

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA JERAS

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SANDRA JERAS

DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV V VZORCIH NARAVNE KOZMETIKE Z
REDUKCIJO 2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZILA

DETERMINATION OF ANTIOXIDANTS IN THE SAMPLES OF NATURAL
COSMETICS WITH THE REDUCTION METHOD OF 2,2-DIPHENYL-1-
PICRYLHYDRAZYL

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku za potrpežljivost, pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi družini, posebjaj moji mami in partnerju za podporo in vzpodbudo pri doseganju tega cilja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala, pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Janeza Mravljaka.

Sandra Jeras

Ljubljana, januar 2017

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Tomaž Vovk

Članica diplomske komisije: doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž

KAZALO

1. UVOD	1
1.1 ANTIOKSIDANTI	1
1.1.1 ENDOGENI ANTIOKSIDANTI	1
1.1.2 EKSOGENI ANTIOKSIDANTI	3
1.2 NARAVNA KOZMETIKA	4
1.2.1 CERTIFIKATI ZA NARAVNO KOZMETIKO	5
1.2.2 NARAVNI ANTIOKSIDANTI V KOZMETIKI	7
1.2.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE Z METODO DIFENILPIKRILHIDRAZILA	8
Slika 1: Sprememba barve pri redukciji DPPH	8
3. MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1. REAGENTI IN TOPILA	11
3.1.2. LABORATORIJSKI MATERIAL	11
3.1.3. LABORATORIJSKA OPREMA	11
3.1.4 VZORCI - IZBRANI KOZMETIČNI IZDELKI	11
Slika 2: Vzorec 1: Effeto lifting krema za obraz s karitejevim maslom, hialuronsko kislino in izvlečki lotusa	12
Slika 3: Vzorec 2: Vlažilna krema za obraz z izvlečkom črnega riža in oljem riževih otrobov	13
Slika 4: Vzorec 3: Rdeči čaj balzam za po britju z hialuronsko kislino	13
Slika 5: Vzorec 4: Ekstrabogata dnevna krema za obraz	14
Slika 6: Vzorec 5: Vital Q10 dneva krema proti gubam Rich	15
Slika 7: Vzorec 6: Terra Naturi AB 45 Regeneracijska dnevna krema	16
Slika 8: Vzorec 7: Cien dnevna krema Q10	17
Slika 9: Vzorec 8: Dnevna in nočna krema proti gubam s pro-retinolom in ekstraktom iz Goji jagod	18
Slika 10: Vzorec 9: Intenzivna dnevna in nočna krema proti gubam s pro-retinolom in ekstraktom Goji jagod	19
Slika 11: Vzorec 10: Ultra bogata krema za obraz z Aloe Vera	20
3.2. EKSPERIMENTALNI DEL	20
3.2.1. MERJENJE GOSTOTE KOZMETIČNIH IZDELKOV	20
3.2.2. PRIPRAVA RAZTOPINE DPPH	21

3.2.3. PRIPRAVA VZORCEV	22
3.2.4. MERJENJE ABSORBANCE	24
4. REZULTATI.....	26
4.1. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE.....	26
4.1.1. Vzorec 1	26
Slika 12: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 1	26
4.1.2. Vzorec 2	27
Slika 13: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 2.	27
4.1.3. Vzorec 3	28
Slika 14: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 3.	28
4.1.4. Vzorec 4	28
Slika 15: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 4.	29
4.1.5. Vzorec 5	29
Slika 16: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 5.	30
4.1.6. Vzorec 6	30
Slika 17: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 6.	31
4.1.7. Vzorec 7	31
Slika 18: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 7.	32
4.1.8. Vzorec 8	32
Slika 19: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 8.	33
4.1.9. Vzorec 9	33
Slika 20: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 9.	34
4.1.10. Vzorec 10	34
Slika 21: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 10.	35
5. RAZPRAVA	36
Slika 22: graf rezultatov analize. Na abscisni osi je mesto, ki ga je vzorec zasedel in na ordinatni osi koncentracija EC_{50} (mg/mL).....	37
5.1. Vzorec 1: Effeto lifting krema za obraz s karitejevim maslom, hialuronsko kislino in izvlečki lotusa.....	37
5.2. Vzorec 2: Vlažilna krema za obraz z izvlečkom črnega riža in oljem riževih otrobov.....	38
5.3. Vzorec 3: Rdeči čaj balzam za po britju s hialuronsko kislino	38
5.4. Vzorec 4: Ekstrabogata dnevna krema za obraz	39
5.5. Vzorec 5: Vital Q10 dnevna krema proti gubam Rich	40
5.6. Vzorec 6: Regeneracijska dnevna krema.....	41

5.7. Vzorec 7: Dnevna krema - Q10.....	41
5.8. Vzorec 8: Dnevna in nočna krema proti gubam s PRO-retinolom in ekstraktom iz goji jagod 35+.....	42
5.9. Vzorec 9: Intenzivna dnevna in nočna krema proti gubam s PRO-Retinolom in ekstraktom Goji jagod 50+	43
5.10. Vzorec 10: Ultra bogata krema za obraz z Aloe vero	43
7. VIRI.....	47

POVZETEK

Človeško telo je ves čas izpostavljeno najrazličnejšim zunanjim in notranjim dejavnikom, ki v telesu povzročajo nastanek radikalov. Radikali so reaktivne spojine, ki povzročajo številne poškodbe celic. Prva vidna poškodba je staranje kože. Da do neželjenih sprememb ne pride, so v telesu prisotni antioksidanti, ki upočasnijo ali preprečijo reakcije oziroma oksidacije, s tem, ko reagirajo z radikali. Za diplomsko nalogo smo si izbrali osem naravnih kozmetičnih izdelkov (dva podprta s certifikatom o naravni kozmetiki) in dva kozmetična izdelka za nego obraza. Izbranim izdelkom smo pomerili antioksidativno kapaciteto z metodo redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila. Rezultate smo ovrednotili z parametrom efektivne koncentracije (EC_{50}) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila in izdelke primerjali med sabo. Preučevali smo sestavo kozmetičnih izdelkov in preverili katere naravne sestavine (rastlinska olja, masti in izvlečki) so pripomogle k antioksidativnem delovanju kozmetičnih izdelkov. Izkazalo se je, da imajo naravni kozmetični izdelki dodanih več rastlinskih olj, masti ali izvlečkov in se uvrščajo na prva mesta po antioksidativni kapaciteti (EC_{50} od 2,47 mg/mL do 10,304 mg/mL). Rastlinski izvlečki in njihove primesi so prispevale k antioksidativnem delovanju kozmetičnih izdelkov. Najbolje se je izkazal vzorec vlažilne kreme, ki je vseboval kar sedem sestavin rastlinskega izvora. Poleg tega pa ni vseboval parabenov, silikonov in umetnih barvil.

Ključne besede: antioksidanti, antioksidativna kapaciteta, naravni kozmetični izdelki, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ABSTRACT

The human body is commonly exposed to different external and internal factors, that in human body can cause irreparable consequences, like free radicals. Radicals are reactive compounds, that cause many cell damages. The first visible damage is skin ageing and wrinkles. In order to avoid this consequences, antioxidants are normally present in body to slow down or to prevent the reaction of oxidation. For the thesis, we choose eight samples of natural cosmetic products (two of them were supported by certificate of natural cosmetics) and two samples of cosmetic products for facial care. We measured the antioxidant capacity with the reduction method of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) on the selected products. The results were evaluated with the parameter EC_{50} and the samples were compared with each other. Based on the results we have studied the composition of cosmetics products and analyze which natural ingredients (vegetable oils, fats and extracts) have contribute to the antioxidant capacity. It turns out that, natural cosmetic products had more vegetable oils, fats and extracts. That helped them to achieve first places of all cosmetics products after the analysis (EC_{50} from 2,47 mg/mL to 10,304 mg/mL), because the antioxidant capacity of these products was the highest. The moisturizing cream was the best, because of seven vegetable oils or extracts. Anyway it also didn't contain any parabens, silicones or synthetic coloring agents, that we try to avoid nowadays.

Key words: antioxidants, antioxidant capacity, natural cosmetic products, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay

1. UVOD

1.1 ANTIOKSIDANTI

Človeško telo je skozi celotno življenje izpostavljeno različnim oksidativnim dejavnikom (1). Da pa le ti v celicah ne povzročajo nepopravljivih posledic, so v njih prisotni antioksidanti. Antioksidanti so snovi različnega izvora, ki že v nizkih koncentracijah upočasnijo, preprečijo ali odstranijo radikalsko sprožene reakcije oziroma oksidacije (2). Antioksidant svoj elektron ali vodikov atom odda radikalu, ki tako postane nereaktiven. Posledično se antioksidant sam pretvori v radikal, ki je stabilnejši in manj agresiven do okolice (3, 4). Antioksidanti so lahko zunanega (eksogenega) ali notranjega (endogenega) izvora. Tako antioksidanti endogenega, kot eksogenega, izvora preprečijo oksidacijo substratov in preprečujejo nastanek oksidativnega stresa. Endogeni so encimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation -peroksidaza) in nizkomolekulske spojine (glutation, bilirubin, koencim Q in melatonin), eksogene pa v naše telo vnašamo s hrano (fenolne spojine, karotenoidi, vitamin C in vitamin E). Tako je naše telo stalno odvisno od njihove prisotnosti v hrani, njihove resorpcije iz prebavil in od njihove stabilnosti na jetrne encime (5). Preučevanje antioksidantov je pokazalo, da ni enega glavnega antioksidanta, ampak morajo biti stalno v pripravljenosti vsi. Antioksidanti ščitijo kožo pred škodljivimi učinki, ki jih imajo reaktivne kisikove in dušikove spojine (36). V kozmetične izdelke je smiselno dodajati antioksidante, kjer imajo dvojno vlogo. Lahko ščitijo druge sestavine v kozmetičnem izdelku ali delujejo kot kozmetično aktivne sestavine. V prvem primeru delujejo kot tehnični antioksidanti, v drugem pa naj bi kot učinkovine z ustreznimi fizikalno - kemijiskimi lastnostmi prešli skozi plasti kože in delovali tam, kjer je to potrebno. Največkrat antioksidanti lahko po lokalnem nanosu dosežejo celice pokožnice in usnjice. Lahko pa tudi preko systemskega obtoka po peroralnem vnosu. Ker pa pri peroralnem vnosu lahko povzročijo systemske učinke v ostalih organih, je lokalni nanos navadno smiselnejši. Priporočljiva je tudi uporaba naravnih, kompleksnih in nepredelanih virov antioksidantov (3).

1.1.1 ENDOGENI ANTIOKSIDANTI

Superoksid dismutaza (SOD) je encim, ki pretvarja superoksidne anione v manj škodljive molekule kisika in vodikovega peroksida. Že v majhnih količinah je zelo učinkovita in je edini poznani encim, ki reagira s superoksidnim radikalom. V večini primerov obvlada ves

superoksid, ki nastane v celici pri normalnem metabolizmu. Pomaga varovati različne celice, ki imajo funkcijo pri zaviranju staranja. V mlajših letih je njegova količina v telesu dvakrat večja kot po štiridesetem letu. SOD za delovanje potrebuje kovinski ion. Odvisno od izoencima je v aktivnem mestu lahko mangan, železo, baker ali nikelj (4, 5).

Glutation- peroksidaza (GPx) je encim s selenocisteinom v aktivnem mestu. Za ustrezno delovanje je potrebna zadostna preskrbljenost organizma s selenom. Njegova funkcija je odstranjevanje vodikovega peroksida in organskih peroksidov. Varuje telo pred lipidno peroksidacijo. GPx je družina več izoencimov, med katerimi se v človeškem organizmu nahajajo od GPx1 do GPx8 (4).

Za zaščito kozmetičnih izdelkov pred oksidacijo in pojavom "žarkosti" uporabljamo kombinacijo peroksidaze in superoksid -dismutaze. Smiselno je, da v kozmetični izdelek vgradimo oba encima, saj se dopolnjujeta v delovanju (3).

Katalaza (CAT) je jetrni encim, katerega funkcija je odstranjevanje vodikovega peroksida in pretvorba le tega do vode in kisika. Tako ščiti celice pred toksičnim vodikovim peroksidom. Najdemo jo v vseh organizmih, ki živijo v prisotosti kisika (bakterije, rastline in živali). Je zelo pomemben encim, ker ščiti celice pred reaktivnimi kisikovimi spojinami, ki povzročajo oksidativne poškodbe. Sestavljena je iz štirih podenot, ki imajo hemsko vezano železo v aktivnih mestih. Nahaja se ekstracelularno, v celicah pa predvsem v peroksisomih, manj v mitohondrijih (4, 7).

Glutation (GSH) je pomemben antioksidant v rastlinah, živalih, glivah, nekaterih bakterijah in arhejah. Sposoben je preprečiti poškodbe celic, ki bi nastale zaradi reaktivnih kisikovih spojin, kot so peroksidi, lipidni peroksidi in težke kovine. Deluje kot reducent, ki lahko neposredno reagira z radikali ali pa vstopa v encimsko katalizirane redukcije, kot kelator kovinskih ionov in kot nukleofil, ki reagira z reaktivnimi elektrofilii. Varuje pred boleznimi srca, sivo očesno mrežo in astmo. Prisoten je v vseh zdravih celicah, a žal z leti njegova sinteza slabi. V človeškem telesu je pomemben kot substrat za glutation-peroksidazo, za kovalentno vezavo na ksenobiotike ter pri prenosu aminokislin skozi membrane. Prav tako je eden najmočnejših antioksidantov v našem telesu (4, 6). Uporabljamo ga za zaščito kozmetičnih izdelkov pred oksidacijo in za zaščito kože pred oksidativnim stresom (3, 39).

Bilirubin ima to možnost, da deluje kot antioksidant. Čeprav v primeru povečane koncentracije bilirubina ob rojstvu otroka povzroča zlatenico, so zadnje raziskave pokazale, da je fiziološka prisotnost bilirubina vseeno pomembna, saj lahko odstranjuje radikale in singletni kisik ter tako ščiti možgane pred oksidativnimi poškodbami (8). Bilirubin je metabolit rumene barve, ki nastane iz hema. Veže se na albumin, ki ga transportira v jetra in tako varuje albumin pred reaktivnimi spojinami. Sam po sebi je precej lipofilen, zato je večinoma v membranah (4).

Koencim Q nastopa v dihalni verigi v mitohondrijih in je v njih pomemben pri prenosu elektronov. Pogosto ga uporabljamo v prehranskih dopolnilih (4). Drugo ime za koencim Q je tudi ubikinon (oksidirana oblika) oziroma ubikinol (reducirana oblika). Je derivat benzokinona in je strukturno podoben vitaminu K. V celičnih membranah je prisoten ubikinol, reducirana oblika ubikinola, ki prav tako deluje kot antioksidant. Ubikinon in ubikinol uporabljamo zlasti kot antioksidanta za zaščito kože pred oksidativnim stresom. Znani pa so tudi drugi ugodni učinki pri nanosu na kožo, kot so zmanjšanje globine gub in vidno zmanjšanje znakov fotostaranja (3).

1.1.2 EKSOGENI ANTIOKSIDANTI

Fenolne spojine so skupina največjih in zelo raznolikih rastlinskih sekundarnih metabolitov. Glede na strukturne značilnosti jih razdelimo na fenolne kisline, flavonoide, kumarine, stilbene in tanine (1). So skoraj povsem netopne v vodi, dobro pa se raztapljajo v nepolarnih topilih. Zato so primerni za zaščito lipidov v kozmetičnih izdelkih (4). Flavonoidi ščitijo pred ultravijoličnimi žarki UVB in so pogosta sestavina prehranskih dopolnil, zaradi dokazanih ugodnih učinkov na patološke procese. Prav tako, pa so dobri lovilci reaktivnih kisikovih zvrsti. Najpomembnejši vir flavonoidov so sadje, zelenjava, med, soja, zeleni čaj, rdeče vino in nekatere zdravilne rastline. Fenolne kisline prav tako najdemo v rastlinski hrani. Razdelimo jih na derivate benzojske in derivate cimetine kisline (1, 41).

