

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EMA PERHAVEC
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EMA PERHAVEC

**VREDNOTENJE STABILNOSTI RETINOLA IN RETINIL
PALMITATA V KOZMETIČNIH IZDELKIH**

**STABILITY EVALUATION OF RETINOL AND RETINYL
PALMITATE IN COSMETIC PRODUCTS**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2017

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.. Vsi poskusi in meritve so bili izvedeni na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

ZAHVALA

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za usmeritve, nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako gre zahvala tudi Žani Temovi, mag. farm. za njeno prijaznost, nenehno razpoložljivost in pomoč pri delu v laboratoriju, ter ostalim diplomantom in sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Za vso podporo in motivacijo se iskreno zahvaljujem moji družini in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Ema Perhavec

Predsednica komisije:

izr. prof. dr. Petra Kocbek

Član komisije:

doc. dr. Nace Zidar

Ljubljana, 2017

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD	1
1.1. KOZMETIČNI IZDELKI, ZDRAVILA, KOZMECEVTIKI.....	1
1.2. VITAMINI.....	2
1.3. VITAMIN A	2
1.3.1. KEMIJSKE IN FIZIKALNE LASTNOSTI	3
1.3.2. MEHANIZEM DELOVANJA RETINOIDOV	3
1.3.3. TOKSIKOLOŠKI PROFIL	4
1.4. UPORABA	4
1.5. VRSTE RETINOIDOV	7
1.5.1. RETINOL	7
1.5.2. RETINAL	8
1.5.3. RETINOJSKA KISLINA	8
1.5.4. RETINILNI ESTRI (-palmitat, -propionat, -acetat, ...).....	8
1.6. STABILNOST KOZMETIČNIH IZDELKOV	9
1.6.1. STABILNOST VITAMINA A.....	10
2. NAMEN	12
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1. MATERIALI	13
3.1.1. REAGENTI IN TOPILA.....	13
3.1.2. STANDARDI	13
3.1.3. NAPRAVE IN PRIBOR.....	13
3.1.4. PRIPRAVKI Z VITAMINOM A	14
3.2. METODE.....	15
3.2.1. RAZVOJ ANALIZNE METODE	15
3.2.2. OPTIMIZACIJA METODE IN PRIPRAVA VZORCEV	16
3.2.2.1. Izbira ustreznega ekstrakcijskega topila	16
3.2.2.2. Optimizacija ekstrakcijskega postopka	17
3.2.2.3. Priprava vzorcev za ponovljivost in linearnost injiciranja kreme	17

3.2.2.4. Priprava raztopine standarda za izračun izkoristka	18
3.2.2.5. Priprava kreme z dodanim standardom za izračun izkoristka	18
3.2.2.6. Priprave raztopin stabilizatorja za stabilizacijo vitamina A	17
3.2.3. VREDNOTENJE HPLC METODE	18
3.2.3.1. Priprava vzorcev za vrednotenje HPLC metode	19
3.2.4. STABILNOSTNA ŠTUDIJA	20
3.2.4.1. Priprava vzorcev za stabilnostno študijo	20
3.2.4.2. Vpliv temperature	21
3.2.4.3. Vpliv kisika	21
3.2.4.4. Vpliv svetlobe	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1. OPTIMIZACIJA METODE IN PRIPRAVA VZORCEV	23
4.1.1. OPTIMIZACIJA HPLC METODE	23
4.1.2. IZBIRA USTREZNEGA EKSTRAKCIJSKEGA TOPILA	23
4.1.3. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA	24
4.1.4. TESTIRANJE PONOVLJIVOSTI IN LINEARNOSTI POSTOPKA PRIPRAVE VZORCA	25
4.1.5. STABILIZIRANJE SISTEMA IN RAČUNANJE IZKORISTKA	26
4.2. VREDNOTENJE HPLC METODE	27
4.3. STABILNOSTNA ŠTUDIJA	31
4.3.1. VSEBNOST VITAMINA A V KREMAH	31
4.3.2. VPLIV TEMPERATURE	32
4.3.3. VPLIV KISIKA	35
4.3.4. VPLIV SVETLOBE	36
5. SKLEP	38
6. LITERATURA	40

POVZETEK

Vitamin A v organizmu zasledimo v različnih oblikah, ki sodijo v skupino retinoidov. V to skupino sodijo tako naravne spojine kot sintezni derivati retinojske kisline. V kozmetičnih izdelkih je uporaba retinojske kisline prepovedana, namesto nje se zato v različnih koncentracijah uporabljajo retinol in njegovi estri, predvsem za nego kože proti staranju ter v izdelkih za nego aknaste in neenakomerno obarvane kože. Pogosto na ovojnini kozmetičnega izdelka ne najdemo podatka o koncentraciji kozmetično aktivne sestavine, ki jo vsebuje. Poleg tega pa so vitamin A in njegovi derivati v izdelkih zaradi vpliva zunanjih dejavnikov slabo obstojni.

Glavna cilja naše naloge sta bila ugotovitev dejanske koncentracije retinola in retinil palmitata v izbranih kremah za obraz in preverjanje stabilnosti obeh spojin v kremah po izpostavitvi zunanjim dejavnikom. Stabilnost vzorcev smo preverjali znotraj dvomesečne študije, pri čemer smo opazovali kako temperatura, prisotnost svetlobe in prisotnost kisika vplivajo na njuno stabilnost v izdelku. Zanimalo nas je tudi ali cena in blagovna znamka posredno vplivata na kakovost izdelka v smislu stabilnosti aktivne komponente.

V ta namen smo najprej optimizirali že razvito metodo HPLC in razvili postopek priprave vzorca s spreminjanjem različnih parametrov ekstrakcije, da smo prišli do optimalnega rezultata. Metodo smo nato ovrednotili v skladu z ICH smernicami, pri čemer smo potrdili njeno selektivnost, točnost, ponovljivost, linearnost in robustnost.

V nadaljevanju smo najprej preverili dejanske koncentracije retinola in retinil palmitata v petih izbranih kremah za obraz. Neposredno smo primerjali vsebnosti obeh aktivnih sestavin za dve kremi, ki sta imeli podano vsebnost. V kremi Vichy se je vsebnost retinola popolnoma ujemala z navedeno (0,2 %), v kremi Derma e pa smo izmerili za približno 2,5-krat manj retinil palmitata od tiste, navedene na ovojnini. Koncentracije retinil palmitata so bile v vseh izdelkih dokaj nizke (0,002-0,030 % v kremi).

