviru svojega diplomskega dela preučujem vsebnost različnih kemikalij v izdelkih za nego las, predvsem v šamponih, s

poudarkom na izdelkih za nego suhega lasišča. Z anketo želim pridobiti podatke o naših navadah glede dnevne nege las in uporabe komercialnih šamponov.

Z vašo pomočjo bom lahko ocenila potencialno uporabo kemikalij za nego las in lažje izbrala tisto kemikalijo, za katero bom v laboratoriju preverila njeno strupenost in ocenila njene vplive na zdravje okolja in ljudi.

Anketa je kratka, enostavna in anonimna!

Hvala za vaš čas in pomoč, saj mi s tem omogočate doseči potrebne rezultate za mojo raziskavo.

Špela

*\* Nakazuje obvezno vprašanje*

#### 1. Spol?

*Označite samo en oval.*

- Moški  
 Ženska

#### 2. Starost? \*

*Označite samo en oval.*

- 10-19  
 20-29  
 30-39  
 40-49  
 50-59  
 Nad 60

#### 3. Kako pogosto na teden umivate lase? \*

*Označite samo en oval.*

- 1x  
 2x  
 3x  
 4x  
 Vsak dan

#### 4. Koliko različnih izdelkov za nego las pri umivanju/negi najpogosteje uporabljate? \*

*Označite samo en oval.*

- 0  
 1  
 2  
 3  
 4 ali več



## Hvastja, Š.: Prisotnost cinkovega piritiona in ugotavljanje njegove potencialne toksičnosti, FVO, Velenje 2023

---

5. Na kaj ste pozorni pri nakupu šampona za lase? (možnih več odgovorov) \*

Izberite vse primerne odgovore.

- Šampon kupim naključno
- Šampon kupujem samo od določene znamke
- Pomemben je vonj šampona
- Vedno pregledam sestavine šampona
- Šampon izberem glede na zahteve mojih las (kodri, suho/mastno lasišče, barvani lasje...)
- Najpogosteje kupim šampon za občutljivo kožo
- Izbiram cenovno ugodnejše izdelke
- Kupujem samo naravne šampone
- Šampon izdelam sam/a

6. Na katero znamko šampona pomislite, ko slišite besedo PRHLJAJ? (Možno \* je več odgovorov)

Izberite vse primerne odgovore.

- Head & Shoulders
- Kerastase
- Dercos
- Olaplex
- L'oreal
- Subrina
- Subrina Recept
- Alverde
- Balea
- Naturavit
- Drugo: \_\_\_\_\_

7. Imate morda težave s prhljajem ali z luskvico? \*

Označite samo en oval.

- Da, s prhljajem
- Da, z luskvico
- Ne

8. Ali zaradi zgoraj omenjenih težav uporabljate določen šampon? Kateri? (Celotno ime šampona, primer: Head & Shoulders Menthol fresh)

Označite samo en oval.

- Nimam težav.
- Ne uporabljam šampona namenjenega za mojo težavo
- Drugo: \_\_\_\_\_

9. Se vam zdi, da komercialni šamponi uporabljajo veliko kemikalij?

Označite samo en oval.

- Da
- Ne

10. Koliko kemikalij po vašem mnenju je povprečno zapisanih med sestavinami komercialnih šamponov? \*

Označite samo en oval.

- Do 10
- Med 10 in 20
- Med 20 in 30
- Več kot 30

11. Soglasje za obdelavo osebnih podatkov \*

Osebnostne podatke, ki nam jih boste posredovali, bomo obdelali v skladu s pogoji iz Uredbe (EU) 2016/679 Evropskega parlamenta in Sveta. Posredovane osebnostne podatke bo Fakulteta za varstvo okolja uporabila za izdelavo izobraževalnih gradiv, organizacijo izobraževalnih spletnih seminarjev in obveščanje o svojih projektih dejavnostih. Soglasje lahko prekličete na [info@fvo.si](mailto:info@fvo.si).

Označite samo en oval.

- Se strinjam

Hvala, ker ste izpolnili anketo! :)