Karotenoidi so splošno razširjeni v rastlinskem in živalskem svetu, človeški organizem pa jih mora v telo vnesti s hrano. Bogat vir karotenoidov je tista hrana (sadje in zelenjava), ki je močnejše obarvana (1, 3). V kozmetologiji sta najbolj pomembna β -karoten in likopen. Delujejo kot lovilci radikalov in preprečujejo nastanek posledic oksidativnega stresa. Nekateri karotenoidi pa so tudi prekursorji vitamina A; to so α - in β -karoten. Karotenoidi

so tudi dobri pokazatelji stanja kože, saj njihovo pomanjkanje kaže na bolezn ali slabo prehranjenost organizma (37, 38) .

Vitamin C ali L-askorbinska kislina blagodejno vpliva na človeški organizem in velja za enega najučinkovitejših naravnih antioksidantov. Je vodotopna spojina, zato se iz telesa hitro izloči (1). S staranjem njegova količina v koži upada. Vitamin C inhibira sintezo melanina in se je sposoben regenerirati s pomočjo encimov ali drugih antioksidantov (3).

Vitamin E je najpomembnejši v maščobah topen antioksidant, ki preprečuje staranje in umiranje celic (1). Zmanjšuje poškodbe kože nastale zaradi škodljivega ultravijoličnega sevanja, gladi površino kože, povečuje navlaženost rožene plasti, zavira vnetja, spodbuja obnavljanje celic ter pospeši celjenje ran (3). Je najpogosteje uporabljeni naravni antioksidant, ki se uporablja v formulacijah za topikalni nanos. Vitamin E predstavlja družino osmih izomerov, štirih tokoferolov (α -, β -, γ -, δ - oblika) in štirih tokotrienolov (α -, β -, γ -, δ - oblika) (9). Med najpomembnejšimi tokoferoli je α -tokoferol, ki ima najmočnejše izraženo antioksidativno delovanje. Ravno zaradi svojih antioksidativnih lastnosti ga imenujemo tudi vitamin mladosti (1). Znano je tudi, da je tokoferol močnejši antioksidant kot njegov ester, tokoferol acetat, vendar ga zaradi slabe topnosti v vodi, nestabilnosti na svetlobi in možne iritacije na koži, ne uporabljamo direktno v kozmetičnih izdelkih, ampak se raje poslužujemo njegovega estra (40).

Vitamin C je torej polarna molekula, zato opravlja svoje delo v vodnih predelih celice, medtem, ko vitamin E zaradi svoje izrazite lipofilnosti, to počne v lipofilnih okoljih membran (3).

1.2 NARAVNA KOZMETIKA

V Sloveniji na področju kozmetičnih izdelkov velja Uredba o kozmetičnih izdelkih ES 1223/2009, ki že na začetku pove, kaj kozmetični izdelek sploh je: "Kozmetični izdelek je katerakoli snov ali zmes, namenjena stiku z zunanjimi deli človeškega telesa (povrhnjico, lasiščem, nohti, ustnicami in zunanjimi spolnimi organi) ali z zobmi in sluznico ustne votline zaradi izključno ali predvsem njihovega čiščenja, odišavljenja, spreminjanja njihovega videza, njihovega varovanja, ohranjanja v dobrem stanju ali korekcije telesnega vonja" (3).

Področje naravne kozmetike pa ni posebej urejeno, saj uredba ne vsebuje nobenega člena, ki bi se nanašal izrecno na naravno kozmetiko. Tudi evropska kozmetična zakonodaja ne opredeljuje enotne definicije za naravno / organsko kozmetiko. Imamo le priporočila, ki jih je na svoji spletni strani objavilo Evropsko združenje proizvajalcev kozmetičnih izdelkov, včasih znano pod imenom COLIPA. Priporočila tudi na splošno pojasnijo, kaj naravna kozmetika je, ter kaj pomenita izraza naravno in ekološko oziroma bio ali organsko (3).

Posledica neenotne ureditve tega področja pa je pojav različnih standardov in meril za naravno kozmetiko, ki jih sprejemajo akreditirani organi v državah EU. Obstajajo različni certifikati za naravno/organsko/ekološko kozmetiko, ki pa temeljijo na različnih standardih in imajo neenoten sistem označevanja. Na splošno pa kozmetični izdelki, ki so označeni s certifikatom za organsko/naravno/ekološko kozmetiko ne smejo vsebovati sinteznih barvil in dišav, določenih konzervansov, etoksiliranih spojin, silikonov in njihovih derivatov, gensko spremenjenih sestavin, parafina in drugih naftnih derivatov. Prav tako ne smejo biti testirani na živalih, proizvodni proces mora biti prijazen do okolja, ovojnina kozmetičnih izdelkov pa mora biti narejena iz okolju prijaznih materialov (3).

1.2.1 CERTIFIKATI ZA NARAVNO KOZMETIKO

BDIH (Der Bundesverband der Industrie- und Handelsunternehmen) predstavlja nemško in industrijsko trgovsko združenje s sedežem v Nemčiji, ki obstaja že 65 let. Leta 1966 so s sodelovanjem, s takrat vodilnimi proizvajalci naravne kozmetike oblikovali smernice za naravno kozmetiko, upoštevajoč pričakovanja potrošnikov (19, 20). BDIH certifikat lahko dobi izdelek, ki vsebuje sestavine iz ekološke pridelave. Pri pridobivanju drugih sestavin pa so dovoljeni samo najbolj enostavni fizikalno-kemijski postopki. Končnih izdelkov pa ne smemo preizkušati na živalih (3).

ECOCERT so ustanovili v Franciji, da bi spodbudili ekološko kmetijstvo. Danes deluje v več kot 80 državah sveta, certifikati za naravno kozmetiko pa se podeljujejo od leta 2002. Predpisuje se uporaba naravnih, biološko razgradljivih in ekološko pridelanih sestavin, ter okolju prijaznih fizikalno-kemijskih postopkov. Certifikat ECOCERT za naravno kozmetiko opredeljuje tisto, ki vsebuje vsaj 50 % sestavin rastlinskega izvora iz certificirane ekološke pridelave oziroma 5 % vseh sestavin izdelka mora biti ekoloških. Za naravno in ekološko kozmetiko pa mora biti vsaj 95 % sestavin ekološkega porekla oziroma mora biti takšnih sestavin vsaj 10 % vseh sestavin kozmetičnega izdelka (3, 10).

COSMEBIO (Cosmetique charte cosmebio) je francosko združenje za naravno in ekološko kozmetiko (3). Leta 2003 so izdali standarde za ekološko kozmetiko, ki lahko dobi oznako "eco" ali "bio". Oznako "eco" dobijo izdelki, ki vsebujejo vsaj 95 % povsem naravnih sestavin ali sestavin naravnega izvora, vsaj 50 % sestavin rastlinskega izvora, ki so ekološkega porekla, ter vsaj 5% vseh sestavin izdelka, ki so ekološkega porekla. Oznaka bio pa pripada tistim kozmetičnim izdelkom, ki vsebujejo vsaj 95 % povsem naravnih sestavin ali sestavin naravnega izvora, vsaj 95 % sestavin rastlinskega izvora, ki so ekološkega porekla, ter vsaj 10 % vseh sestavin, ki so ekološkega porekla. Vode ne moremo opredeliti kot ekološke sestavine (3).

ICEA (Istituto per la Certificazione Etica ed Ambientale) je inštitut za dodeljevanje certifikatov iz Italije. Izdelki s tem certifikatom prav tako lahko dobijo oznako naravno ali ekološko. Za razliko od drugih certifikatov ta ne predpisuje najmanjše dovoljene količine naravnih sestavin ali največje dovoljene količine sinteznih sestavin. Zahteva pa navedbo, kolikšen delež sestavin je naravnega izvora (3).

SOIL ASSOCIATION je zasebno britansko združenje, ki od leta 2002 podeljuje certifikate kozmetičnim izdelkom. Izdelek lahko pridobi certifikat, če vsebuje najmanj 70 % do 95 % sestavin iz ekološke kmetijske pridelave in največ do 5 % sintetičnih sestavin (3).

COSMOS standard je bil sprejet šest let nazaj v želji po poenotenju zahtev za označevanje naravne in ekološke kozmetike na evropski ravni. Nastalo je s sodelovanjem zgoraj omenjenih certifikatov (BDIH, COSMEBIO, ECOCERT, ICEA, SOIL ASSOCIATION). Standard je začel polno veljati februarja 2014. Vse ustanove te organizacije so po letu 2016 prenehale uporabljati svoje certifikate in COSMOS standard je postal enoten. Oznako COSMOS ORGANIC-ekološki kozmetični izdelek bodo lahko dobili tisti kozmetični izdelki, ki bodo vsebovali vsaj 95 % s fizikalnimi postopki pridobljene naravne sestavine, te pa bodo morale predstavljati vsaj 20 % vseh sestavin glede na celotni izdelek. Pri oznaki COSMOS NATURAL pa ekološki izvor sestavin ne bo obvezen. Niti ga ne bomo smeli nanesti na sprednji del ovojnine, temveč na zadnji del k seznamu sestavin (INCI listi). Za cel standard pa velja, da je prepovedana uporaba nanomaterialov, gensko spremenjenih organizmov, obsevanja z gama in rentgenski žarki ter testiranje na živalih (3).

1.2.2 NARAVNI ANTIOKSIDANTI V KOZMETIKI

Za zaščito kože pred poškodbami, povzročenimi z ultravijoličnim sevanjem in radikali, uporabljamo kozmetične izdelke, ki se nanašajo na kožo in vsebujejo antioksidante. Le te dodamo kozmetičnim izdelkom zaradi njihovega delovanja proti radikalom. Vsi antioksidanti niso stabilni, zato mora biti izbira antioksidantov in njihovih koncentracij optimalna, drugače lahko povzročijo veliko težav v kozmetični formulaciji. Dandanes je uporaba naravnih antioksidantov v kozmetiki bolj zaželjena od uporabe sintetično pridobljenih, saj ekstrakti naravno pridobljenih antioksidantov pogosto vsebujejo zmes naravnih snovi, ki lahko imajo sinergistično delovanje: boljši učinek in manjšo toksičnost. Niso pa nujno vse snovi v zmesi antioksidanti (11).

Znano je, da je koža najbolj zunanji človeški organ, zato nanjo pogosto vplivajo endogeni in eksogeni reaktivni intermediati. Da se koža lahko spopade z neželenimi učinki radikalov, ima svoj obrambni sistem, ki izhaja iz endogenih in eksogenih antioksidantov. Endogeni izhajajo iz melanina, eksogeni pa iz antioksidantov, ki jih nanašamo na kožo ali vnašamo v telo s hrano. Obrambni mehanizem je različen glede na strukturo in funkcijo določenega sloja kože (11).

Naravni antioksidanti so lahko samostojne spojine, zmesi spojin ali rastlinski izvlečki. Predvsem rastlinski izvlečki se danes široko uporabljajo v kozmetičnih izdelkih. Glede na funkcijo antioksidantov jih lahko razdelimo na primarne ali naravne in sekundarne ali sintetične. Razlika oziroma delitev antioksidantov je zasnovana na razlikah v molekularni masi, polarnosti ter topnosti. Naraščajoča uporaba rastlinskih naravnih antioksidantov bi lahko v prihodnosti zamenjala nanos sintetičnih antioksidantov (11, 43).

Ko antioksidanti reagirajo z radikali, se pretvorijo v obliko, v kateri niso več sposobni delovati kot antioksidanti. Da oksidirani produkti lahko delujejo tako kot pred oksidacijo, se morajo obnoviti v svojo prvotno obliko. Antioksidativna mreža je sposobnost antioksidantov, da lahko oksidirano obliko drug drugega obnovijo. Proces je sinergističen in zaščita s strani antioksidativne mreže je vedno močnejša, kot pa je lahko seštevek individualnih zaščit posameznih antioksidantov. Vitamin E, vitamin C in GSH se nahajajo v različnih delih celice in imajo možnost, da reagirajo drug z drugim. Vitamin E je glavni antioksidant, ki ščiti biološke membrane pred lipidno peroksidacijo. Ko se vitamin E pri tem oksidira, nastane radikal vitamina E. Tu nastopi vitamin C, prva linija obrambe, ki

lahko reagira z radikalom vitamina E, tako da se pretvori v askorbilni radikal. Le ta je praktično inerten in se lahko oksidira naprej do dehidroaskorbinske kisline, ki se lahko s pomočjo GSH reducira nazaj v vitamin C (9).

1.2.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE Z METODO DIFENILPIKRILHIDRAZILA

Difenilpikrilhidrazilna (DPPH) metoda je ena izmed največkrat uporabljenih metod za merjenje antioksidativne kapacitete, ker v splošnem velja, da je enostavna, učinkovita in cenovno ugodna metoda. Temelji na uporabi difenilpikrilhidrazilnega radikala, ki je stabilen radikal temno vijolične barve in ima močan absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 512-520 nm (12). Zaradi delokalizacije prostega elektrona po molekuli DPPH se raztopina DPPH v etanolu obarva temno vijolično (13). Ko v raztopino dodamo antioksidativno komponento, radikal DPPH sprejme en elektron ali vodikov atom ter se spremeni v reducirano obliko. Reducirana oblika (difenilpikrilhidrazilnega) radikala pa je obarvana svetlo rumeno (12).

Na sliki 1, lahko na primeru vzorca naravne kozmetike vidimo spremembo difenilpikrilhidrazilnega radikala iz temno vijolične barve v svetlo rumeno, v času 30 minut.



Slika 1: Sprememba barve pri redukciji DPPH

Ob dodatku antioksidativne komponente se DPPH radikal reducira, kar lahko opazimo v spremembi barve raztopine. Velja tudi, da več kot je antioksidativne komponente v vzorcu, več radikala se reducira in v krajšem času lahko opazimo spremembo barve raztopine. Torej večja, kot je vsebnost antioksidanta, več DPPH radikala se pretvori v reducirano obliko in bolj rumeno se obarva raztopina. Ker ob dodatku antioksidanta k DPPH radikal pride do spremembe barve in padca absorbance, lahko antioksidativno kapaciteto določimo spektrofotometrično. Rezultati DPPH metode so podani s parametrom EC_{50} (ang: Efficient

Concentration), ki je definiran kot koncentracija začetnega vzorca z antioksidantom, ki je potrebna za zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50% (12,14). Velja torej, da nižja, kot je vrednost EC_{50} , večja je antioksidativna kapaciteta vzorca (14).

2. NAMEN DELA

V današnjih časih se vedno več govori o naravnem in ekološkem, bodisi o prehrani ali kozmetičnih izdelkih ter o antioksidantih, ki so koristni za zdravje in tudi za kožo. Zato smo na vzorcih naravne kozmetike želeli preveriti, kakšna je celotna efektivna koncentracija (EC_{50}) antioksidantov v kozmetičnih izdelkih, ki večinoma veljajo za naravne. Nekateri kozmetični izdelki svojo "naravnost" oglašujejo že na ovojnicah, drugi ne, ker to informacijo dobimo od prodajalcev ali svetovalcev v trgovini. Dva vzorca sta bila za lažjo končno primerjavo tudi kozmetična izdelka, ki ne spadata med naravno kozmetiko.

Za pridobitev celokupne antioksidativne kapacitete smo uporabili metodo DPPH, ki velja za enostavno, učinkovito in cenovno dostopno. Kozmetičnim izdelkom smo pomerili antioksidativno kapaciteto z UV-VIS spektrofotometrom in spremljali redukcijo fenilpikrilhidrazilnega radikala. Iz izmerjenih absorbanc pri valovni dolžini 517 nm pa smo določali parameter EC_{50} . Na koncu smo vse vrednosti EC_{50} primerjali med sabo in razvrstili kozmetične izdelke glede na antioksidativno kapaciteto.