Izdelki z retinil palmitatom so izkazovali dobro stabilnost pri 25 °C znotraj testnega obdobje, saj vsebnost ni padla za več kot 20 %, medtem ko je vsebnost pri 40 °C hitreje upadala, tudi do 100 %. Svetloba je na stabilnost retinola in retinil palmitata še najbolj vplivala, saj je bil upad koncentracije v vseh vzorcih večji od 80 % že po štiridnevni izpostavitvi svetlobnemu viru. Krema znamke Vichy se je v celotni študiji izkazala za najbolj kakovostno, krema znamke Derma e pa za najmanj stabilno, cenovni razred izdelka

pa ni imel prevladujočega vpliva na stabilnost izdelka. Ugotovili smo, da je pomembno zaščititi kozmetične izdelke pred zunanjimi vplivi, ki pripomorejo k nestabilnosti, pri čemer ima veliko vlogo tudi ovojnina.

Ključne besede: retinol, retinil palmitat, kozmetični izdelki, stabilnost, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN: acetonitril

BHT: butilhidroksitoluen

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)

ICH: Mednarodna konferenca o harmonizaciji (ang. International Conference on Harmonisation)

KAS: kozmetično aktivna sestavina

KONC.: koncentracija

MeOH: metanol

R^2 : determinacijski koeficient

RAR: receptorji retinojske kisline (ang. retinoic acid receptors)

RARE: elementi odziva retinojske kisline (ang. retinoic acid response elements)

RP: retinil palmitat

RSD: relativni standardni odklon

RXR: retinoidni X receptorji (ang. retinoid X receptors)

RV: relativna vlažnost

SCCNFP: Znanstveni odbor za kozmetične in neživilske proizvode (ang. Scientific Committee of Cosmetology and Non-food Products)

SD: standardni odklon

THF: tetrahidrofuran

UV: ultravijolično

UZ: ultrazvok

1. UVOD

1.1. KOZMETIČNI IZDELKI, ZDRAVILA, KOZMECEVTIKI

Trend razvoja kozmetičnih izdelkov je dandanes še zlasti usmerjen v aktivno nego kože. Razlikovanje med kozmetičnimi izdelki in zdravili (dermatiki) je zato včasih težko. Med zdravila štejemo snovi, ki so namenjene zdravljenju ali preprečevanju bolezni, pred sprostitev na trg pa je potrebno določiti njihovo učinkovitost in varnost. Za razliko od njih, kozmetični izdelki kožo zgolj negujejo, lepšajo, zaščitijo ali izboljšujejo njeno stanje. Kozmetični izdelki tako vplivajo le na videz kože, medtem ko imajo zdravila vpliv na njeno strukturo in funkcijo. Izdelek je lahko zdravilo, ali pa kozmetični izdelek, ne more pa biti istočasno oboje (1).

Izraz "kozmecevtiki" je prvič uporabil dr. Albert Klingman in opisuje izdelke, ki združujejo lastnosti zdravil in kozmetičnih izdelkov. Od običajnih kozmetičnih izdelkov se razlikujejo po tem, da z biološko aktivnimi sestavinami, ki jih vsebujejo, vplivajo na strukturo ali funkcijo (lahko tudi oboje) kože. Kljub temu, da imajo zdravilom podoben učinek, veljajo za bolj varne in se tržijo kot kozmetični izdelki. Glede na to, da za kozmecevtike ni dovoljeno navajanje zdravilnih učinkov, proizvajalci trdijo, da le-ti temeljijo na izboljšanjem videzu kože (1). Gre predvsem za razliko v oglaševanju, medtem ko meja med njimi ni povsem začrtana. Kozmecevtike lahko razdelimo v več kategorij (Preglednica I) (2).

Preglednica I: Vrste kozmecevtikov in predstavniki (povzeto po viru 2)

Kategorija	Predstavniki
<i>Vitamini</i>	vitamin A (retinol), vitamini C, E, B kompleks, koencim Q10, itd.
<i>Minerali</i>	baker, cink, itd.
<i>Antioksidanti</i>	dimetilaminoetanol, alfa-lipojska kislina, itd.
<i>Hidroksi kisline</i>	salicilna, glikolna, mlečna kislina, itd.
<i>Rastni dejavniki</i>	epidermalni, keratinocitni rastni dejavnik, itd.
<i>Lipidi</i>	glukozilceramid
<i>Proteini</i>	oligopeptidi, pentapeptidi, itd.
<i>Glukozaminoglikani</i>	hialuronska kislina
<i>Aktivne sestavine rastlinskega izvora</i>	alantoin, bisabolol, aloezin, čajevec, itd.

1.2. VITAMINI

Vitamini pripadajo skupini organskih spojin, ki so nujno potrebne za normalno rast, razvoj in delovanje človeškega in živalskega organizma (3). Ker jih telo ne more sintetizirati samo, jih je potrebno v obliki provitaminov ali vitaminov v organizem vnašati s hrano. Pomanjkanje oziroma presežek le-teh pa lahko privede do nastanka različnih bolezni. Vitamini uravnavajo številne vitalne procese in so vključeni v metabolizem ogljikovih hidratov, maščob, proteinov in nukleinskih kislin. Pomembni so za delovanje imunskega sistema, imajo pa tudi zaščitno vlogo, saj nekateri varujejo celice pred radikali. V različnih življenjskih obdobjih je potreba po njih različna, prav tako pa so drugačne potrebe po vitaminih pri posebnih skupinah ljudi (4).

Delimo jih v dve večji skupini: vodotopni (kompleks vitaminov B in vitamin C) in v maščobah topni (A, D, E in K) vitamini. Poleg vitaminov poznamo še njihove derivate (npr. estre, ki se morajo v telesu najprej hidrolizirati in so večinoma manj občutljivi na zunanje pogoje) in provitamine (npr. karotenoidi), ki se šele v telesu pretvorijo v vitamine (5). Zaradi svojih edinstvenih lastnosti so široko uporabljeni v kozmetičnih izdelkih.

1.3. VITAMIN A

Vitamin A spada v skupino v maščobah oziroma v oljih topnih vitaminov. Ti vitamini so z vidika toksičnosti nekoliko bolj tvegani, saj se lahko kopičijo v telesu, predvsem v jetrih in maščobnem tkivu, kar lahko ob močno povišanem vnosu privede do zastrupitve. Po drugi strani pa je zaradi njihovega shranjevanja v telesu verjetnost pomanjkanja nekoliko nižja kot pri vodotopnih vitaminih (5).