**Priloga 2: Povzetek meritev Allium testa s splošnimi statističnimi parametri**

DAN	PARAMETER	K	POZ K	ZnPT					
		0,1 % DMSO v dH2O	0,1M HCl	1 nM	10n M	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM
<b>3</b>	Povprečna dolžina korenin (PDK) (cm)	1,903	0,047	1,749	1,615	1,717	2,004	0,926	0,549
	PDK glede na kontrolo (%)	<b>100,0 %</b>	<b>2,5 %</b>	<b>91,9 %</b>	<b>84,9 %</b>	<b>90,2 %</b>	<b>105,3 %</b>	<b>48,6 %</b>	<b>28,8 %</b>
	MIN	0,600	0,000	1,000	0,600	0,600	1,100	0,300	0,300
	MAX	2,900	0,200	2,500	2,500	2,800	2,900	1,900	0,900
	MEDIANA	2,000	0,050	1,900	1,750	1,700	1,900	0,800	0,500
	SD	0,529	0,055	0,480	0,557	0,678	0,500	0,447	0,152
	SD (%)	28 %	118 %	27 %	34 %	39 %	25 %	48 %	28 %
	SE	0,089	0,009	0,081	0,094	0,115	0,085	0,076	0,026
SE (%)	8,9 %	0,9 %	8,1 %	9,4 %	11,5 %	8,5 %	7,6 %	2,6 %	
<b>5</b>	Povprečna dolžina korenin (PDK) (cm)	3,026	0,050	3,046	2,786	2,771	2,948	1,180	0,589
	PDK glede na kontrolo (%)	<b>100,0 %</b>	<b>1,7 %</b>	<b>100,7 %</b>	<b>92,1 %</b>	<b>91,6 %</b>	<b>97,4 %</b>	<b>39,0 %</b>	<b>19,5 %</b>
	MIN	1,400	0,000	1,300	1,400	1,400	1,500	0,500	0,200
	MAX	4,600	0,600	5,000	4,500	4,600	4,400	3,200	1,400
	MEDIANA	3,000	0,000	3,000	2,800	2,600	2,800	1,000	0,600
	SD	0,831	0,136	0,840	0,973	0,972	0,782	0,715	0,295
	SD (%)	27 %	271 %	28 %	35 %	35 %	27 %	61 %	50 %
	SE	0,140	0,023	0,142	0,164	0,164	0,132	0,121	0,050
SE (%)	14,0 %	2,3 %	14,2 %	16,4 %	16,4 %	13,2 %	12,1 %	5,0 %	
<b>7</b>	Povprečna dolžina korenin (PDK) (cm)	3,588	0,051	4,241	4,171	3,760	3,670	1,549	0,614
	PDK glede na kontrolo (%)	<b>100,0 %</b>	<b>1,4 %</b>	<b>118,2 %</b>	<b>116,3 %</b>	<b>104,8 %</b>	<b>102,3 %</b>	<b>43,2 %</b>	<b>17,1 %</b>
	MIN	1,600	0,000	1,300	1,000	1,600	1,700	0,200	0,300
	MAX	5,700	0,600	5,900	6,200	8,400	6,300	3,800	1,600
	MEDIANA	3,450	0,000	4,400	4,300	3,700	3,800	1,300	0,500
	SD	1,188	0,136	1,159	1,076	1,310	0,902	1,012	0,333
	SD %	33 %	264 %	27 %	26 %	35 %	25 %	65 %	54 %
	SE	0,201	0,023	0,196	0,182	0,221	0,152	0,171	0,056
SE (%)	20,1 %	2,3 %	19,6 %	18,2 %	22,1 %	15,2 %	17,1 %	5,6 %	

**Priloga 3: Povzetek meritev Lipidium testa s splošnimi statističnimi parametri**

DAN	PARAMETER	K	POZ K	ZPT					
		0,1 % DMSO v dH <sub>2</sub> O	0,1M HCl	1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	100 µM	100 µM
48 h	Povprečna dolžina korenin (PDK) (cm)	1,435	0,113	1,095	1,160	1,350	1,290	1,308	1,170
	PDK glede na kontrolo (%)	<b>100 %</b>	<b>8 %</b>	<b>76 %</b>	<b>81 %</b>	<b>94 %</b>	<b>90 %</b>	<b>91 %</b>	<b>82 %</b>
	MIN	0,600	0,000	0,100	0,000	0,400	0,200	0,050	0,500
	MAX	2,600	0,700	1,800	1,700	2,300	1,900	2,100	2,000
	MEDIANA	1,300	0,100	1,100	1,200	1,450	1,400	1,450	1,200
	SD	0,430	0,164	0,384	0,386	0,486	0,499	0,556	0,383
	SD (%)	30 %	146 %	35 %	33 %	36 %	39 %	43 %	33 %
	SE	0,096	0,037	0,086	0,086	0,109	0,112	0,124	0,086
	SE (%)	10 %	4 %	9 %	9 %	11 %	11 %	12 %	9 %
72 h	Povprečna dolžina korenin (PDK) (cm)	2,365	0,128	1,715	2,163	2,720	2,216	2,300	1,595
	PDK glede na kontrolo (%)	<b>100,0 %</b>	<b>5,4 %</b>	<b>72,5 %</b>	<b>91,5 %</b>	<b>115,0 %</b>	<b>93,7 %</b>	<b>97,3 %</b>	<b>67,4 %</b>
	MIN	1,200	0,000	0,500	1,300	0,700	0,300	1,000	0,800
	MAX	4,400	0,700	2,700	3,000	3,900	3,000	4,000	2,500
	MEDIANA	2,200	0,100	1,750	2,100	2,800	2,500	2,350	1,600
	SD	0,833	0,163	0,692	0,507	0,887	0,860	0,819	0,457
	SD (%)	35 %	128 %	40 %	23 %	33 %	39 %	36 %	29 %
	SE	0,186	0,036	0,155	0,113	0,198	0,192	0,183	0,102
	SE (%)	19 %	4 %	15 %	11 %	20 %	19 %	18 %	10 %