Pri izbiri kozmetičnih izdelkov smo pazili, da smo izbrali takšne, ki se uvrščajo v skupino naravne kozmetike ali jih uvrščajo sami prodajalci pri svetovanju pri nakupu, ter da so namenjeni uporabnikom različne starosti. Poskušali smo izbrati tudi take vzorce, ki imajo na embalaži naveden certifikat za naravno kozmetiko. Izbrali smo tudi dva vzorca, ki ne spadata med naravno kozmetiko za primerjavo končnih rezultatov. Predvidevali smo, da bodo vzorci namenjeni za mlajše uporabnike vsebovali manj antioksidantov, saj le ti po navadi še ne želijo nege proti gubam, ampak želijo kožo le negovati, vlažiti. Pri teh vzorcih smo pričakovali večji EC_{50} . Pri tistih vzorcih, katerih uporaba je namenjena starejšim pa smo predvidevali, da bodo vsebovali več antioksidantov in bodo zato imeli manjši EC_{50} .

Pri primerjavi kozmetičnih izdelkov med sabo, smo iz deklaracij vzorcev s pomočjo literature ugotavljali, katere sestavine bi lahko bile potencialni antioksidanti.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1. REAGENTI IN TOPILA

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); Sigma-Aldrich (Nemčija)
- etanol; Carlo Erba Reagents (Italija)

3.1.2. LABORATORIJSKI MATERIAL

- merilni valj
- merilne bučke 25 mL
- avtomatske pipete Transferpette 5 mL in 1000 µL; Brand GMBH (Nemčija)
- nastavki za pipete
- mikrocentrifugirke Eppendorf 2 mL
- plastične kivete za UV-VIS spektrofotometer za enkratno uporabo Semimikro 1,5 mL; Brand GMBH (Nemčija)

3.1.3. LABORATORIJSKA OPREMA

- Analitska tehtnica AE-240S; Mettler Toledo (Švica)
- Vodna kopel z zmožnostjo termostatiranja za rotavapor R-205; Büchi Labortechnik AG (Švica)
- Vibracijski stresalnik Vibromix 114 EV; Tehnica (Slovenija)
- laboratorijska centrifuga MiniCentrifuge GMC-060; neoLab (Koreja)
- UV-VIS spektrofotometer Cary 50 Conc; Varian (ZDA)
- Ultrazvočna kopel Iskra PIO

3.1.4 VZORCI - IZBRANI KOZMETIČNI IZDELKI

Pri vzorcih smo na seznamu sestavin kozmetičnega izdelka (INCI listi) z odebeljeno označili vse rastlinske izvlečke ali olja, ki bi (glede na dostopno literaturo) lahko izkazovala kakršnekoli antioksidativne lastnosti. S poševno pisavo pa smo označili druge (tehnične) antioksidante.

1. Bottega Verde: Effeto lifting krema za obraz s karitejevim maslom, hialuronsko kislino in izvlečki lotusa



Slika 2: Vzorec 1: Effeto lifting krema za obraz s karitejevim maslom, hialuronsko kislino in izvlečki lotusa

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnini: "Učinkovit lepotni tretma, ki naredi kožo na obrazu zopet gladko in sijočo ter ima takojšen lifting učinek. Vsebuje karitejevo maslo, biotehnološko hialuronsko kislino in ekstrakt lotusovih cvetov. Krema ima zelo bogato teksturo in je idealna tudi za uporabo ponoči, ko se epidermis sprosti (30)."

Sestavine: Aqua, C12-20 Acid PEG-8 Ester, Caprylic/Capric triglyceride, Ethylhexyl stearate, Isopropyl stearate, Glycerin, Cetearyl alcohol, Glyceryl stearate, PEG-100 stearate, **Butyrospermum parkii butter**, **Triticum vulgare germ oil**, **Nelumbium speciosum extract**, Sodium hyaluronate, Sodium PCA, Phenoxyethanol, Dimethicone, Imidazolidinyl urea, Propylene glycol, Parfum, Glucose, Cinnamyl alcohol, Ethylparaben, Hydroxycitronellal, Disodium EDTA, Methylparaben, Lecithin, Linalool, Lysine, Urea, Glutamic acid, Lactic acid, Glycine, *Isoeugenol*, *Tocopherol*, Allantoin, *Ascorbyl palmitate*, Amyl cinnamal, Potassium sorbate, Sodium benzoate, Citric acid.

2. Bottega verde: Vlažilna krema za obraz z izvlečkom črnega riža in oljem riževih otrobov



Slika 3: Vzorec 2: Vlažilna krema za obraz z izvlečkom črnega riža in oljem riževih otrobov

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnini: "Vlažilen tretma narejen iz posebnega koktejla aktivnih učinkovin rastlin in riževih derivatov, še posebej organskih ekstraktov Venera riža. Rezultat je idealna formula, ki koži vrne vse kar potrebuje za mladosten in svež videz. Že od prve uporabe bo koža izgledala mehkejša in bolj svilena. Izberite to kremo, če želite izdelek brez parabenov, silikonov in umetnih barvil. Narejena je iz visokega deleža rastlinskih derivatov."

Sestavine: Aqua, Cetearyl alcohol, Coco-Caprylate, Glycerine, Mel, Potassium palmitoyl hydrolyzed rice protein, **Sesamum Indicum Seed oil***, **Olea europea oil unsaponifiables**, Cocoglycerides, **Butyrospermum parkii butter***, Cetearyl glucoside, Parfum, Glyceryl stearate, **Prunus amygdalus dulcis oil***, Glycerly laurate, Benzyl alcohol, Ethylhexyl cocate, **Oryzanol**, Oryza sativa starch, Ethylhexylglycerin, Rice bran wax, **Oryza sativa bran oil**, **Oryza sativa extract***, Acacia senegal gum, Benzyl salicylate, Xanthan gum, **Cocos nucifera oil**, Dehydroacetic acid, Citric acid, Sodium hydroxide, Lecithin, Limonene, Geraniol, Citronellol, Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde, *Tocopherol*, Coumarin, Alpha-Isomethyl ionone, *Ascorbyl palmitate*, Hydroxycitronellal, Sodium benzoate, Potassium sorbate.

*Ekološko pridelano

3. Bottega verde: Rdeči čaj balzam za po britju s hialuronsko kislino



Slika 4: Vzorec 3: Rdeči čaj balzam za po britju z hialuronsko kislino

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnini: "Ob redni uporabi pomaga zaščititi kožo in jo naredi bolj odporno na zunanje vplive. Je brez alkohola."

Sestavine: Aqua, Cyclopentasiloxane, **Prunus amygdalus dulcis oil**, Glycerin, Ethylhexyl palmitate, Peg-100 stearate, Aluminium starch octenylsuccinate, Glyceryl, Stearate, Cetearyl alcohol, Dicaprylyl ether, Cyclohexasiloxane, Dimethicone, Octyldodecanol, **Butyrospermum parkii butter**, *Squalane*, **Echium Plantagineum seed oil**, **Helianthus annuus seed oil unsaponifiables**, **Aspalathus linearis leaf extract**, **Cardiospermum halicacabum extract**, Parfum, **Olive oil**, Decyl esters, Phenoxyethanol, Dmdm hydantoin, *Tocopherly acetate*, Xanthan gum, Hydroxyethyl acrylate/sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, Methylparaben, Dimethicone/Vinyl dimethicone crosspolymer, Sodium hyaluronate, Disodium EDTA, Ethylparaben, *Squalene*, Lecithin, Polysorbate 60, Linalool, Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde, Coumarin, Limonene, Hexyl cinnamal, *Tocopherol*, Sodium hydroxide, *Ascorbyl plamitate*, Alpha-isomethyl ionene, Citric acid, Citronellol.

4. Melvita: Ekstrabogata dnevna krema za obraz



Slika 5: Vzorec 4: Ekstrabogata dnevna krema za obraz

Opis oglaševanje izdelka na kozmetični ovojnini: "Ta izjemno bogata krema je neverjetno bogata in učinkovita. Koži daje bleščeč sijaj in gladi prve znake staranja. Primerna je za suho do zelo suho kožo."

Sestavine: Aqua (Water), **Aloe Barbadensis Extract (Aloe Barbadensis Leaf Extract)***, *Squalane*, Glycerin, Caprylic/Capric Triglyceride, **Tilia Cordata Water (Tilia Cordata Flower Water)***, Cetearyl Alcohol, **Sesamum Indicum Oil (Sesamum Indicum (Sesame) See Oil)**, Dicaprylyl Carbonate, Dicaprylyl Ether, Alcohol*, Lauryl Laurate, **Theobroma Cacao Butter (Theobroma Cacao (Cocoa) Seed Butter)***, Cetearyl

Glucoside, **Ximenia Americana Oil (Ximenia Americana Seed Oil)**, Parfum (Fragrance), Magnesium Aluminium Silicate, Cetyl Alcohol, **Hippophae Rhamnoides Oil***, **Mangifera Indica Seed Oil (Mangifera Indica (Mango) Seed Butter)**, **Punica Granatum Seed Oil**, Sodium Benzoate, Glyceryl Dibehenate, Maris Aqua (Sea Water)*, Tribehenin, Xanthan Gum, *Tocopherol*, Galactaric Acid, **Vaccinium Macrocarpon Extract (Vaccinium Macrocarpon (Cranberry) Fruit Extract***, **Hordeum Vulgare Extract***, Manganese PCA, Glyceryl Behenate, Lecithin, Polyglyceryl-3 Diisostearate, **Rubus Idaeus Leaf Extract (Rubus Idaeus (Raspberry) Leaf Extract)***, Citric Acid, **Prunus Armeniaca Kernel Oil (Prunus Armeniaca (Apricot) Kernel Oil)**, **Prunus Domestica Seed Oil**, Sodium Hydroxide, **Lavandula Stoechas Extract**, Glyceryl Stearate, Limonene**, Potassium Sorbate, citronellol**.

* Sestavine iz ekološke pridelave

** Dišavne sestavine naravnega izvora

5. Cadea Vera: Vital Q10 dnevna krema proti gubam Rich



Slika 6: Vzorec 5: Vital Q10 dneva krema proti gubam Rich

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnini: "CV Vital krema s Q10 je bila posebej razvita za potrebe kože po 35. letu starosti. Koencim Q10 ščiti pred staranjem kože zaradi svetlobe, korejski ginseng kožo obnovi in spodbuja elastičnost kože. Z UV zaščito."

Sestavine: Aqua, Glycerin, Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate, C12-15 Alkyl Benzoate, **Glycine Soja Oil**, **Persea Gratissima oil**, Cetearyl alcohol, Sorbitol, **Butyrospermum parkii butter**, *Tocopheryl acetate*, Butylene glycol, Phenoxyethanol, Panthenol, Titanium dioxide (nano), Carbomer, Sodium Cetearyl sulfate, Parfum,

Allantoin, Disodium EDTA, Ethylhexylglycerin, Potassium sorbate, **Panax Ginseng Root Extract**, Alcohol, Alumina, Silica, Sodium polyacrylate, Sodium polyphosphate, Tetrasodium EDTA, Ubiquinone, Butylphenyl methylpropional, Sodium hydroxide, Caprylic/Capric Triglyceride, Limonene, Benzyl Salicylate, Pantolactone, Citral, Citronellol, *Ascorbyl Palmitate*, Citric Acid, *Ascorbic Acid*.

6. Terra Naturi AB 45 Regeneracijska dnevna krema



Slika 7: Vzorec 6: Terra Naturi AB 45 Regeneracijska dnevna krema

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnini: "Koži nad 45 let daje optimalno nego. Visokokakovostno arganovo olje zmanjšuje gubice in ščiti kožo pred radikali. Sojino olje, karitejevo maslo, jojobino olje in glicerin negujejo kožo, ekstrakt granatnega jabolka pa jo oskrbuje z vlažnostjo. Za na ogled spočitno kožo." Za izdelavo Terra Naturi izdelkov je značilno, da ne uporabljajo sintetičnih vonjav in barvil, ne uporabljajo snovi živalskega izvora in snovi na bazi mineralnih olj.

Sestavine: Aqua, **Glycine Soja Oil***, Glyceryl Stearate Citrate, Cetearyl Alcohol, Glyceryl Stearate, **Simmondsia Chinensis Seed Oil***, Glycerin, **Argania Spinosa Kernel Oil***, **Butyrospermum Parkii Butter**, Alcohol*, Parfum**, Sorbic Acid, Xantahn Gum, Potassium Sorbate, Limonene**, Sodium Hydroxide, **Helianthus Annuus Seed Oil**, *Tocopherol*, **Punica Granatum Fruit Extract**, Citral**, Linalool**, Geraniol**, Benzyl Salicylate**.

*sestavine iz kontrolirane biološke pridelave

**sestavine iz naravnih olj

7. CIEN Dnevna krema Q10



Slika 8: Vzorec 7: Cien dnevna krema Q10

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični obojnini: "Nega proti gubam: Liftan™ INTENSIVE s koencimom Q10 in hialuronsko kislino spodbuja samozaščito kožnih celic, zmanjša globino gub in z redno uporabo preprečuje nastajanje novih. Nega proti staranju: kombinacija posebnih UVA/UVB filtrov (ZF4) in vitamin E varuje kožo pred predčasnim staranjem zaradi sonca. Nega: kakovostne sestavine vlažijo kožo in poskrbijo za njeno prožnost in nežnost."

Sestavine: Aqua, Glycerin, Dibutyl Adipate, Cetearyl Alcohol, Propylheptyl Caprylate, Dicaprylyl Carbonate, Titanium Dioxide (Nano), Sodium Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Phenoxyethanol, Dimethicone, Polyisobutane, Panthenol, **Butyrospermum Parkii Butter**, Palmitic Acid, Parfum, Stearic Acid, *Tocopheryl Acetate*, Disodium EDTA, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate, Ethylhexyl Triazone, Sodium Hydroxide, Bis-Ethylhexyloxy-phenol Methoxyphenyl Triazine, Sodium Anisate, Sodium Levulinate, Allantoin, Ethylparaben, Methylparaben, Silica, Benzoic Acid, Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, Caffeine, Dehydroacetic Acid, Caprylyl/Capryl Glucoside, *Ubiquinone*, Sodium Hyaluronate, **Panicum Miliaceum Extract**, Limonene, Linalool, **Chlorella Vulgaris/Lupinus Albus Protein Ferment**, Alcohol Denat, Benzyl Benzoate, Geraniol, Citronellol, *Tocopherol*, *Tannic Acid*, **Coleus Forskohlii Root Extract**, Potassium Sorbate

8. Bottega Verde, Goji Perfect: Dnevna in nočna krema proti gubam s PRO-retinolom in ekstraktom iz Goji jagod 35+



Slika 9: Vzorec 8: Dnevna in nočna krema proti gubam s pro-retinolom in ekstraktom iz Goji jagod

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnini: "Krema z ekstra žametno teksturo in specifičnim delovanjem proti staranju, ki ohranja kožo mladostno in preprečuje nastanek finih gub, znake utrujenosti in nepravilnosti. Izjemno inovativen izdelek proti staranju z vsebnostjo hialuronske kisline, PRO-Retinola in ekstrakta iz Goji jagod, znanega kot sadeža za dolgo življenje zaradi antioksidativnih in zaščitnih lastnosti. Dodatek Alpaflor^R pomaga preprečiti nastanek peg in popravlja razbarvanja kože. S teksturo kot svila poživi kožo in ji daje čudovit občutek udobnosti."