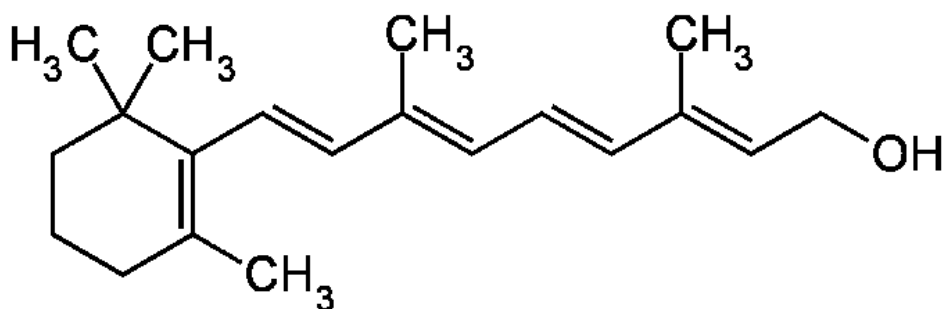
Vitamin A je mikrohranilo, ki ima pomemben vpliv v bioloških procesih kot so delovanje mrežnice, razmnoževanje, rast in diferenciacija celic ter razvoj zarodka pri večini vrst sesalcev. V vseh svojih raznolikih oblikah deluje kot hormon, prav tako pa ima pomembno vlogo pri vizualnem ciklu, kjer omogoča prilagajanje očesne mrežnice na svetlobo (3).

V organizmu se pojavlja v različnih oblikah, ki sodijo v skupino retinoidov in vključujejo naravne spojine in sintezne derivate retinojske kisline. Govorimo o spojinah, ki imajo biološke lastnosti retinola (vitamina A) in njegovih oksidiranih presnovkov (4). V ta razred spadajo predvsem retinol, retinaldehid (drugače znan tudi kot retinal), retinilni estri in

retinojska kislina. V zadnjem času so to klasifikacijo nekoliko razširili, da bi vanjo vključili nove serije sintetičnih spojin, ki so po mehanizmu delovanja podobne naravno pridobljenim retinoidom (2).

1.3.1. KEMIČNE IN FIZIKALNE LASTNOSTI RETINOLA

Retinol je v osnovi primarni nenasičeni alkohol in po kemizmu spada med diterpene. Vsebuje cikloheksenski obroč, na katerega so vezane tri metilne skupine in stranska veriga s štirimi konjugiranimi dvojnimi vezmi, ki se zaključi z alkoholno skupino (slika 1) (4).



Slika 1: Kemijska struktura retinola oziroma vitamina A

Nahaja se v obliki viskozne oljne tekočine svetlo rumene barve, z blagim vonjem po ribah ali brez vonja. Lahko topen je v kloroformu in etru, nekoliko manj je topen v brezvodnem alkoholu in rastlinskih oljih, ni pa topen v glicerolu in vodi. Zaradi velike občutljivosti na kisik, svetlobo, povišano temperaturo in kovinske ione ga shranjujejo v hermetično zaprti posodi, ki ga ščiti pred omenjenimi vplivi iz okolja. Večinoma se nahaja v obliki estrov z višjimi maščobnimi kislinami (npr. palmitinsko), ker so ti stabilnejši (4).

1.3.2. MEHANIZEM DELOVANJA RETINOIDOV

Izmed vseh oblik retinoidov je najaktivnejša retinojska kislina, ki ima na vseh dvojnih vezeh trans konfiguracijo (tretinoin). Vanjo se v našem telesu pod vplivom različnih dejavnikov pretvorijo ostali retinoidi. Deluje kot agonist družine jedrskih receptorjev, ki so znani kot RAR (angl. retinoic acid receptors – receptorji retinojske kisline) in RXR (ang. retinoid X receptors – retinoidni X receptorji). Ob vezavi retinojske kisline, RAR in RXR tvorita heterodimer zmožen interakcije s zaporedji DNA, ki se nahajajo na promotorskih regijah izbranih genov. Za zaporedja se uporablja kratica RARE (ang. retinoic acid response elements – elementi odziva retinojske kisline) (2). Posledica te interakcije je vpliv na transkripcijo, zaradi katere se poveča oziroma zmanjša izražanje specifičnih

proteinov/encimov. Retinoidi preko svojih receptorjev tako vplivajo na rast in delitev celic, sintezo proteinov, proizvodnjo sebuma in življenjsko dobo celic. Posredno vplivajo še na videz finih linij in gub, ker povečajo diferenciacijo in proliferacijo celic povrhnjice in sintezo komponent ekstracelularnega matriksa, ter s tem debelino epidermisa. Nekatera poročila kažejo na to, da zavirajo nastanek kolagenaz (encimi, ki razgrajujejo kolagenska vlakna) in povečajo nastanek glukozaminoglikanov, katerih naloga je vezava vode in hidratacija povrhnjice (1).

1.3.3. TOKSIKOLOŠKI PROFIL RETINOIDOV

Pri rokovanju z retinoidi je potrebno upoštevati nekaj varnostnih nasvetov. V višjih koncentracijah lahko dražijo kožo, kar lahko vpliva na njene barierne lastnosti. Med simptome, ki se pojavijo na mestu nanosa, spadajo srbež, rdečica, pekoč občutek in luščenje zgornjih plasti povrhnjice (6). Koža se po določenem času na retinoide sicer lahko prilagodi, v primeru da se ne, pa moramo z uporabo prekiniti. Pri oblikovanju izdelkov zato težimo k uporabi koncentracij, ki kažejo na klinično učinkovitost in jih koža še lahko prenaša (1). Glede na to, da gre za spojine z močnim delovanjem, so najvišje dovoljene koncentracije v kozmetičnih izdelkih za retinol 0,3 % [m/m], za retinil palmitat (RP) pa 0,7 % [m/m] (7). Draženje lahko nekoliko ublažimo z uporabo retinilnih estrov, ki so dokazano manj dražeči, a kljub temu učinkoviti. Preprečitev draženja lahko dosežemo tudi z dodajanjem nekaterih drugih sestavin (npr. spojin s protivnetnih delovanjem) (1). Retinol ima precej visok dražeč potencial. Ker je koža Azijcev nekoliko občutljivejša, se poleg navedenih koncentracij svetuje, da se pri dajanju izdelkov na azijsko tržišče proizvajalci držijo vrednosti navedenih v Preglednici II (8).

Velika previdnost je prav tako potrebna pri sistemski uporabi vitamina A pri ženskah v reproduktivnem obdobju, saj ta deluje izrazito teratogeno (tj. škodljivo za plod). Med samo uporabo je zato nujno potrebna uporaba kontracepcijskih sredstev (4).