Sestavine: Aqua, C12-15 Alkyl Benzoate, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Cyclopentasiloxane, Pentylene Glycol, Titanium Dioxide "Nano", Cetearyl Alcohol, Octyldodecanol, CI 77163, Dimethicone, Arachidyl Alcohol, Ethylhexyl Triazone, Ethylhexyl Stearate, Jojoba Esters, Glycerin, Cyclohexasiloxane, **Argania Spinosa Kernel Oil**, **Lycium barbarum Fruit Extract**, **Melissa Officinalis Leaf Extract**, **Alchemilla Vulgaris Extract**, **Veronica Officinalis Extract**, **Mentha Piperita Extract**, **Achillea Millefolium Extract**, Malva Sylvestris Extract, **Primula Veris Extract**, Retinyl Palmitate, **Acacia Decurrens Flower Wax**, Behenyl alcohol, Phenoxyethanol, Stearic Acid, **Helianthus Annus Seed Wax**, Parfum, Polyglyceryl-3 Polyricinoleate, *Tocopheryl Acetate*, Potassium Cetyl Phosphate, Arachidyl Glucoside, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer, Aminopropyl Triethoxysilane, Silica, Alcohol, Polymethyl Methacrylate, Acacia Senegal Gum, Sodium Hyaluronate, Xanthan Gum, Disodium EDTA, Tricaprylin, Polyglycerin-3, Citric Acid, Linalool, *BHT*, *Tropolone*, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate.

9. Bottega Verde, Goji Perfect: Intenzivna dnevna in nočna krema proti gubam s PRO-Retinolom in ekstraktom Goji jagod 50+



Slika 10: Vzorec 9: Intenzivna dnevna in nočna krema proti gubam s pro-retinolom in ekstraktom Goji jagod

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnjini: "Ekstra bogata krema s tarčnim delovanjem, da zadovolji potrebe zrele kože in ji pomaga pri boju z razbarvanjem, pegami, izgubo tonusa in gubami. Formula vsebuje hialuronsko kislino, PRO-Retinol in ekstrakt goji jagod, znanega kot sadež za dolgo življenje zaradi antioksidativnih in zaščitnih lastnosti. Velik odstotek kompleksa Alpaflor^R Gigawhite pomaga v boju proti pegami in zmanjša razbarvanost kože. Bogata in prijetna tekstura bo prinesla udobje visoko zahtevni koži in ji pomagala zapolniti in zbrisati gube."

Sestavine: Aqua, Ethylhexyl Methoxycinnamate, C12-20 Acid PEG-8 Ester, C12-15 Alkyl Benzoate, Cyclopentasiloxane, Glycine Soja Protein, Ethylhexyl Stearate, Octyldodecanol, Pentylene Glycol, Titanium Dioxide "Nano", Jojoba Esters, Cetearly Alcohol, **Helianthus Annuus Seed Wax**, Glycerin, Dimethicone, **Argania Spinosa Kernel Oil**, Glyceryl Stearate, PEG-100 Stearate, **Lycium Barbarum Fruit Extract**, **Alchemilla Vulgaris Extract**, **Primula Veris Extract**, **Malva Sylvestris Extract**, **Melissa Officinalis Leaf Extract**, **Achillea Millefolium Extract**, **Veronica Officinalis Extract**, *Retinyl Palmitate*, **Acacia Decurrens Flower Wax**, **Mentha Piperita Extract**, Phenoxyethanol, Polymethyl Methacrylate, Parfum, Cyclohexasiloxane, Polyglyceryl-3 Polyricinoleate, *Tocopheryl Acetate*, Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer, Cera Alba, Stearic Acid, Aminopropyl Triethoxysilane, Silica, Alcohol, Acacia Senegal Gum, Xanthan Gum, Sodium Hyaluronate, Disodium EDTA, Polyglycerin-3, Tricaprylin, Citric Acid, Linalool, *BHT*, *Tropolone*, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate.

10. Forsan, Ultra bogata krema za obraz z Aloe vero



Slika 11: Vzorec 10: Ultra bogata krema za obraz z Aloe Vero

Opis oglaševanja izdelka na kozmetični ovojnjini: "Aloe Vera krema je mehka in žametna krema, ki zaradi svoje visoke koncentracije Aloe vere, jojobinega olja, mandljevega olja, kokosovega olja in karitejevega masla intenzivno neguje kožo in ji vrača naravno čvrstost in mehko. Primerna je za vse tipe kože, se hitro vpije in po uporabi še 24 ur pušča dober občutek. Aloe vera krema je narejena iz 100% naravnih aktivnih sestavin, ne vsebuje barvil, parabenov, petrolatov in silikonov ter vsebuje nealergene dišave."

Sestavine: Aqua, **Aloe Barbadosensis Leaf Juice**, Ethylhexyl Stearate, Glyceryl Stearate, Cetearyl Alcohol, Glycerin, **Simmondsia Chinensis Seed Oil**, Cera Alba, Oryza Sativa Starch, Propylene Glycol, **Butyrospermum Parkii Butter**, **Cocos Nucifera Oil**, **Prunus Amygdalus Dulcis Oil**, Palmitoyl Collagen Amino Acids, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Parfum, Hydroxyethylcellulose, Lecithin, *Tocopherol*, *Ascorbyl Palmitate*, Citric Acid, Sodium Benzoate, *Tocopheryl Acetate*, Potassium Sorbate, Sodium Hyaluronate, Allantoin, Panthenol, Glycyrrhetic Acid.

3.2. EKSPERIMENTALNI DEL

3.2.1. MERJENJE GOSTOTE KOZMETIČNIH IZDELKOV

Pred pripravo vzorcev smo morali le tem izračunati gostoto. Za izračun gostote vseh desetih vzorcev smo uporabili predhodno stehtan manjši merilni valj (5 mL), ki smo ga napolnili do približno oznake za 3 mL. Zopet smo stehali napolnjen merilni valj, da smo dobili maso vzorca v merilnem valju. Merilni valj smo nato pokrili s parafilmom in ga postavili za nekaj minut v vodno kopel (60 °C), da je iz kreme nastala talina in da smo se znebili morebitno nastalih zračnih mehurčkov med polnjenjem. Ko je nastala talina, smo

vzorec umaknili iz kopeli in počakali, da se je vse skupaj ohladilo na sobno temperaturo. Nato smo odčitali volumen vzorca iz skale na merilnem valju in po enačbi I. izračunali gostoto vzorca. Gostote vseh vzorcev so zbrane v preglednici I.

$$\rho = \frac{m}{V}$$

ρ - gostota vzorca

m - masa vzorca v merilnem valju

V - volumen vzorca v merilnem valju

Enačba I. Izračun gostote vzorcev

Preglednica 1.: Gostota posameznega vzorca.

Številka vzorca	Masa kreme v merilnem valju (g)	Odčitani volumen kreme v merilnem valju (mL)	Izračunana gostota vzorca (g/mL)
1.	3,268	3,6	0,9077
2.	3,341	3,7	0,9029
3.	3,607	3,9	0,9248
4.	3,378	3,65	0,9254
5.	3,239	3,4	0,9526
6.	4,276	4,6	0,9295
7.	3,555	3,7	0,9608
8.	3,277	3,5	0,9362
9.	3,326	3,6	0,9239
10.	3,102	3,6	0,8617

3.2.2. PRIPRAVA RAZTOPINE DPPH

Najprej smo pripravili osnovno raztopino s koncentracijo 700 μM tako, da smo v 25 mL merilno bučko natančno natehtali 6,90 mg DPPH, dodali etanol do dveh tretjin bučke, raztopili kristale s soniciranjem v ultrazvočni kopeli in z etanolom dopolnili do oznake 25 mL. Potem smo pripravili delovno raztopino DPPH s koncentracijo 140 μM tako, da smo odmerili 5 mL osnovne raztopine DPPH v 25 mL merilno bučko in zopet dopolnili do oznake z etanolom. Osnovno raztopino smo hranili v hladilniku ovito v aluminijasto folijo, da je bila zaščitena pred svetlobo. Iz osnovne raztopine smo vsak dan pripravili svežo

delovno raztopino in izmerili absorbanco, tako da smo v plastično 2 mL kiveto odmerili 1 mL delovne raztopine DPPH in 1 mL etanola. Če se je izmerjena absorbanca gibala nad 0,7 in pod 1, je bila delovna raztopina primerna za nadaljnjo uporabo, sicer smo pripravili svežo raztopino DPPH (12,13).

3.2.3. PRIPRAVA VZORCEV

Za pripravo vzorcev smo potrebovali štirinajst 2 mL mikrocentrifugirk. Sedem smo jih porabili za pripravo vzorcev, kjer smo dodali DPPH in drugih sedem za slepe vzorce (ozadja), kjer smo namesto DPPH dodali etanol. Pri pripravi vzorcev smo uporabili sedem različnih koncentracij krem. Ustrezno maso vzorca smo natehtali direktno v 2 mL mikrocentrifugirke. Pri vseh vzorcih smo uporabili enake koncentracije kozmetičnega izdelka, razen pri vzorcih **2**, **3** in **4**, ker je bila izbrana koncentracija antioksidantov previsoka, saj nam je pri večjih koncentracijah kreme, reagiral ves DPPH. Vizualno so se vsi vzorci obarvali rumeno, kar je pomenilo, da je reagiral ves DPPH. Končne koncentracije in zatehte vzorcev **1**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** in **10** so podane v preglednici 2. Končne koncentracije vzorcev **2**, **3** in **4** pa so podane v preglednici 3.

Preglednica 2.: Končne koncentracije vzorcev **1**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** in **10** ter ustrezne mase vzorcev.

VZOREC 1 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 10	c_{vzorca} (mg/mL)	m_{vzorca} (mg)
	100	200
	75	150
	50	100
	25	50
	12,5	25
	10	20
	6,25	12,5

Preglednica 3.: Končna koncentracija vzorcev **2**, **3**, in **4** ter ustrezne mase vzorcev.

VZOREC 2, 3, 4	c_{vzorca} (mg/mL)	m_{vzorca} (mg)
	12,5	25
	10	20
	6,25	12,5
	4	8
	3,125	6,25
	1,5	3
	1	2

Nato smo dodali ustrezno količino etanola kot topila, ki smo ga preračunali po enačbi II in enačbi III ter vzorce dobro premešali na Vibromaxu.

$$V(\text{kreme}) = \frac{m(\text{kreme})}{\rho(\text{kreme})}$$

Enačba II. Izračun volumna kreme.

$$V(\text{etanola}) + V(\text{kreme}) = 1000 \mu\text{L}$$

$$V(\text{etanola}) = 1000 \mu\text{L} - V(\text{kreme})$$

Enačba III. Izračun količine dodanega etanola.

Vseh 14 vzorcev smo za 10 minut postavili v vodno kopel na 60 °C, da je nastala talina kozmetičnega izdelka in etanola. Po 10 minutah smo vzorce pustili nekaj časa na sobni temperaturi, da so se ohladili in v vzorce dodali še 1 mL delovne raztopine DPPH. V slepe vzorce pa smo namesto delovne raztopine DPPH, dodali 1 mL etanola kot topila. Vzorce smo dobro premešali na Vibromaxu in jih pustili inkubirati 90 minut na sobni temperaturi zaščitene pred svetlobo. Po inkubiranju smo vzorce centrifugirali za 1-2 minuti ter iz mikrocentrifugirk zajeli 1,5 mL supernatanta in ga prenesli v plastične kivete. Pazili smo, da nismo zajeli neraztopljenih delcev na dnu mikrocentrifugirke, ki bi sipali svetlobo in motili meritve. Ko smo imeli kiveto napolnjeno z vzorcem, smo pomerili absorbanco pri 517 nm, ker je pri tej valovni dolžini absorpcijski maksimum DPPH.

3.2.4. MERJENJE ABSORBANCE

Absorbanco smo izmerili s spektrofotometrom Cary Win UV. Najprej smo pomerili absorbanco topila (etanol), ki se je skoraj vedno gibala okrog 0,1, nato absorbanco DPPH. Le to smo pomerili tako, da smo odpipetirali 1 mL 140 μ M DPPH (delovna raztopina) in 1 mL etanola v kiveto in s pipeto previdno premešali vsebino v plastični kiveti ter pomerili absorbanco pri 517 nm. Rezultat, ki smo ga dobili, je pokazal, kakšna bi bila vrednost absorbance, če v vzorec ne bi dodali antioksidanta (pokazal je delež nezreagirane DPPH). Pri isti valovni dolžini smo pomerili tudi vse vzorce in slepe vzorce, kjer ni bilo dodanega DPPH, tako da smo iz 2 mL mikrocentrifugirk po centrifugiranju previdno zajeli supernatant in ga prenesli v kiveto ter pomerili absorbanco vzorcev in slepih vzorcev. Od vsake izmerejene absorbance vzorca z določeno maso smo odšteli izmerjeno absorbanco ozadja oziroma absorbanco slepega vzorca z isto maso vzorca kozmetičnega izdelka, da smo izločili učinek drugih snovi, ki bi bile lahko topne v etanolu in so absorbirale svetlobo pri izbrani valovni dolžini. Rezultati so vidni v preglednicah 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 in 22 in smo jih preračunali po enačbi IV.

$$A = A_v - A_o$$

A = končna absorbanca

A_v = absorbanca vzorca

A_o = absorbanca ozadja / slepega vzorca

Enačba IV: Enačba za izračun absorbance in odstotek nezreagirane DPPH

Ko smo pomerili absorbance vzorcev, smo s pomočjo enačbe V za vsak vzorec posebej izračunali, kolikšen odstotek DPPH zreagira.

$$\% \text{ nezreagirane DPPH} = \frac{(A_v - A_o)}{A_{dpph}} * 100 \%$$

Enačba V: odstotek nezreagirane DPPH

Narisali smo grafe odvisnosti nezreagirane DPPH od koncentracije posameznega vzorca. S pomočjo enačbe premice smo lahko izračunali koncentracijo antioksidantov EC₅₀, ki je potrebna, da se % DPPH zmanjša za polovico oziroma, da absorbanca upade za 50 %. Izračunali smo standardno napako (SE) z uporabo statistične funkcije STEYX v programu EXCEL (Microsoft Word 2010). Standardno napako smo računali po enačbi VI.

$$SE = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left(\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{(\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y}))^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right)}$$

n = velikost vzorca

y = matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk

\bar{y} = vzorčna srednja vrednost y

x = matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk

\bar{x} = vzorčna srednja vrednost x

Enačba VI.: Izračun SE

EC₅₀ smo izračunali s pomočjo enačbe linearne funkcije (Enačba VII), ki smo jo dobili s prileganjem eksperimentalnih točk na linearni funkciji.

$$Y = kx + n$$

Y = začetna vrednost, ki je v našem primeru 50

k = naklon premice / smerni koeficient (pridobimo iz izračunane enačbe prileganja eksperimentalnih točk linearni funkciji)

x = koncentracija KI, ki jo iščemo, da zreagira 50% DPPH

n = poljubno realno število (prepišemo iz rezultatov grafa)

Enačba VII.: Izračun EC₅₀ s pomočjo enačbe linearne funkcije

Rezultate smo podali v obliki EC₅₀ ± SD in jih primerjali med seboj. Upoštevali smo, da večja, kot je bila vrednost EC₅₀, nižjo antioksidativno kapaciteto je imel kozmetični izdelek. Da pa se je lahko reducirala vsaj polovica DPPH, pa je bila potrebna večja koncentracija kozmetičnega izdelka z antioksidanti.

4. REZULTATI

Antioksidativno kapaciteto smo izračunali desetim vzorcem s pomočjo linearne enačbe. Prav tako smo izračunali standardni odklon s pomočjo STEYX funkcijo v Excelu.

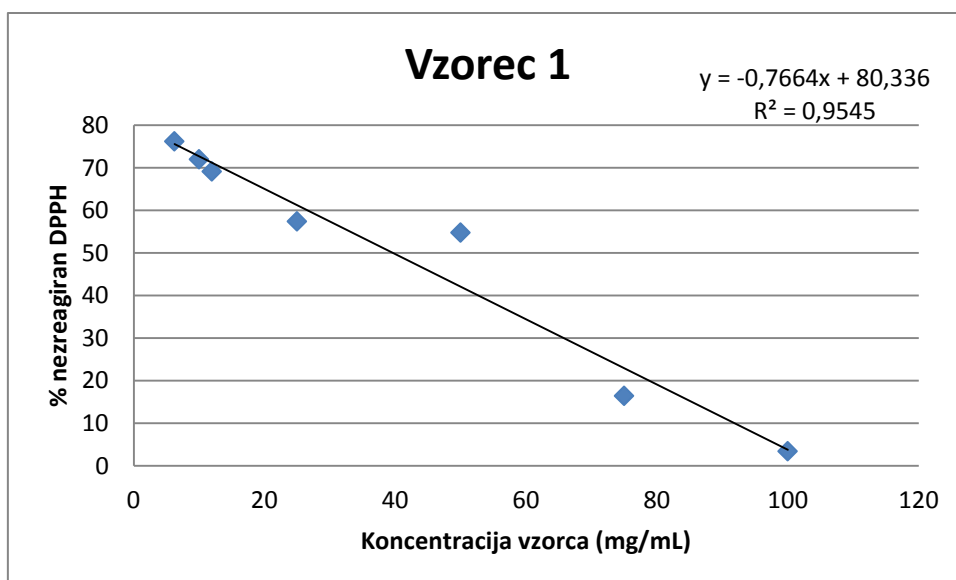
4.1. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE

4.1.1. Vzorec 1

V preglednici 4 vidimo, kako se je spreminjal odstotek nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca, ter vse izmerjene absorbance ozadij in vzorcev pri določenih koncentracijah vzorca. Na sliki 12 je prikazana linearna odvisnost % nezreagirane DPPH od koncentracije vzorca. V preglednici 5 vidimo kakšna je bila izračunana antioksidativna kapaciteta za vzorec 1.

Preglednica 4: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec 1.

C _{vzorca} (mg/mL)	100,0	75,0	50,0	25,0	12,0	10,0	6,25
A _{slepega vzorca}	0,0282	-0,0044	-0,0073	0,0135	0,01554	0,0024	0,0075
A _{vzorec}	0,0582	0,1413	0,4782	0,5219	0,6282	0,6404	0,6827
% nezreagiran DPPH	3,38	16,43	54,75	57,34	69,09	71,95	76,15



Slika 12: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 1

Preglednica 5: izračun EC₅₀ za vzorec 1 upoštevajoč SD in steyx.

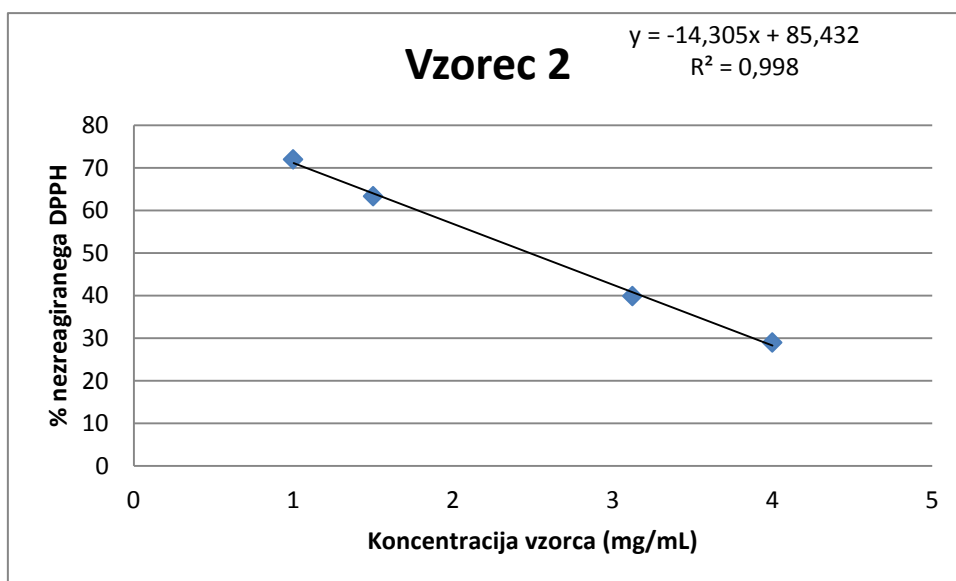
STEYX	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ -SD (mg/mL)	SD	EC ₅₀ ± SD
6,683	39,582	48,303	8,721	39,582 ± 8,721

4.1.2. Vzorec 2

V preglednici 6 vidimo spremembo odstotka nezreagirane DPPH, v odvisnosti od koncentracije vzorca (tu smo prvič uporabili nižje koncentracije zaradi višje vsebnosti antioksidantov). Na sliki 13 vidimo linearno spremembo % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca. V preglednici 7 vidimo končni rezultat antioksidativne kapacitete za vzorec 2.

Preglednica 6: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec 2.

C _{vzorca} (mg/mL)	4,0	3,125	1,5	1,0
A _{slepega vzorca}	0,0054	0,0017	0,0033	0,0008
A _{vzorca}	0,3202	0,3682	0,5027	0,5686
% nezreagiran DPPH	28,92	39,89	63,28	71,95



Slika 13: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 2.

Preglednica 7: izračun EC₅₀ za vzorec 2 upoštevajoč SD in steyx.

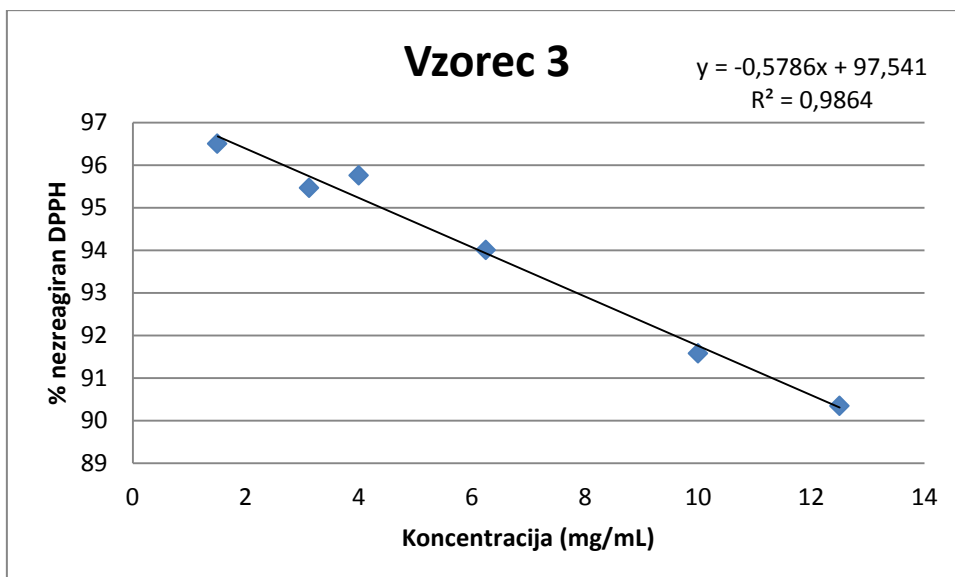
STEYX	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ -SD (mg/mL)	SD	EC ₅₀ ± SD
2,175	2,477	2,629	0,152	2,477 ± 0,152

4.1.3. Vzorec 3

Preglednica 8 nam poda izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH. Na sliki 14 vidimo linearno enačbo, ki smo jo dobili s prileganjem eksperimentalnih točk na linearni funkciji. V preglednici 9 vidimo, kakšna je bil izračunana antioksidativna kapaciteta za vzorec 3.

Preglednica 8: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec 3.

C _{vzorca} (mg/mL)	12,5	10,0	6,25	4,0	3,125	1,5	1,0
A _{slepega vzorca}	0,0025	0,0022	0,0016	0,0014	0,0015	0,0015	0,0014
A _{vzorca}	0,7063	0,7156	0,7340	0,7474	0,7452	0,7533	0,7354
% nezreagirani DPPH	90,34	91,57	94,00	95,75	95,46	96,50	94,21



Slika 14: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 3.

Preglednica 9: izračun EC₅₀ za vzorec 3 upoštevajoč SD in steyx.

STEYX	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ -SD (mg/mL)	SD	EC ₅₀ ± SD
1,056	82,165	83,991	1,825	82,165 ± 1,825

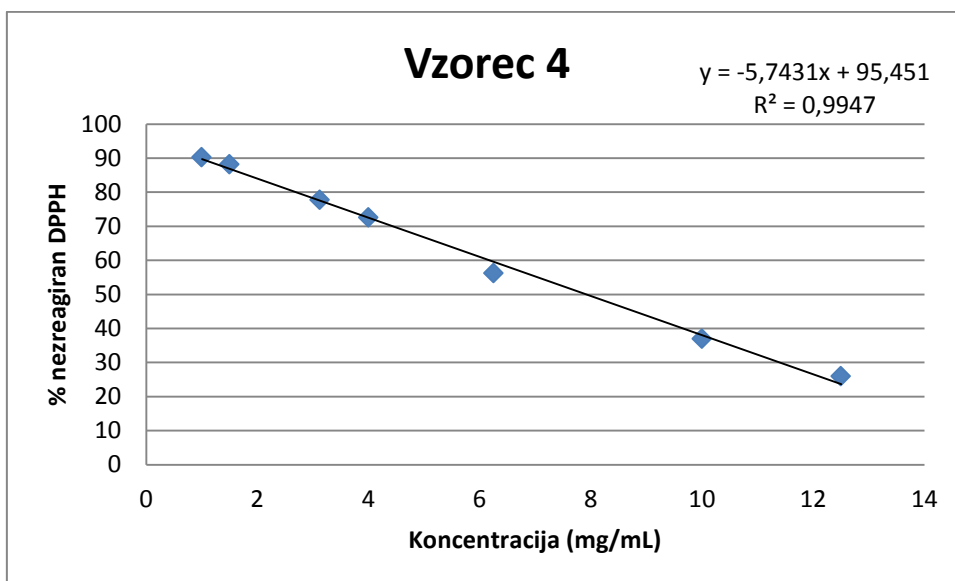
4.1.4. Vzorec 4

V preglednici 10 lahko opazimo, da smo pri tem vzorcu spet uporabili manjše koncentracije za analizo, ter na sliki 15, da je bilo prileganje eksperimentalnih točk na linearni funkciji

natančno (koeficient $R^2 = 0,9947$). Preglednica 11 nam poda končni rezultat analize za vzorec 4.

Preglednica 10: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec 4.

C_{vzorca} (mg/mL)	12,5	10,0	6,25	4,0	3,125	1,5	1,0
$A_{\text{slepega vzorca}}$	0,0322	0,0341	0,0269	0,0161	0,0134	0,0054	0,0032
A_{vzorca}	0,2395	0,3290	0,4759	0,5963	0,6347	0,7100	0,7241
% nezreagirani DPPH	25,94	36,90	59,19	72,61	77,75	88,17	90,21



Slika 15: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 4.

Preglednica 11: izračun EC_{50} za vzorec 4 upoštevajoč SD in steyx.

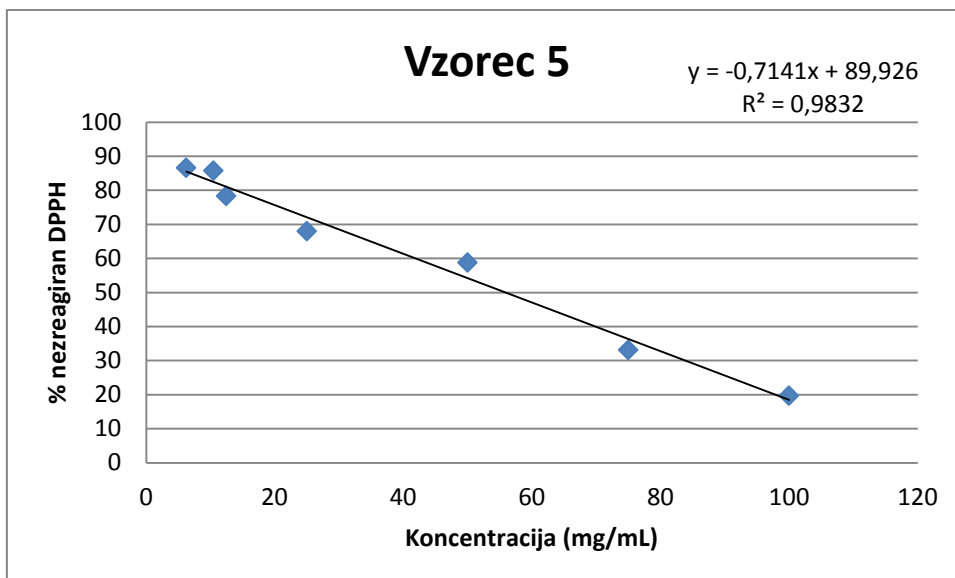
STEYX	EC_{50} (mg/mL)	EC_{50} -SD (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$
1,994	7,914	8,261	0,347	$7,914 \pm 0,347$

4.1.5. Vzorec 5

Vzorec 5 je zopet imel manjšo antioksidativno kapaciteto tako, da smo morali za analizo uporabiti večje koncentracije. Preglednica 12 in slika 16 nam prikazujeta, kako se je % nezreagirane DPPH spreminjal s koncentracijo vzorca 5. V preglednici 13 pa vidimo končne rezultate analize.

Preglednica 12: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec 5.

C _{vzorca} (mg/mL)	100,0	75,0	50,0	25,0	12,5	10,0	6,25
A _{slepega vzorca}	0,0385	0,0568	0,1311	0,0153	0,0278	0,0301	0,0398
A _{vzorca}	0,2060	0,3381	0,6306	0,5933	0,6942	0,7593	0,7764
% nezreagiran DPPH	19,69	33,07	58,72	67,94	78,34	85,72	86,59



Slika 16: % nezreagiranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca **5**.

Preglednica 13: izračun EC₅₀ za vzorec 5 upoštevajoč SD in steyx.

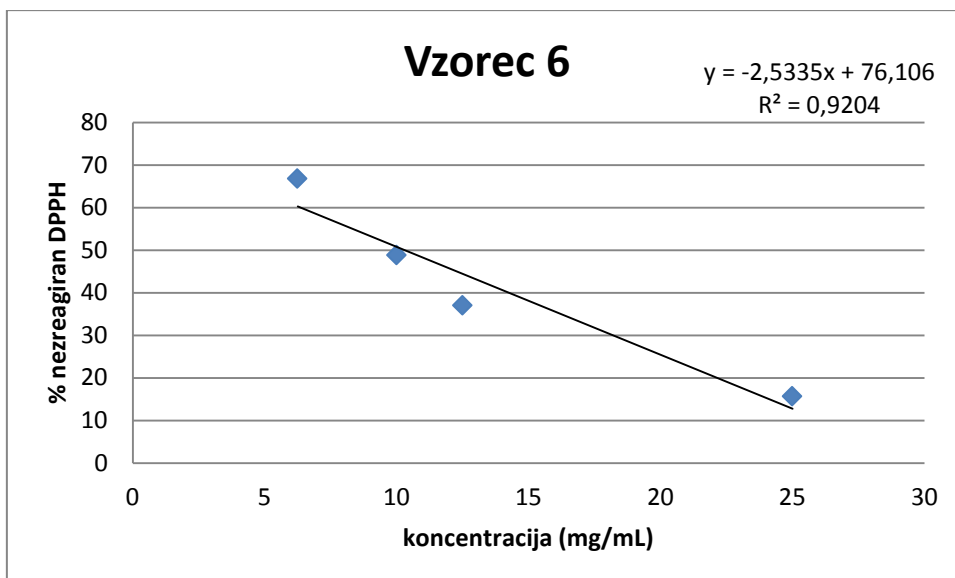
STEYX	EC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ -SD (mg/mL)	SD	EC ₅₀ ± SD
3,708	55,911	61,104	5,193	55,911 ± 5,193

4.1.6. Vzorec 6

V preglednici 14 lahko vidimo, da smo za analizo vzeli le štiri koncentracije vzorca **6**, zaradi prevelikih odstopanj pri manjših koncentracijah. Pri manjših koncentracijah se je reducirala skoraj ves DPPH, zato teh točk ni bilo smiselno vključiti v izračun EC₅₀, ki ga vidimo v preglednici 15.