1.4. UPORABA RETINIDOV

Zaradi močnega učinka na epitelno tkivo, se retinol skupaj s svojimi analogi uporablja za zdravljenje številnih kožnih bolezni, kot so akne, psoriaza in aktinične keratoze. Učinkoviti so tudi pri težavah, povzročenih z daljšim izpostavljanjem sončni svetlobi in drugimi dejavniki staranja kože (4). Absorpcija kozmetično aktivne sestavine je navadno hitrejša in

popolnejša iz pripravkov na vodni osnovi, kot so O/V emulzije, disperzije in koloidne vodne raztopine (4). Retinol lahko zasledimo v različnih vrstah kozmetičnih izdelkov, ki delujejo pomlajevalno (»anti-aging«), v izdelkih za nego problematične oziroma aknaste kože ter v izdelkih za posvetlitev kože (2). Priporočena je uporaba znotraj predpisanih koncentracij, ki temeljijo na osnovi ocene tveganja in se razlikujejo glede na mesto in čas nanosa pripravka na kožo. Meje varne uporabe so bile sprejete v EU glede na priporočilo SCCNFP (ang. Scientific Committee of Cosmetology and Non Food Products - Znanstvenega odbora za kozmetiko in neprehrambene proizvode) in so predstavljene v Preglednici II (8).

Preglednica II: Priporočene koncentracije retinola (povzeto po viru 8)

	Retinol %	Predvideno število dnevih nanosov
<i>Krema za obraz</i>	0,01-0,05	2
<i>Nočna krema za obraz</i>	0,05-0,1	1
<i>Krema za roke</i>	0,01-0,05	2
<i>Losjon za telo</i>	0,005-0,01	1
<i>Krema za obraz po sončenju</i>	0,01-0,05	1
<i>Losjon za telo po sončenju</i>	0,005-0,01	1

Pri uporabi izdelkov, ki vsebujejo retinoide se je potrebno držati podrobnih navodil za uporabo. S tem zmanjšamo možnost neželenih učinkov in povečamo toleranco nanje. Za izboljšanje stanja zadostuje že majhna količina izdelka, ki se ga enakomerno razmaže po površini kože. V kolikor je po nanosu na koži viden zaostanek, pomeni, da je bila ta količina presežena, možnost draženja je zaradi tega večja. Pri zmanjševanju tega učinka nam pomaga tudi postopno povečevanje odmerka in števila nanosov izdelka. Prav tako na delovanje vpliva vlažnost kože. Če je ta mokra, je penetracija retinoida v usnjico večja, posledično pa je večje tudi draženje. Eden od napotkov, ki se jih je dobro držati je tudi ta, da izdelke nanašamo pred spanjem, ker se tako znatno zmanjša občutljivost kože uporabnika na ultravijolično svetlobo (1).

- **Izdelki za nego kože proti staranju**

Na tržišču najdemo kar nekaj kozmetičnih izdelkov, ki naj bi delovali pomlajevalno. Termin anti-aging je sicer zastavljen zelo široko in si ga lahko razlagamo na več različnih načinov, od tega da gre le za preprečevanje kot tudi izboljšanje simptomov staranja kože. Glavnina teh izdelkov se osredotoča predvsem na zmanjšanje videza globokih in finih gub, povešanja, hiperpigmentiranosti in izboljšanje teksture kože. Retinoidi delujejo preko retinoidnih receptorjev, zaradi česar imajo na koži specifične učinke. Ti se odražajo predvsem v povečanju gladkosti kože in zmanjševanju gub. Z reguliranjem rasti celic epitelija prispevajo k normalizaciji kožnih sprememb, ki so posledica tako intrinzičnega kot ekstrinzičnega staranja. Pozitivni učinki topikalnega nanosa retinola in njegovih derivatov so po začetku uporabe precej hitro vidni (v roku nekaj dni) pri opazovanju kožne povrhnjice, medtem ko je za zmanjšanje sprememb, ki izhajajo iz globljih plasti potrebno pri uporabi vztrajati od nekaj tednov do nekaj mesecev (1).

▪ **Izdelki za nego aknaste kože**

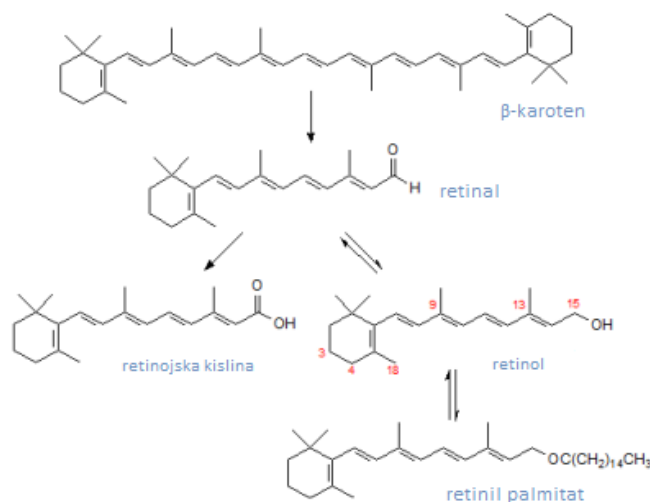
K nastanku aken prispeva več dejavnikov. Izdelki za nego problematične kože so zasnovani tako, da vplivajo na različne stopnje v patogenezi aken. Poznavanje mehanizmov njihovega nastanka pa zagotovi boljše terapevtske rezultate. Vsem aknastim lezijam je skupno, da se začnejo z nastankom zaprtega ali odprtega komedona. Retinoidi so ena izmed temeljnih spojin za zdravljenje aken, zaradi njihove sposobnosti preprečevanja nastanka primarnih aknastih lezij – mikrokomedonov. Tretinoin deluje na način, da prepreči zapiranje izhodnih kanalov žlez lojnic. Poleg tega imajo retinoidi tudi dokaj močan protivnetni učinek, saj zmanjšujejo sproščanje arahidonske kisline iz makrofagov. Kombinacija antikomedogenega in protivnetnega delovanja retinoidov je tako v korist pacientom z vnetno ali nevnetno obliko aken (1).

▪ **Izdelki za posvetlitev kože**

Kozmetične izdelke za posvetlitev kože uporabljamo z namenom odpravljanja razlik v barvi kože. Največkrat so hiperpigmentacije posledica aken, ekcemov, alergij, opeklin ali kemičnih pilingov. Dejanski mehanizem delovanja retinoidov kot sredstev za posvetlitev kože še ni popolnoma znan. Študije na živalih so pokazale, da naj bi sodelovali pri zaviranju encima tirozinaze, ki sodeluje pri sintezi kožnega pigmenta melanina. Nekateri raziskovalci menijo, da delno tudi motijo prenos pigmenta do keratinocitov. Dodatno retinoidi pospešujejo obnavljanje povrhnjice, kar vpliva na deskvamacijo in posledično na odstranitev pigmenta (2).

1.5. VRSTE RETINOIDOV

Glede na strukturne značilnosti lahko retinoide razvrstimo v več generacij, na osnovi tega ali gre za nearomatske, mono- ali poliaromatske spojine (6). Pri podrobnejšem opisu se bomo orientirali predvsem na predstavnike prve generacije, med katere spadajo retinol, retinal in retinojska kislina, ker se le-ti v pripravkih največkrat uporabljajo in so prikazani na Sliki 2.



Slika 2: Oblike vitamina A (22)

1.5.1. RETINOL

Spada v prvo generacijo retinoidov in ga kot aktivno kozmetično sestavino (KAS) najdemo v izdelkih za nego kože. Posredno ga pridobivajo s hidrolizo β -karotena, ali pa je pridobljen neposredno iz nekaterih živil, kot sta ribje olje in živalska jetra (9). Biosinteza se začne s pretvorbo β -karotena v retinal. V organizmu se pod vplivom retinol dehidrogenaze nato ta oksidira v retinol (1). Retinol je šibkejši kot retinojska kislina, za enak učinek bi bile potrebne bistveno večje koncentracije. V kozmetičnih izdelkih ga običajno najdemo v koncentracijah do 0,3 % (7). Po navadi pa so te vrednosti še precej nižje, kar je posledica neželenih učinkov, predvsem draženja kože, ki nastopijo pri višjih koncentracijah (2). Retinol pospešuje mitozo, zvišuje encimsko aktivnost in normalizira keratinizacijo, zaradi česar izboljša in pospeši proces obnove celic. Koža se pri tem obnavlja skozi globlje plasti in postane bolj elastična, povrhnjica in usnjica pa se odebelita.

Prispeva k zmanjševanju finih gub in linij glede na njihovo število, dolžino, širino in površino (8). Trenutno je oblika izbire v kozmetičnih izdelkih, ob njegovem dodatku pa je potrebna zaščita izdelka pred svetlobo in kisikom (6).

1.5.2. RETINAL

Nastane z oksidacijo alkoholne skupine retinola in predstavlja prehodno spojino, pri pretvorbi retinola v aktivno retinojsko kislino. Študije sicer kažejo na njegovo učinkovitost in penetracijo v epidermis in dermis, vendar je ta precej bolj omejena v primerjavi z retinojsko kislino (2). Je pomemben element vidnega pigmenta rodopsina, ki se nahaja v paličastih celicah mrežnice, ki so še zlasti občutljive na šibko svetlobo (6). V kozmetičnih izdelkih je dobro stabilen, vendar se kljub temu, le malokrat uporablja (2).

1.5.3. RETINOJSKA KISLINA

Tretinoin je ime izključno za trans izomer 13-trans-retinojsko kislino, ki je aktivna oblika vitamina A. Registrirana je kot zdravilo, zato je prepovedana za uporabo v kozmetičnih izdelkih. Ostale oblike retinoidov, ki jih danes najdemo na tržišču, bolj ali manj posnemajo njen učinek, predvsem pa stremijo k temu, da se po nanosu na kožo pretvorijo vanjo. Za tretinoin velja, da je približno 10- do 100-krat bolj aktiven od retinola v vseh tkivih, z izjemo retine (4). Lokalno se je ta najprej uporabljal za zdravljenje aken, kasneje še za zdravljenje ihtioze in kot protivnetno sredstvo. Ugodne učinke kaže tudi pri negi fotostarane kože, saj prispeva k zmanjšanju gub in grobosti ter k beljenju sončnih peg (2).

1.5.4. RETINILNI ESTRI (-palmitat, -propionat, -acetat,...)

Primarna vloga retinilnih estrov v koži je skladiščenje vitamina A znotraj celic (2). Poznamo več vrst estrov retinola z višjimi maščobnimi kislinami, med katerimi se najpogosteje uporablja palmitat. Za pretvorbo teh visokomolekularnih derivatov v biološko aktivno obliko je nujna hidroliza esterske vezi s pomočjo encimov esteraz, ki so v koži zastopani v precejšnji meri (2). Pri peroralnem zaužitju pa se jih večina hidrolizira v prebavnem sistemu, natančneje v jetrih, pod vplivom encimov trebušne slinavke (4). Kapaciteta encimske razgradnje in oksidacije v aktivni retinol oziroma trans-retinojsko kislino je kljub temu nekoliko omejena, kot tudi sama penetracija v kožo. Delujejo na podoben način kot ostali retinoidi, le da so precej manj učinkoviti. Med drugim je bilo navedeno, da vplivajo tudi na povečanje debeline epidermalne plasti. Jakost delovanja je pogojena z dolžino verige, pri čemer so kratkoveržni bolj uspešni pri odpravljanju kožnih nepravilnosti kot dolgoveržni. Posledično so zaradi manj učinkovitega delovanja manj

dražeči in se jih lahko uporablja v višjih koncentracijah (2). Poleg retinola so najpogostejša oblika vitamina A v kozmetičnih izdelkih. Popularni so predvsem zaradi večje kemijske stabilnosti (4).

1.6. STABILNOST KOZMETIČNIH IZDELKOV

Kozmetični izdelki morajo biti kakovostni, varni in učinkoviti. Ti trije parametri so neposredno povezani s stabilnostjo samega izdelka. Namen testiranja stabilnosti je tako zagotoviti, da nov oziroma modificiran izdelek ustreza želenim fizikalnim, kemičnim in mikrobiološkim standardom kakovosti. V obravnavo vrednotenja je prav tako vključena funkcionalnost in videz izdelka tekom shranjevanja pri normalnih pogojih v predvideni ovojni (10). Časovno obdobje, znotraj katerega izdelek ohranja svoje prvotne lastnosti v skladu s predpisanimi mejami, definiramo na dva načina, in sicer kot rok uporabnosti in rok uporabnosti po odprtju. Prvega definiramo kot čas do katerega izdelek opravlja svojo nalogo in se ga lahko tudi varno uporablja, drugega pa kot čas po odprtju kozmetičnega izdelka, ko ga lahko še brez škode uporabljamo, trajnost izdelka po odprtju pa ni pomembna (11).

Zaradi velike raznolikosti kozmetičnih izdelkov nimamo na voljo standardiziranih testov stabilnosti. Za izbor testiranja je potrebna strokovna presoja, ki temelji na podlagi specifičnosti proizvodnega procesa in procesa distribucije ter izkušenj. V ta namen se tudi na področju testiranja stabilnosti kozmetičnih izdelkov uporabljajo smernice (ang. Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products), ki pa predlagajo le načelna priporočila za testiranje stabilnosti (10). Ne glede na to ali se ti testi izvajajo v realnih ali pospešenih pogojih staranja, je potrebno poskuse opraviti tako, da pri realnih pogojih shranjevanja zagotovijo ohranjene fizikalno-kemične in organoleptične lastnosti, mikrobiološko kakovost in stabilnost v ovojni skozi čas predvidenega shranjevanja (roka uporabnosti). Z vrednotenjem naštetih parametrov lahko sklepamo na celovito stabilnost izdelka (11).