Preglednica 14: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec **6**.

C _{vzorec} (mg/mL)	25,0	12,5	10,0	6,25
A _{slepega vzorca}	0,0640	0,0791	0,0543	0,0249
A _{vzorec}	0,1891	0,3752	0,4445	0,5593
% nezreagiran DPPH	15,64	37,02	48,78	66,81



Slika 17: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca **6**.

Preglednica 15: izračun EC_{50} za vzorec **6** upoštevajoč SD in steyx.

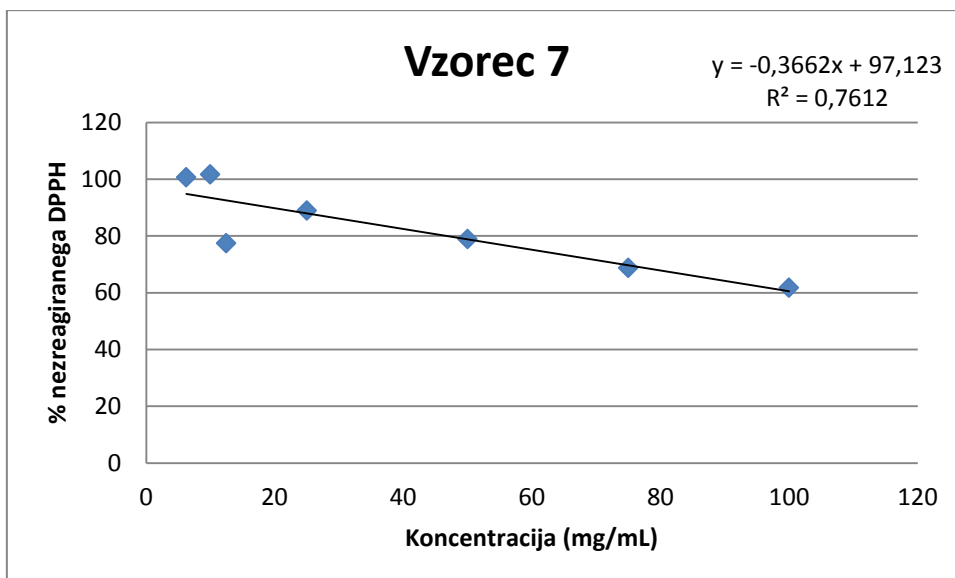
STEYX	EC_{50} (mg/mL)	$EC_{50.SD}$ (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$
7,415	10,304	13,231	2,926	$10,304 \pm 2,926$

4.1.7. Vzorec 7

V preglednici 16 lahko pri zadnjih dveh najmanjših koncentracijah vidimo, da je bil odstotek nezreagirane DPPH večji od 100 %, kar praktično ni mogoče. Tudi pri največji koncentraciji izdelka ni zreagirala vsaj polovica DPPH. V tem primeru bi bile potrebne še večje koncentracije vzorca **7**, ki pa niso bile smiselne, ker se vzorec **7** ne bi stalil na vodni kopeli in bi delci pri meritvah sipali svetlobo.

Preglednica 16: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec **7**.

C_{vzorec} (mg/mL)	100,0	75,0	50,0	25,0	12,5	10,0	6,25
$A_{\text{slepega vzorca}}$	0,0210	0,0322	0,0656	0,1137	0,3169	0,2542	0,2548
A_{vzorec}	0,4859	0,5493	0,6600	0,7837	0,8998	1,0202	1,0126
% nezreagirani DPPH	61,71	68,64	78,89	88,93	77,37	101,67	100,58



Slika 18: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca **7**.

Preglednica 17: izračun EC_{50} za vzorec **7** upoštevajoč SD in steyx.

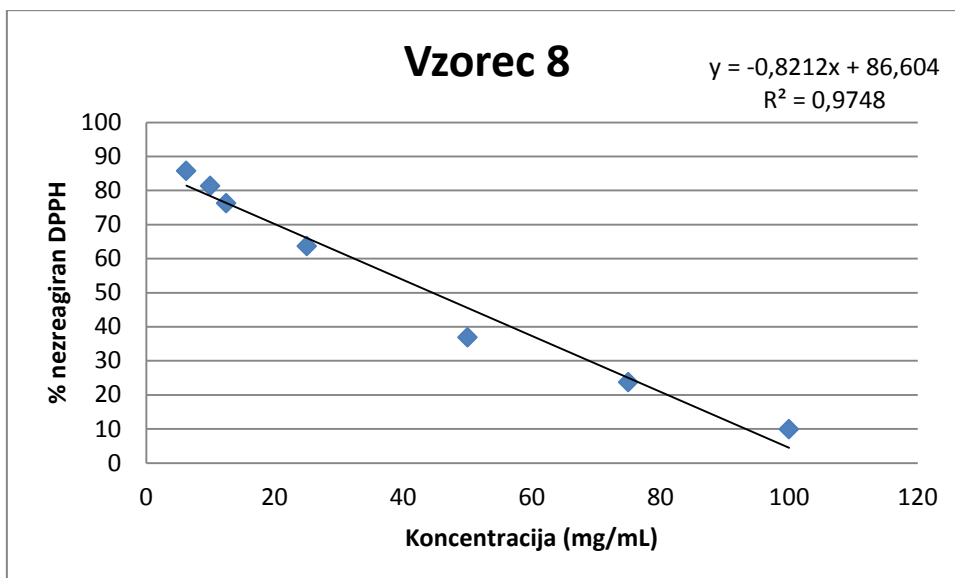
STEYX	EC_{50} (mg/mL)	EC_{50} -SD (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$
8,175	128,681	151,0039	22,322	$151,0039 \pm 22,322$

4.1.8. Vzorec 8

Preglednica 8 in slika 19 nam lepo pokažeta, kako je odstotek nezreagirane DPPH linearno naraščal v odvisnosti od koncentracije vzorca **8**. Manjša, kot je bila koncentracija vzorca, več DPPH je ostalo nezreagirane.

Preglednica 18: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec **8**.

C_{vzorec} (mg/mL)	100,0	75,0	50,0	25,0	12,5	10,0	6,25
$A_{\text{slepega vzorca}}$	0,0195	0,0261	0,0725	0,0544	0,0422	0,0260	0,0480
A_{vzorec}	0,1181	0,2048	0,3505	0,5336	0,6164	0,6385	0,6940
% nezreagiran DPPH	9,86	23,72	36,89	63,60	76,21	81,29	85,75



Slika 19: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca **8**.

Preglednica 19: izračun EC_{50} za vzorec **8** upoštevajoč SD in steyx.

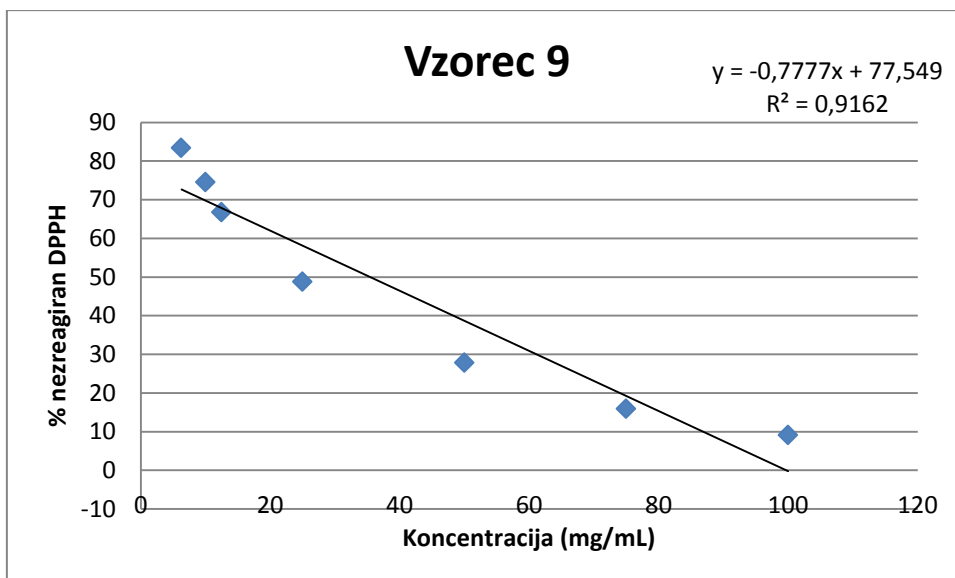
STEYX	EC_{50} (mg/mL)	EC_{50} -SD (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$
5,259	44,573	50,978	6,404	$50,978 \pm 6,404$

4.1.9. Vzorec 9

V preglednici 20 lahko zopet vidimo, da je bil odstotek nezreagirane DPPH pri najmanjši koncentraciji vzorca **9**, največji, kar pomeni, da bi morali za boljše učinkovitost kozmetičnega izdelka na kožo nanašati večje količine izdelka, kar pa ne bi bilo estetsko, poleg tega pa bi lahko povzročal tudi preobčutljivostne reakcije.

Preglednica 20: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec **9**.

C_{vzorec} (mg/mL)	100,0	75,0	50,0	25,0	12,5	10,0	6,25
$A_{\text{slepega vzorca}}$	0,0362	0,0655	0,0966	0,0992	0,1080	0,0874	0,0370
A_{vzorec}	0,1092	0,1933	0,3207	0,4923	0,6458	0,6878	0,7088
% nezreagirani DPPH	9,06	15,86	27,80	48,77	66,72	74,49	83,35



Slika 20: % nezreagirane DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca **9**.

Preglednica 21: izračun EC_{50} za vzorec 9 upoštevajoč SD in steyx.

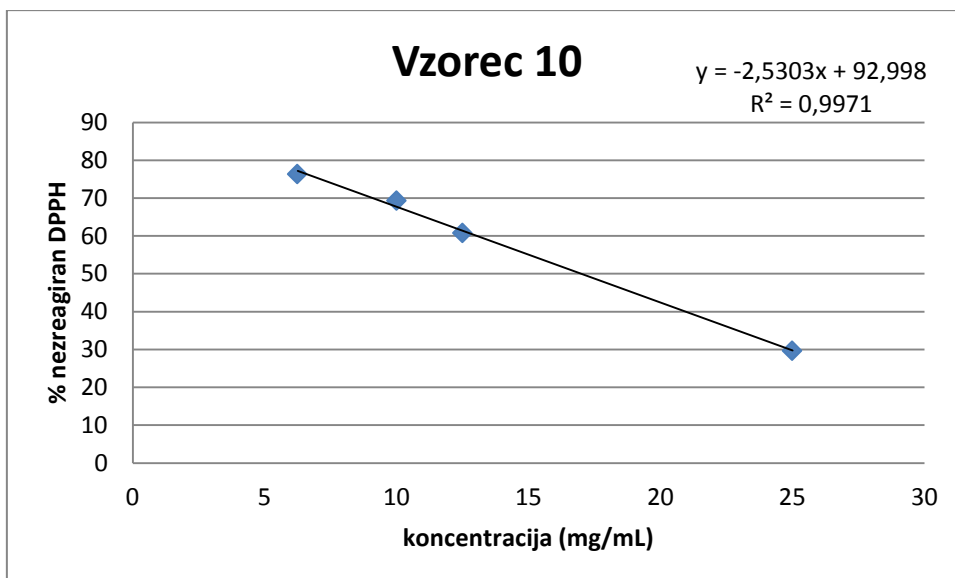
STEYX	EC_{50} (mg/mL)	EC_{50} -SD (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$
9,378	35,423	47,483	12,0594	$47,483 \pm 12,0594$

4.1.10. Vzorec 10

Pri vzorcu **10** smo za analizo zopet izbrali samo zadnje štiri koncentracije izdelka. Pri večjih koncentracijah bi ostal odstotek nezreagirane DPPH zelo velik.

Preglednica 22: Izmerjene absorbance vzorcev in slepih vzorcev pri različnih koncentracijah ter odstotek nereduciranega DPPH za vzorec **10**.

C_{vzorec} (mg/mL)	25,0	12,5	10,0	6,25
$A_{\text{slepega vzorca}}$	0,0344	0,0274	0,0120	0,0202
A_{vzorec}	0,02732	0,5170	0,5706	0,6353
% nezreagirani DPPH	29,63	60,74	69,30	76,32



Slika 21: % nezreagirana DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca **10**.

Preglednica 23: izračun EC_{50} za vzorec **10** upoštevajoč SD in steyx.

STEYX	EC_{50} (mg/mL)	EC_{50} -SD (mg/mL)	SD	$EC_{50} \pm SD$
1,365	16,993	17,532	0,539	$16,993 \pm 0,539$

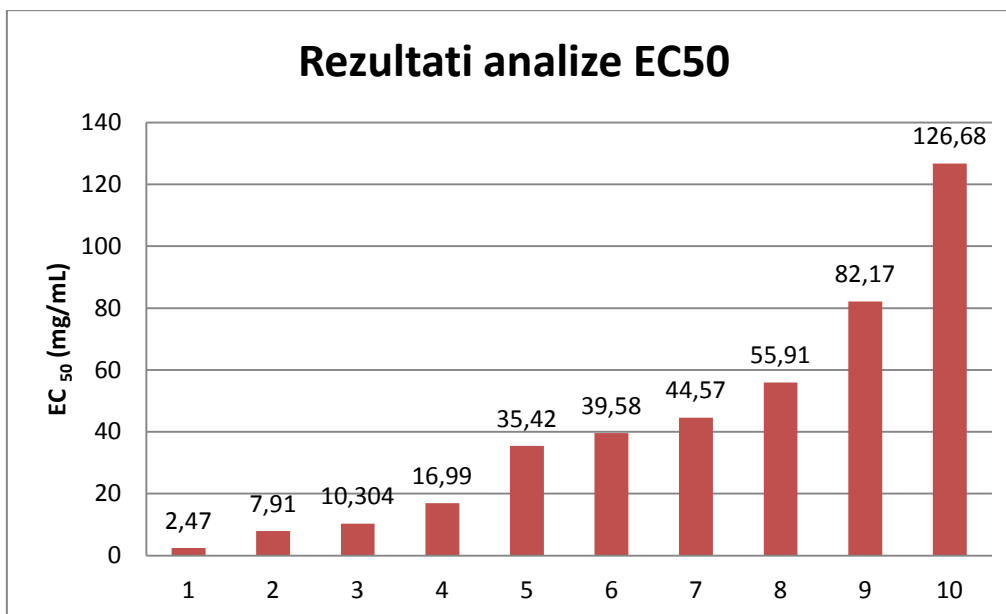
5. RAZPRAVA

Za diplomsko nalogo smo si izbrali deset vzorcev, od katerih sta bila dva izmed njih namerno izbrana kot klasična kozmetična izdelka. Osem pa jih je bilo takih, ki ali na ovojnini oglašujejo naravno kozmetiko, ali pri prodaji v stiku s kupcem, navajajo te lastnosti. Glede na analizo smo ugotovili, da ima vzorec **2** najvišjo antioksidativno kapaciteto in vzorec **7** najnižjo antioksidativno kapaciteto. V preglednici 24 lahko vidimo, kako si sledijo po vrsti vzorci glede na naraščajoč EC_{50} . Vidno slabšanje antioksidativne kapacitete pa lahko opazujemo na sliki 22.

Za sestavo lestvice (vrstni red najboljših vzorcev) smo uporabili parameter EC_{50} , ki je definiran kot koncentracija začetnega vzorca z antioksidantom, ki je potrebna za zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50 %. Nižja kot je bila vrednost EC_{50} , večja je bila antioksidativna kapaciteta vzorca (32).

Preglednica 24: Rezultati EC_{50} po vrstnem redu

Mesto	Številka vzorca	Rezultat EC_{50} (mg/mL)
1	2	2,477
2	4	7,914
3	6	10,304
4	10	16,993
5	9	35,423
6	1	39,582
7	8	44,573
8	5	55,911
9	3	82,165
10	7	128,681



Slika 22: graf rezultatov analize. Na abscisni osi je mesto, ki ga je vzorec zasedel in na ordinatni osi koncentracija EC₅₀ (mg/mL).