Stabilnostni testi so testi, ki jih uporabljamo za pridobitev informacij o stabilnosti izdelka in kot pomoč pri opredelitvi roka uporabnosti oziroma roka uporabnosti po odprtju. Za vrednotenje nastalih sprememb znotraj stabilnostnih testov uporabljamo različne analize metode. Pri proučevanju stabilnosti ločimo tri tipe testov (11):

- **Dolgoročna testiranja**, kjer gre za testiranje znotraj daljših časovnih obdobj pri čemer so eksperimentalni pogoji enaki tistim, ki jih srečujemo pri običajnem shranjevanju izdelka. Ti testi so tako časovno kot tudi finančno zahtevni.
- Velikokrat se uporabljajo **pospešeni testi**, ki služijo za napovedovanje roka uporabnosti in se izvajajo po spremembah sestavin, proizvodnega procesa, itd. Podatke pridobimo z uporabo različnih tehnik in testiranj pri različnih temperaturah različno dolgo časa. Testi se pogosto izvajajo pri 37 °C, 40 °C ali 45 °C v obdobju 1, 2, ali 3 mesecev, odvisno od vrste izdelka, ki ga proučujemo (12).
- Pod še ostrejšimi pogoji se izvajajo **stresni testi**, kjer poleg povišane temperature preverjamo tudi vpliv nekaterih drugih dejavnikov, kot sta npr. svetloba in, stresanje.

Spreminjane značilnosti kozmetičnega izdelka, ki jih je možno zaslediti znotraj testov stabilnosti, lahko glede na naravo sprememb razdelimo na kemične, fizikalne in mikrobiološke. Posledice kemičnih nestabilnosti, kot so na primer upad koncentracije kozmetično aktivnih sestavin in sprememba barve, lahko vplivajo tudi na ostala dva vidika sprememb. Med fizikalne spremembe prištevamo sedimentacijo, zgostitev, ločevanje faz idr., medtem ko se pri porastu števila mikroorganizmov (mikrobiološki vidik) posledice kažejo zlasti v spremembah organoleptičnih lastnosti kozmetičnega izdelka (11).

1.6.1. STABILNOST VITAMINA A

Kompatibilnost in stabilnost izdelkov, ki kot eno izmed sestavin vsebujejo vitamin A, se že dolgo raziskuje in je dokaj natančno opisana (3). Stabilnost vitaminov ocenimo na podlagi proučevanja njegove vsebnosti skozi določeno časovno obdobje, kar tudi spada pod kontrolo kakovosti izdelkov. Za zagotavljanje stabilnosti retinoidov v končnem izdelkih je potrebno, da izvajamo oblikovanje in pakiranje v okolju, ki minimizira njihovo izpostavljenost dejavnikom kot so svetloba, kisik in povišana temperatura. Na stabilnost vpliva tudi ovojnina, za katero je najbolje, da je temna in neprepustna za kisik (1). Neustrezno shranjevanje vitaminov lahko privede do postopnega zmanjševanja vsebnosti (zaradi razgradnje) in s tem do zmanjšanja učinkovitosti in varnosti takšnega izdelka. Kemična stabilnost vitamina A je prav tako v neposredni povezavi s fizikalno stabilnostjo oblike (12). V zvezi s stabilnostjo retinola in njegovih derivatov je bilo predlaganih še nekaj drugih pristopov. Eden izmed njih je dodatek spojin z antioksidativnim delovanjem, kot so na primer α -tokoferol, askorbinska kislina, butilhidroksianizol (BHA),

butilhidroksitoluen (BHT) idr. (9). Svojevrstno zaščito pred razgradnjo nudijo tudi nekatere aminokisline ali oblikovanje v lipofilne emulzije (4).

Raziskave kažejo, da se retinol zelo hitro razgrajuje pod vplivom dnevne in ultravijolične svetlobe, povišane temperature, vlage ter kisika. Povišana temperatura ima veliko vlogo pri pospeševanju kemičnih in fizikalnih reakcij, zato je za večjo stabilnost priporočeno shranjevanje pri nizkih temperaturah. Prav tako se lahko zaradi temperature spremenijo nekateri drugi parametri kot sta na primer viskoznost in topnost. Pri višjih temperaturah je manjša tudi topnost kisika v raztopini, ki ima pomembno vlogo pri oksidacijah (11). Vitamin A in njegovi derivati so molekule z večjim številom dvojnih vezi, ki pa so velikokrat podvržene reakcijam oksidacije. Stabilnost vitamina A lahko dosežemo tudi z zaščito izdelka pred svetlobo, ki lahko povzroča nastanek radikalov in različnih razpadlih produktov (11).

Informacije o stabilnosti retinola in RP, ki sta predmet obravnave v diplomski naloge, so bile pridobljene s spletne strani enega vodilnih kemijskih podjetij na svetu - BASF. Za retinol so raziskave pokazale, da je v kozmetičnih izdelkih, ki so bili izdelani v inertnem atmosferskem okolju in shranjeni v aluminijastih tubah pri 20 °C, stabilen vsaj 6 mesecev (8). Drug vir navaja tudi, da se več kot 50 % vitamina A razgradi med njegovo uporabo (4).

Retinilni estri izkazujejo še največjo stabilnost v izdelkih. Taki izdelki imajo po navadi rok trajanja po odprtju 12 mesecev, če so shranjeni v originalno zaprtih vsebnikih na maksimalno 25 °C. To obdobje se podvoji, če jih shranjujemo pri 5 °C (13).

2. NAMEN DELA

Dandanes na tržišču najdemo precej izdelkov, ki podpirajo lastno obrambo različnih vrst kože, predvsem pred poškodbami, ki jih izzovejo UV-svetloba, stres, onesnažen zrak, ipd. K izboljšanju pripomorejo KAS, ki jih izdelki vsebujejo. Eno izmed teh bomo proučevali v okviru diplomske naloge. Retinol in njegovi derivati se uporabljajo predvsem v kozmetičnih izdelkih za nego zrele kože, kot tudi v izdelkih, ki preprečujejo nastanek aken in kožnih hiperpigmentacij. Delujejo predvsem pomlajevalno, saj pospešujejo epitelizacijo, kar naredi kožo bolj prožno in na videz manj nagubano ter mladostno (14).

Tekom diplomske naloge bomo proučevali vsebnosti retinola in njegovega estra RP v različnih kozmetičnih izdelkih. Te bomo izpostavili pogojem, ki pospešujejo razpad aktivne sestavine, z namenom vrednotenja stabilnosti v različnih časovnih točkah. Pri izbiri testnih kozmetičnih izdelkov se bomo osredotočili predvsem na kreme, pri katerih je že na ovojninah poudarjeno, da vsebujejo eno ali obe izmed testiranih spojin. Izbrali bomo izdelke različnih proizvajalcev in cenovnih razredov, saj želimo preveriti ali tudi cena in blagovna znamka posredno vplivata na stabilnost aktivne učinkovine v kozmetičnem izdelku.