5.1. Vzorec 1: Effeto lifting krema za obraz s karitejevim maslom, hialuronsko kislino in izvlečki lotusa

Vzorec 1 na svoji embalaži ne oglašuje, da gre za naraven kozmetični izdelek, ker naj bi bilo že iz imena znamke razvidno, da gre za naravno vzdrževanje ženske lepote z naravnimi kozmetičnimi sestavinami (15). Izdelek zavzame 6. mesto (EC₅₀ = 39,58 mg/mL), če vzorce razvrstimo po lestvici od najmanjših do največjih vrednosti EC₅₀. Pričakovali smo, da ne bo v ospredju, saj vsebuje le 3 naravne aktivne sestavine, ki izkazujejo tudi antioksidativne lastnosti. Karitejevo maslo (*Butyrospermum parkii butter*), ki ga je med naravnimi aktivnimi sestavinami največ, izkazuje bolj vlažilno kot antioksidativno delovanje. So pa zato toliko bolj učinkoviti olje navadnih pšeničnih kalčkov (*Triticum vulgare germ oil*), izvleček lotusa (*Nelumbium speciosum extract*) in tokoferol. Med zadnjimi tremi k antioksidativni kapaciteti največ prispeva ravno olje pšeničnih kalčkov, saj vsebuje 0,15 - 0,3% tokoferolov od tega 0,09 - 0,21% D- α -tokoferola, ki je štirikrat boljši antioksidant. Vsebnost tokoferolov, zlasti α -tokoferola, je velika in uvršča olje pšeničnih kalčkov med najbogatejše vire vitamina E. Linolna kislina in fitosteroli, so skupaj z vitaminom E nosilci antioksidativnega delovanja (3). Ekstrakt lotusa nevtralizira delovanje radikalov in zavira vnetne procese. Slednji vsebuje tudi vitamin C, ki obnavlja kolagenska vlakna (16). Ker je vzorec namenjen uporabi starejše kože, so antioksidativne naravne sestavine v izdelku primerne, a glede na to, da danes vsi

želimo hitre rezultate, bi bil učinek zelo minimalen, saj bi za večji učinek potrebovali večjo koncentracijo antioksidantov.

5.2. Vzorec 2: Vlažilna krema za obraz z izvlečkom črnega riža in oljem riževih otrobov

Pri tem izdelku proizvajalec že na deklaraciji izpostavlja, da je formulacija narejena iz visokega deleža rastlinskih derivatov ter, da ne vsebuje parabenov, silikonov in umetnih barvil. In res vsebuje kar sedem takih sestavin, ki bistveno pripomorejo k najboljšemu rezultatu med desetimi testiranimi vzorci. EC_{50} je bil 2,466 mg/mL, kar je zelo dober rezultat, in nakazuje, da ima vzorec **2** visoko antioksidativno kapaciteto že pri majhnih koncentracijah. K temu pripomorejo sezamovo olje (*Sesamum Indicum Seed Oil*), ki vsebuje 0,05% tokoferolov in sledove fenola sezamola, ki ima dobre antioksidativne učinke (3). Mandljevo olje (*Prunus amygdalus dulcis oil*) in karitejevo maslo (*Butyrospermum parkii butter*) ne vplivata bistveno na rezultat, saj vsebujeta relativno majhno količino tokoferolov, od 0,04% za mandljevo olje in 0,004 - 0,008% za karitejevo maslo. Manj tokoferolov ima še riževo olje (*Oryza sativa bran oil*), le 0,03%, a vsebuje fenolno ferulno kislino, ki deluje antioksidativno, tako da lovi reaktivne kisikove spojine (3, 17) in oryzanol, od 1,5 - 2%, ki skrbi, da je olje antioksidativno stabilno (18). Kokosovo olje (*Cocos nucifera oil*) nima bistvenega prispevka k antioksidativni kapaciteti, saj vsebuje le 0,002% tokoferola. Prav zaradi nizke vsebnosti pogosto hitro postane žarko in je za dodatno zaščito potrebno dodajati vitamin E (3). Na začetku INCI liste se pojavlja tudi med (*Mel*), ki večinoma deluje kot vlažilec kože, ima pa tudi antibakterijski učinek. Vsebuje flavonoide, ki delujejo antioksidativno ter vitamin C (19). Na koncu INCI liste se pojavi tudi askorbil palmitat (*ascorbyl palmitate*), ki je produkt vitamina C ali askorbinske kisline in palmitinske kisline. Deluje kot antioksidant (20).

5.3. Vzorec 3: Rdeči čaj balzam za po britju s hialuronsko kislino

Glede na sestavine smo pričakovali, da bo vzorec med zadnjimi glede na antioksidativno kapaciteto in res je tako, saj znaša EC_{50} 82,16 mg/mL, kar potisne vzorec **3** na predzadnje mesto. To pomeni, da ima vzorec **3** zelo nizko antioksidativno kapaciteto, saj ga je v primerjavi z vzorcem **2** potrebno skoraj 40-krat več za isti antioksidativni učinek. K antioksidativni učinkovitosti največ prispeva olivno olje (*Olive oil*), ki vsebuje 0,1 - 0,2% tokoferolov in klorofil, ki tudi deluje antioksidativno (3). Poleg olivnega olja je tu še

ekstrakt Roiboosa (*Aspalathus linearis leaf extract*), ki vsebuje flavonoida aspalatin in notofagin, ki izkazujeta antioksidativno delovanje (21). V vzorcu je še eno zanimivo olje in sicer olje iz semen trpotčevega gadovca (*Echium plantagineum seed oil*), ki vsebuje visoko raven večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Na začetku INCI liste vzorca **3** je navedeno tudi sončnično olje (*Helianthus annuus seed oil unsaponifiables*), ki vsebuje 0,04 - 0,15% tokoferolov, kar je več vitamina E, kot ga vsebuje katerokoli drugo rastlinsko olje (20). Malo prispevata še olje sladkega mandljevca (*Prunus amygdalus dulcis oil*) in karitejevo maslo (*Butyrospermum parkii butter*). V slednjem je med tokoferoli največ α -tokoferola. Na INCI listi pa je tokoferol naveden še samostojno v obliki estra z očetno kislino. Verjetno en izmed najbolj pomembnih antioksidantov v tem izdelku je skvalen, ki ima v primerjavi z nasičeno obliko skvalan, dvojne vezi, na katere se lahko adirajo radikali (tudi DPPH) ter tako pripomore k antioksidativni zaščiti. Izdelek torej nima tako močnega ali tarčnega antioksidativnega delovanja in je namenjen bolj za vlaženje in nego kože po britju, čeprav se izdelek na polici prodaja tudi kot krema za obraz za moške z zrelo kožo, zaradi vsebnosti hialuronske kisline, ki naj bi kožo navlažila. Glede na to, da vzorec **3** vsebuje tudi tokoferol acetat (*Tocopherly acetate*), ki se mora za antioksidativno delovanje najprej hidrolizirati v koži do proste oblike tokoferola, pričakujemo, da bi se vzorec po nanosu na kožo izkazal bolje.

5.4. Vzorec 4: Ekstrabogata dnevna krema za obraz

Vzorec **4** je z ECOCERT certifikatom podprt organski izdelek, ki se uporablja za nego kože proti prvim nastalim gubicam. Glede na to smo pričakovali, da bo med prvimi glede antioksidativne kapacitete. In res se je tako izkazal, saj se je z analizo in rezultatom $EC_{50} = 7,91$ mg/mL uvrstil na drugo mesto. Antioksidativne lastnosti izkazujejo sezamovo olje (*Sesamum indicum oil*), kakavovo maslo (*Theobroma cacao butter*), olje navadnega rakitovca (*Hippophae rhamnoides oil*), olje mareličnih koščic (*Prunus armeniaca kernel oil*) ter ekstrakt iz brusnic (*Vaccinium macrocarporon extract*). Kakavovo maslo vsebuje približno 0,02 - 0,03 % tokoferolov in tako velja za enega najbolj stabilnih maščob, ker vsebuje naravne antioksidante, ki preprečijo žarkost (20). Na drugem mestu na Inci listi se pojavi tudi ekstrakt aloe vere (*Aloe barbadensis leaf extract*), ki vsebuje polisaharide, vitamine A, C, E in B, ki pripomorejo k antioksidativni kapaciteti. Verjetno največji doprinos k rezultatu ima olje navadnega rakitovca, saj vsebuje vitamin C in trikrat več vitamina A kot korenje (22). Olje mareličnih koščic uvrščamo med srednje stabilna

rastlinska olja. Vitamina E ni veliko, med skvaleni pa je največ γ -tokoferola (3). Visok delež polifenolov, flavonoidov in vitamina C ima ekstrakt iz brusnic. Vsa ta olja in ekstrakti so izdelku dodana kot aktivne sestavine, vendar pa izkazujejo tudi antioksidativne lastnosti, ki ščitijo izdelek. Izdelku je dodan tudi sam tokoferol, klasičen in pogosto uporabljen antioksidant.

5.5. Vzorec 5: Vital Q10 dnevna krema proti gubam Rich

Vzorec 5 vsebuje dva antioksidanta, ki sta v izdelku izključno s tem namenom. Askorbinska kislina in askorbil palmitat delujeta kot antioksidanta in največ prispevata k rezultatu EC_{50} , ki je bil za ta vzorec 55,91 mg/mL in se je s tem rezultatom uvrstil na sedmo mesto od desetih vzorcev. Na Inci listi vidimo tudi tokoferil acetat, ki deluje antioksidativno šele po nanosu na kožo, kar pa DPPH test ne zazna in zato njegova prisotnost ne vpliva na končni rezultat. Vzorec 5 ne spada v skupino naravne kozmetike, a smo ga vseeno želeli preizkusiti, da vidimo, kako se bo izkazal v primerjavi z vzorci, ki spadajo med naravno kozmetiko. Vzorec 5 vsebuje tudi štiri rastlinske izvlečke oziroma olja, ki izkazujejo antoksidativne lastnosti. Sojino olje (*Glycine soja oil*) vsebuje 0,08 - 0,1 % tokoferolov in je bogato z vitaminom E (3), ki prispeva h končnemu rezultatu. Avokadovo olje (*Persea gratissima oil*) pridobivamo iz oplodja sadeža in je zelo mastno olje. Po vsebnosti vitamina E, je avokadovo olje primerljivo z olivnim oljem, le da avokadovo olje vsebuje štirikrat več fitosterolov (3). Karitejevo maslo (*Butyrospermum parkii butter*) prav tako vsebuje zelo malo tokoferolov, le 0,004 - 0,08 %, kar le malo prispeva h končnemu EC_{50} . Izvleček iz ingverja (*Panax ginseng root extract*) vsebuje antioksidante, ki delujejo proti staranju. Dodajamo ga v kozmetične izdelke za boljši videz kože in proti gubam (3). Glede na to, da izdelek vsebuje le dva antioksidanta (askorbil palmitat in askorbinska kislina), ki bosta pri nanosu na kožo takoj delovala antioksidativno, smo pričakovali, da bo rezultat med slabšimi. Kljub temu, da je v izdelku prisoten tudi tokoferil acetat, pa mora le ta za ustrezno delovanje najprej hidrolizirati na koži. Verjetno bi po hidrolizi le tega bil rezultat boljši, a ne bistveno. Lahko rečemo, da so naravni kozmetični izdelki boljši, ker vsebujejo več rastlinskih izvlečkov, ki pripomorejo k antioksidativnem delovanju, kot klasični kozmetični izdelki. Vendar bi morali za tako trditev opraviti veliko več meritev in šele nato primerjati antioksidativno kapaciteto naravnih kozmetičnih izdelkov in drugih kozmetičnih izdelkov. Krema 5 za zahtevnega uporabnika ne bi bila zadovoljiva, saj ima bolj kot ne le vlažilne lastnosti.

5.6. Vzorec 6: Regeneracijska dnevna krema

Vzorec 6 je med desetimi vzorci zasedel tretje mesto, kar nas je presenetilo, ker vsebuje le en antioksidant (*Tocopherol*) in šest rastlinskih izvlečkov, ki lahko izkazujejo antioksidativne lastnosti. Predvidevamo, da so med seboj delovali sinergistično in tako povečali končno antioksidativno delovanje kozmetičnega izdelka. Sojino olje (*Glycine soja oil*) deluje kot antioksidant zaradi 0,08 - 0,1 % tokoferolov in vsebnosti vitamina E (3). Jjobino olje (*Simmondsia chinensis seed oil*) oziroma pravilno jjobin vosek je po sestavi zelo stabilno olje, odporno na oksidacijo (3). Pogosto ga dodajamo kozmetičnim izdelkom, posebno tistim, ki se oglašujejo kot naravni. Arganovo olje (*Argania spinosa kernel oil*) vsebuje 0,06 % tokoferola in je dobro stabilno olje. Dandanes je zelo popularno olje in ga najdemo v številnih kozmetičnih izdelkih za nego in čiščenje kože na obrazu. Pogosto ga mešajo z oljem granatnega jabolka za boljši antioksidativni učinek (23). Verjetno ravno zaradi tega, v izdelku najdemo tudi ekstrakt granatnega jabolka (*Punica granatum fruit extract*), ki sicer ne vsebuje tokoferolov, ampak hormone in se zato uporablja za nego zrele, utrujene kože (3). Glede na to, da ima izdelek $EC_{50} = 10,304$ mg/mL in ga uvrščamo med prve tri najboljše po analizi izdelkov, je izdelek zelo zadovoljiv in bi ga priporočili tudi drugim uporabnikom.

5.7. Vzorec 7: Dnevna krema - Q10

Vzorec 7 je zopet predstavnik klasičnih kozmetičnih izdelkov, kjer ponavadi prevladujejo polysintezne in sintezne sestavine. To opazimo že ob pogledu na INCI listo, saj vsebuje štiri antioksidante, ki niso rastlinski izvlečki; in sicer tokoferil acetat (*Tocopheryl acetate*), ki mora za antioksidativno delovanje pri nanosu na kožo najprej hidrolizirati, ubikonon (*Ubiquinone*), ki se mora za antioksidativno delovanje najprej reducirati do ubikinola, tokoferol (*Tocopherol*) in taninsko kislino (*Tannic acid*). Zadnja dva sta najpomembnejša antioksidanta, ker vsebujeta največ fenolnih skupin in imata največji prispevek k rezultatu analize. Prispevek je očitno majhen, saj se je vzorec 7 izkazal najslabše in zasedel zadnje deseto mesto ($EC_{50} = 128,68$ mg/mL), med vsemi analiziranimi vzorci. To pomeni, da je za enako učinkovitost kot pri vzorcu 1 potrebno bistveno več vzorca (skoraj 64-krat več). Vzorec sicer vsebuje še štiri rastlinske izvlečke, ki pa očitno ne pripomorejo dovolj močno k rezultatu. Vsebuje še karitejevo maslo (*Butyrospermum parkii butter*), ki vsebuje zelo malo tokoferola (0,004 - 0,08 %), ekstrakt prosa (*Panicum miliaceum extract*) z majhno vsebnostjo vitamina B (3), proteine alge Chlorella (*Chlorella Vulgaris/Lupinus Albus*

Protein Ferment), ki večinoma delujejo kot vlažilci in izvleček iz korenin forskolija (*Coleus Forskohlii Root Extract*), ki pa se večinoma uporablja v prehranskih dodatkih za izgubo telesne mase. Glede na to izdelek ni zadovoljiv in se je dejansko izkazal zelo slabo v primerjavi z naravnimi kozmetičnimi izdelki, verjetno pa bi se slabo izkazal tudi v primerjavi z klasičnimi kozmetičnimi izdelki, saj je bil slabši tudi od vzorca **5**, ki je zasedel sedmo mesto. Vzorca **7** glede na dobljene rezultate ne bi priporočali drugim uporabnikom, ki kupujejo kozmetične izdelke s ciljnim delovanjem proti gubam ali zgolj kot nego proti staranju.