Vsebnost obeh predstavnikov retinoidov bomo v vzorcih vrednotili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Pri optimizaciji metode bomo izhajali iz postopka za vrednotenje retinil palmitata v mazilu (3) in že postavljene metode HPLC za vrednotenje lipofilnih vitaminov v enostavnih raztopinah (15). Postopek bomo prilagodili, da bo ta primeren za izbrane vzorce testiranih izdelkov in ga ustrezno ovrednotili. Prilagojeno metodo, vključno s pripravo vzorca, bomo ovrednotili z vrednotenjem selektivnosti, ponovljivosti, točnosti, linearnosti in stabilnosti ter uspešnosti izkoristka priprave vzorca. Nato bomo preučevali vpliv različnih dejavnikov, kot so temperatura (25

in 40 °C), svetloba (z in brez) in kisik (z in brez), ki imajo pomembno vlogo pri stabilnosti vitamina A. Na osnovi dobljenih rezultatov vsebnost retinola in RP v izbranih kozmetičnih izdelkih bomo preverili njuno obstojnost pri izpostavitvi omenjenim dejavnikom nestabilnosti skozi daljše časovno obdobje.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. REAGENTI IN TOPILA

- Acetonitril (ACN), C_2H_3N , $M_r = 41,05$ g/mol, Chromasolv, for HPLC, gradient grade; Sigma-Aldrich, Nemčija
- Tetrahidrofuran (THF), C_4H_8O , $M_r = 72,11$ g/mol, Chromasolv, for HPLC; Sigma-Aldrich, Nemčija
- Metanol (MeOH), CH_3OH , $M_r = 32,04$ g/mol, Chromasolv, for HPLC; Sigma-Aldrich, Nemčija
- n-heksan, C_6H_{14} , $M_r = 86,18$ g/mol, puriss. p.a., ACS reagent, $\geq 99\%$ (GC); Sigma-Aldrich, Nemčija
- MilliQ voda, H_2O ; Fakulteta za farmacijo, Slovenija

3.1.2. STANDARDI

- Retinol, $C_{20}H_{30}O$, $M_r = 286,45$ g/mol, BioXtra, $\geq 97,5\%$ (HPLC), ~ 3100 enot/mg; Sigma, Švica
- Retinil Palmitat, $C_{36}H_{60}O_2$, $M_r = 524,86$ g/mol, jakost: $\geq 1,700,000$ USP enot na g; Sigma, Švica
- Butilhidroksitoluen, $C_{15}H_{24}O$, $M_r = 220,35$ g/mol, $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich, Nemčija

3.1.3. NAPRAVE IN PRIBOR

- Digitalna tehtnica Exacta 300 EB; Tehtnica, Slovenija
- Analitska tehtnica Excellence Plus; Mettler, Toledo, Švica

- Sistem za pripravo MilliQ vode A10 Advantage; Millipore, ZDA
- Laboratorijska centrifuga Centric 400R; Tehnica, Slovenija
- Hladilnik; Gorenje, Slovenija
- Magnetno mešalo Vibromix 10; Tehnica, Slovenija
- Ultrazvočna kadička Sonis 4; Iskra Pio, Slovenija
- Ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex; Bandelin, Nemčija
- Sušilec las za sušenje steklenega pribora Pro 2000 Ioniceramic; BaByliss, Francija
- Klimatska komora VC 4034; Vötsch Industrietechnik GmbH, Nemčija
- Klimatska komora ICH 260L; Memmert, Nemčija
- Avtomatizirani sistem za sušenje, TurboVap LV; Caliper Life Science, ZDA
- Avtomatske pipete: 100-1000 µl, 20-200 µl; Eppendorf, Nemčija
- Stekleni inventar: bučke, čaše, epruvete, viala, merilni valji, tehtalni čolnički, zamaški, petrijevke
- Plastične epruvete z zamaškom: 15 in 50 ml
- Ostalo: spatule, Parafilm M, kapalke, stojala
- HPLC sistem, Agilent Technologies 1100/1200 Series; ZDA
 - Kvarterna črpalka
 - Avtomatski vzorčevalnik
 - Termostat za kolono
 - UV/VIS detektor
 - Programska oprema ChemStation

3.1.4. KOZMETIČNI IZDELKI Z VITAMINOM A

Uporabili smo 5 različnih kozmetičnih izdelkov, namenjenih predvsem negi obraza, ki smo jih bodisi kupili v lekarni in drogeriji, ali pa jih naročili prek spleta. Kozmetični izdelki so spadali v različne cenovne razrede, vsakega izmed njih (z izjemo dražje kreme Vichy) pa smo kupili v dvojicah. Na izdelkih je bilo označeno, da vsebujejo vsaj eno izmed sestavin vitamin A (retinol, RP ali pa oboje) (Preglednica III).

Preglednica III: Testirani kozmetični izdelki z vitaminom A

Št. vzorca	Ime vzorca	Rok uporabe po odprtju	Količina vitamina A	Slika

1	EVELINE COSMETICS: Anti-Wrinkle Night Cream Coenzymes of Youth Q10 plus R	6 mesecev	ni podatka o količini	
2	EVELINE COSMETICS: Anti-Wrinkle Day Cream Coenzymes of Youth Q10 plus R	6 mesecev	ni podatka o količini	
3	L'OREAL: Hydra Active 3 krema za obraz	12 mesecev	ni podatka o količini	
4	VICHY LABORATORIES: Liftactive Advanced Filler	12 mesecev	0,2% retinol	
5	Derma e: Anti-Wrinkle Vitamin A Retinyl Palmitate Creme	6 mesecev	10,000 I.U. oz. 5,5 mg RP/ 100g kreme	

3.2. METODE

3.2.1. RAZVOJ ANALIZNE METODE

Metoda za vrednotenje vsebnost različnih lipofilnih vitaminov v zdravilih in prehranskih dopolnilih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti je bila že predhodna razvita (15).

Kromatografski pogoji za vrednotenje vsebnosti RP in retinola v izbranih kremah:

- Kolona: Luna C18(2), 5 μ m, 150 x 4,6mm; Phenomenex, ZDA
- Sestava mobilne faze: THF : ACN : H₂O = 45 : 50 : 5 (v/v/v)
- Pretok mobilne faze: 1 ml/min
- Temperatura kolone: 40 °C
- Valovna dolžina detekcije: 325 nm
- Volumen injiciranja: 10-40 μ l (20 μ l pri validaciji)
- Retencijski čas RP: 5,7-6,9 min
- Retencijski čas retinola: 2,1-2,3 min
- Čas analize: 7,5 min

3.2.2. OPTIMIZACIJA METODE IN PRIPRAVA VZORCEV

Optimizacijo metode smo izvajali na pripravku številka 1 - Eveline - Night (Preglednica III), pri čemer smo izhajali iz postopka (3). Spreminjali smo različne parametre, da smo prišli do maksimalnega odziva, iz katerega smo kasneje določili koncentracije KAS v izdelkih. Za vse vzorce je bil volumen injiciranja 20 μ l.