5.8. Vzorec 8: Dnevna in nočna krema proti gubam s PRO-retinolom in ekstraktom iz goji jagod 35+

Vzorec **8** je krema, ki se uporablja za nego kože na obrazu proti gubam po 35. letu. Glede na to smo pričakovali, da bo vzorec zasedal prva mesta med analiziranimi. Žal ni bilo tako. Rezultat EC₅₀ je bil 44,57 mg/mL, kar ga je uvrstilo na sedmo mesto. Ob pogledu na INCI listo nas je to presenetilo, saj vsebuje kar nekaj rastlinskih izvlečkov (enajst), ki lahko izkazujejo antioksidativne lastnosti, prav tako pa vsebuje tri tehnične antioksidante (*Tocopheryl acetate*, *BHT*, *Tropolone*). Od rastlinskih izvlečkov k antioksidativni kapaciteti največ prispevajo arganovo olje (*Argania spinosa kernel oil*), ki med rastlinskimi sestavinami na INCI listi izdelka zaseda prvo mesto, izvleček iz jagod Goji (*Lycium barbarum fruit extract*) in izvleček iz listov melise (*Melissa officinalis leaf extract*). Arganovo olje vsebuje približno 0,06 % tokoferolov, kar pomeni, da je to dobro stabilno olje, poleg tega pa ima antioksidativne lastnosti (3). Goji jagode so dobro znane v tradicionalni kitajski medicini. Izvleček iz goji jagod je bogat s karoteni, riboflavini, askorbinsko kislino in tiaminom, kar mu daje antioksidativne lastnosti (24). Izvleček iz listov melise vsebuje 0,5 - 1,8 % rožmarinske kisline, ki ima protivirusno in protivnetno delovanje, ter deluje kot antioksidant (3). Vzorec vsebuje še izvleček navadne plahtice (*Alchemilla vulgaris extract*) in zdravilnega jetičnika (*Veronica officinalis extract*) z vsebnostjo glikozidnih taninov, ki prispevajo k antioksidativni kapaciteti. Vzorec **8** se je izkazal za povprečnega in verjetno zahtevnega uporabnika, ki si želi usmerjeno nego proti gubam, ne bi zadovoljil.

5.9. Vzorec 9: Intenzivna dnevna in nočna krema proti gubam s PRO-Retinolom in ekstraktom Goji jagod 50+

Vzorec 9 je krema, ki naj bi bila v osnovi ista kot vzorec 8, le da naj bi se uporabljala za nego starejše kože po 50. letu. Torej bi morali pri analizi dobiti boljši rezultat, kot pri vzorcu 8. EC_{50} za vzorec 9 je bil 35,42 mg/mL, kar ga je uvrstilo na 5. mesto med desetimi vzorci. Ko smo pogledali INCI listo izdelka, smo ugotovili, da je nekaj sprememb v vrstnem redu rastlinskih izvlečkov. Prvi vzorcu 8 je bilo na prvem mestu arganovo olje, pri vzorcu 9 pa vosek iz sončničnih semen, ki se v vzorcu 8 pojavlja kot zadnji med rastlinskimi sestavinami izdelka. Za njem je v vzorcu 9 arganovo olje, za katerega smo že omenili, da je stabilno olje zahvaljujoč visoki vsebnosti tokoferolov (0,06 %) (3). Na tretjem mestu med rastlinskimi izvlečki se pri vzorcu 9 pojavi izvleček iz goji jagod (pri vzorcu 8 je na drugem mestu), ki naj bi močno pripomogel k antioksidativni kapaciteti in je glede na oglaševanje izdelka, osrednja sestavina. Vzorec 9 prav tako vsebuje več izvlečka iz zdravilnega jetičnika kot predhodnik, kar pomeni, da izdelek vsebuje več vitaminov in taninov, ki prispevajo h končnemu rezultatu analize (1). Vsebuje en tehnični antioksidant več; in sicer poleg tokoferil acetata, tropolona, in BHT, še retinil palmitat (*Retinyl palmitate*). Vzorec 9 ima boljšo antioksidativno kapaciteto kot vzorec 8, saj ima nižjo vrednost EC_{50} , kar pomeni višjo antioksidativno kapaciteto. Predvidevamo pa, da bi se EC_{50} po nanosu vzorca na kožo še izboljšal, saj bi tokoferil acetat po hidrolizi deloval antioksidativno.

5.10. Vzorec 10: Ultra bogata krema za obraz z Aloe vero

Vzorec 10 se oglašuje kot izdelek, ki ne vsebuje barvil, parabenov, petrolatov, silikonov in alergenih dišav. Po analizi je z $EC_{50} = 16,99$ mg/mL zasedel 4. mesto med desetimi analiziranimi, kar je preseгло naša pričakovanja, saj je "premagal" tudi tiste vzorce, ki bi glede na namen uporabe morali zasedati prva mesta. Največji prispevek k rezultatu je med rastlinskimi izvlečki imel najverjetneje sok iz listov aloe vere (*Aloe vera leaf juice*), ki vsebuje polisaharide z antioksidativnim delovanjem (42). Vsebuje tudi jojobino olje oziroma vosek, ki je zelo stabilno olje in ima že skoraj nenavadno odpornost na visoke temperature (3). Karitejevo maslo, kokosovo olje in olje sladkega mandljevca prav tako z vsebnostjo tokoferolov prispevajo h končnemu rezultatu analize. Izdelek sicer vsebuje tudi tokoferol za zaščito sestavin izdelka in tokoferol acetat, ki antioksidativne lastnosti izkaže

po nanosu na kožo, kjer hidrolizira. Izdelek se je s 4. rezultatom analize izkazal kot dober in bi ga priporočili tudi drugim uporabnikom.

6. SKLEP

Vzorec **5** in **7** sta bila tista, ki nista spadala med naravno kozmetiko in glede na tabelo 24 vidimo, da sta se v primerjavi z naravnimi kozmetičnimi izdelki uvrstila na 8. (vzorec **5**) in 10. mesto (vzorec **7**), kar nakazuje, da dodatek rastlinskih izvlečkov in rastlinskih olj vpliva na antioksidativno kapaciteto izdelka in pripomore k boljšemu delovanju izdelka. Povprečna vrednost EC_{50} teh dveh izdelkov je bila 92,29 mg/mL. Oba izdelka sta imela dodane le štiri rastlinske izvlečke, ki izkazujejo antioksidativne lastnosti in v povprečju tri do štiri tehnične antioksidante, ki pa so se pojavljali tudi pri vzorcih, ki spadajo med naravne kozmetične izdelke.

Vzorci **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **9** in **10** so spadali med naravne kozmetične izdelke. Vzorec **4** in **6** to uvrstitev utemeljita s certifikati za organsko, ekološko in naravno kozmetiko, vzorec **4** z Ecocert certifikatom in vzorec **6** z NaTrue certifikatom. Bila sta tudi ena izmed najboljše uvrščenih vzorcev med vsemi kozmetičnimi izdelki. Vzorec **4** je vseboval kar trinajst rastlinskih izvlečkov in dva dodatna tehnična antioksidanta. Vzorec **6** je bil sestavljen iz triindvajsetih sestavin glede na INCI listo, vseboval pa je le šest rastlinskih izvlečkov in posebej dodan tokoferol. Pri teh dveh vzorcih ne moremo zaključiti, da je prisotnost certifikata kakorkoli prispevala k temu, da je bila antioksidativna kapaciteta boljša od drugih, saj bi morali zato analizirati več tovrstnih izdelkov. Verjetno je šlo pri vzorcih **4** in **6** zgolj za kombinacijo sestavin, ki so vplivale na boljši rezultat.

Vzorci **1**, **2**, **3**, **8** in **9** so bili vsi od istega proizvajalca. Najbolje se je odrezal vzorec **2**, čeprav smo najboljši rezultat pričakovali od vzorca **9**, saj je to izdelek, ki bi moral za svoje delovanje vsebovati največ antioksidantov in kozmetično aktivnih sestavin, ker je namenjen za zrelo starejšo kožo. Ker je imel vzorec **2** tako visoko antioksidativno kapaciteto, smo morali med meritvami prilagoditi tudi koncentracije izdelka, saj nam je pri visokih koncentracijah reagiral ves DPPH.

Glede na deset analiziranih vzorcev in dobljene rezultate analize lahko sklenemo, da je uporaba naravnih kozmetičnih izdelkov bolj smiselna, saj vsebujejo več rastlinskih izvlečkov ali rastlinskih olj, ki poleg tega, da kožo negujejo, vlažijo, skrbijo tudi za antioksidativno delovanje in pomagajo koži, da se ubrani pred vplivi zunanjih in notranjih dejavnikov in ji pomagajo, da je videti sveža in zdrava.

Lahko rečemo, da so naravni kozmetični izdelki boljši, ker vsebujejo več rastlinskih izvlečkov, ki pripomorejo k antioksidativnem delovanju, kot nenaravni kozmetični izdelki. Vendar bi morali za tako trditev opraviti veliko več meritev in šele nato primerjati antioksidativno kapaciteto naravnih kozmetičnih izdelkov in ostalih kozmetičnih izdelkov, ter določiti koliko antioksidantov je v posameznem vzorcu.

7. VIRI

1. Kreft S, Kočevar Glavač N, Stojilkovski K, Mlinarič A, Injac R, Novak A, Doljak B, Štrukelj B, Slanc Može P, Umek A, Lunder M, Kristl J, Janeš D, Berlec A, Sabotič J: *Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*, Slovensko farmacevtsko društvo, Slovenija 2013.
2. Pečar S: Radikali v našem življenju, *Kemija v šoli*, letnik 18, št. 3, oktober 2006, 13-19.
3. Kočevar Glavač N, Janeš D, Lumpert M, Stojilkovski K, Kokalj M, Tavčar Benković E, Gosenca M, Hendrychova H, Gašperlin M, Lunder M, Baumgartner S: *Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora*, 1. izd., Velenje : Širimo besedo, 2015, 245-267.
4. Mravljak J, Pečar S: *Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu*, Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2015.
5. Davies J A K: Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochem Soc Symp*, 61, 1-31.
6. Sies H: Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 1999; 27: 916-921.
7. Chelikani P, Fita I, Loewen P C: Diversity of structures and properties among catalases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2004; 61: 192-208.
8. Sedlak T W, Saleh M, Higginson D S, Bindu D P, Juluri K R, Snyder S H: Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *PNAS*, 2009; vol. 106, no. 13: 5171-5176.
9. Barel O A, Paye M, Maibach H I: *Handbook of cosmetic science and technology*. Third edition, Informa Healthcare USA, 2009; 301-310.
10. <http://www.ecocert.com/en/our-approach> dostopano: september 2016.
11. Kusumawati I, Indrayanto G: Natural antioxidants in cosmetics. *Studies in natural products chemistry* 2013; 40: 15; 485-505.
12. Carmona-jimenez Y, Valme Garcia-Moreno M, Igartuburu J M, Garcia Barroso C: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry* 2014; 165: 198-204.
13. Sharma Om P, Bhat T K: DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 2009; 113: 1202-1205.

14. Molyneux P: The use of stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology* 2004; 26: 211-219.
15. <http://www.bottegaverde.si> Datum dostopa: 6.12.2016
16. Ming-Zhi Z, Wei W, Li-Li J, Ping-Fang Y, Ming-Quan G: Analysis of flavonoids in lotus (*Nelumbo nucifera*) leaves and their antioxidant activity using macroporus resin chromatography coupled with LC-MS/MS and antioxidant biochemical assay. *Molecules* 2015; 20: 10553-10565.
17. Saulnier L, Thibault J F: Ferulic acid and diferuls acids as component of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the science food and agriculture*; 79: 396-402.
18. Aman P, Masih D, Masih J, Malik P: Comparitive analysis of heat degradation of oryzanol in rice bran oil, mustard oil and sunflower oil by microwave and pan heating. *International journal of food and nutritional sciences*, 2012; Vol. 1: 110-116.
19. Wijesinghe M, Weatherall M, Perrin K, Beasley R: Honey in the treatment of burns: a systematic review and meta-analysis of its efficacy. *N Z Med J*, 2009; 122: 47-60.
20. <http://www.cosmeticsinfo.org/> dostop dostopano: december 2016.
21. Bramati L, Minoggio M, Gardana C, Simonetti P, Mauri P, Pietta P: Quantative characterization of flavonoid compounds in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *J Agric Food Chem*, 2002; 50: 5513-5519.
22. Baoru Y, Heikki P K: Fatty acid composition of lipids in Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries of different origins. *J Agric Food Chem*, 2001; 49: 1939-1947.
23. Khallouki F, Youns C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen R W: Consumption of argan oil (Marocco) with its unique profile of fatty acids; tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds shoul confer valuable cancer chemopreventive effects. *Journal of cancer prevention*, 2003; 12(1): 67-75.
24. Qiong L, Yizhong C, Jun Y, Mei S, Corke H: Hypoglycemic and hypolipidemic effects ant antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life sciences* 2004; 76: 137-149.

25. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Medicinski razgledi* 2006; 45: 141-153.
26. Trojak A, Kristl J. Antioksidanti: aktivne sestavine kozmetičnih izdelkov. *Farm Vest*, 1999; 50: 443-453.
27. http://www.forsan.it/en/products/aloe+vera+crema+ultra+ricca+24h_16904.aspx
dostopano: oktober 2016
28. Osredkar J: Oksidativni stres. *Zdrav.Vestn.* 2012; 81: 393-406.
29. Anjum S, Sorian E, Marco-Contelles J L: Synthesis of bioactive natural products by propargylic carboxylic ester rearrangements. *Studies in natural products chemistry* 2013; 40: 51-67.
30. <http://www.bottegaverde.si/skin-care/lifting-effect/lifting-effect-face-cream-with-shea-butter-hyaluronic-acid-and-lotus-flower-extract-50-ml-ASS13210--131959.html> dostopano: december 2016
31. Valgimigli L, Pratt D A: Antioxidants in Chemistry and Biology. *Encyclopedia of radicals in chemistry, Biology and materials* 2012; 3: 1623-1678.
32. Chen Z, Bertin R, Frolidi G: EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH[•] assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 2013; 138: 414-420.
33. Xie J, Schaich K M: Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014; 62(19): 4251-4260.
34. Zillich O V, Schweiggertz-Weisz U, Eisner P, Kersch M: Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetics Science* 2015; 37: 455-464.
35. Silva A R, Menezes P F C, Martinello T, Novakovich G F L, Praes C E O, Feferman I H S: Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. *International Journal of Cosmetics Science* 2010; 32: 73-80.
36. Ablamnik M J, Banga A K: Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. *International Journal of Cosmetics Science* 2013; 35: 19-26.
37. Yahia E M, Ornelas-Paz J D J. Chemistry, stability and biological actions of carotenoids: Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability 2009; 177-222.

38. Wrolstad R E, Acree T E, Decker E A, Penner M H, Reid D S, Schwartz S J, Shoemaker C F, Smith D, Sporns P: Carotenoids. Handbook of food analytical chemistry 2005; 71-119.
39. Kandola K, Bowman A, Birch-Machin M A: Oxidative stress - a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and easthetics. International journal of cosmetics science 2015; 37 (52): 1-8.
40. Ablamowitz M J, Banga A K: Formulation of tocopherols nanocarriers and in vitro delivery into human skin. International journal of cosmetics science 2014; 36 (3): 239-246.
41. Marteau C, Nardello-Rataj V, Favier D, Aubry J-M: Dual role of phenols as fragrances and antioxidants: mechanism, kinetics and drastic solvent effect. Flavour and fragrance journal 2013; 28 (01): 30-38.
42. Shelton R M, USAF, MC: Aloe vera: Its chemical and therapeutic properties. International journal of dermatology 1991; 30 (10): 679-683.
43. Pokorny J: Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants. European journal of lipid science and technology 2007; 109 (6): 629-642.