3.2.2.1. Izbira ustreznega topila za ekstrakcijo

V 10-ml stekleno bučko s širokim vratom smo natehtali 0,5 g kreme in dodali heksan do oznake. Bučko smo za 15-60 minut postavili v ultrazvok (UZ), ker nas je zanimal vpliv UZ kopeli na izkoristek ekstrakcije. 1 ml raztopine smo nato odpipetirali v steklene epruvete ter jih za 10 minut prenesli v avtomatizirani sistem za sušenje pri temperaturi 40 °C. Suh preostanek smo rekonstituirali v 1 ml mobilne faze in vsebino prenesli v HPLC-viale. Vzorec v 10-ml bučki smo pustili še en dan in nato ponovno preverili uspešnost ekstrakcije RP iz kreme v heksan.

Ker je bila krema v heksanu slabo topna, smo v nadaljnjem koraku uporabili bolj polarni organski topili MeOH in ACN, ki se s heksanom ne mešata. V dve plastični epruveti z zamaškom smo natehtali približno 0,5 g kreme. V eno smo dodali 2 ml MeOH v drugo pa enako količino ACN. Vsebino v epruvetah smo ročno premešali in ju nato postavili v UZ kopel za 10 minut. Del vzorca smo prenesli v vialo in analizirali, drugi del vzorca smo ponovno analizirali po treh urah, nato pa še po dveh dneh, da bi preverili ali smo že predhodno dosegli maksimalno koncentracijo ekstrahirane RP.

Zadnji poskus ekstrakcije smo izvedli z združitvijo polarnega (ACN ali MeOH) in nepolarnega topilo (heksan). V dve plastični epruveti z zamaškom smo natehtali približno 0,5 g kreme. V eno smo dodali 2 ml MeOH v drugo pa enako količino ACN ter postavili v UZ kopel za 10 minut. Nato smo dodali 8 ml heksana (skupni volumen 10 ml) in 10 minut mešali na magnetnem mešalu ter počakali na ločitev faz. Odpipetirali smo 600 μ l zgornje faze (heksan z raztopljenim analitom), jo posušili v sistemu za sušenje in suh ostanek rekonstituirali v 600 μ l mobilne faze ter vsebino prenesli v HPLC-vialo. Dodatno smo pripravili tudi vzorce po 1 h inkubiranja kreme v zmesi heksana z obema topiloma.

3.2.2.2. Optimizacija postopka ekstrakcije

Natehtali smo 0,5 g kreme v plastično epruveto s pokrovčkom, dodali 2 ml ACN in jo postavili v UZ kopel za 5 minut. Nato smo dodali 8 ml heksana in vsebino premešali z vibracijskim mešalom od 2,5 do 10 minut. Poskus smo ponovili še enkrat, le da smo tokrat preverjali kako se uspešnost ekstrakcije spreminja s časom izpostavitve UZ kopeli (5-15 minut) ob konstantnem času mešanja (5 minut) na vibracijskem mešalniku. Odpipetirali smo 500 μ l zgornje faze (heksan z raztopljenim analitom), jo posušili in suh ostanek rekonstituirali v 1000 μ l mobilne faze.

3.2.2.3. Priprava vzorcev za vrednotenje ponovljivosti in linearnosti postopka ekstrakcije

Z različnimi natehtami kreme smo preveriti linearnost postopka priprave vzorca. Poskuse smo izvajali v 3 paralelkah z masami 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 in 2,5 g. V plastično epruveto smo natehtali ustrezno maso kreme in dodali 2 ml ACN ter vzorce za 5 minut postavili v UZ kopel. Nato smo dodali 8 ml heksana in vzorce mešali 5 minut z vibracijskim mešalom. Pri masi kreme ≥ 2 g ni prišlo do ločitve faz, zato smo kremo prenesli v 50 ml plastično epruveto z zamaškom in uporabili večje volumne topil (4 ml ACN in 16 ml heksana). Po ločitvi faz smo odpipetirali 500 μ l supernatanta v steklene epruvete, ga posušili in suh ostanek rekonstituirali v 1000 μ l mobilne faze.

Za preverjanje ponovljivosti postopka smo 1 g kreme natehtali petkrat, vsakega od teh petih vzorcev pa smo pripravili v 3 paralelkah. Nadaljnji postopek je bil enak kot pri vrednotenju linearnosti (glej zgoraj). Izračunali smo skupno povprečje in standardni odklon (SD) odzivov vseh 15 vzorcev ter rezultat izrazili z relativnim standardnim odklonom (RSD).

3.2.2.4. Priprave raztopin stabilizatorja za stabilizacijo vitamina A

Kot stabilizator smo uporabili BHT s koncentracijo 10 mg/l. Natehtali smo 1 mg BHT in ga raztopili v 100 ml mobilne faze oz. heksana. Raztopino BHT z mobilno fazo smo uporabljali pri rekonstituciji vzorcev za povečevanje stabilnosti, raztopino BHT s heksanom pa pri pripravi raztopine standarda. Da bi vzorce še bolj stabilizirali, smo po dodatku mobilne faze v epruvete, le-te pokrili s parafilmom.

3.2.2.5. Priprava raztopine standarda za izračun izkoristka ekstrakcije

Natančno smo natehtali približno 2,5 mg RP, ga kvantitativno prenesli v 5-ml bučko in dopolnili do oznake s heksanom, ki smo mu dodali BHT (postopek 3.2.2.4.). Nato smo odpipetirali 500 µl te raztopine v 25-ml bučko, ki smo jo predhodno napolnili do polovice s heksanom z BHT. Bučko smo dopolnili s heksanom z BHT do oznake in vsebino ročno premešali. Končna koncentracija RP v pripravljeni raztopini je bila tako 10 mg/l. 500 µl pripravljene raztopine standarda smo odpipetirali v epruvete in jih prenesli v avtomatizirani sistem za sušenje pri temperaturi 40 °C in suh ostanek rekonstituirali v 1 ml mobilne faze z BHT.

3.2.2.6. Izračun izkoristka ekstrakcije

V plastično epruveto s pokrovčkom smo natehtali 1 g kreme in dodali 2 ml ACN. Vsebino smo ročno premešali in jo postavili v UZ kopel za 5 minut. Nato smo dodali 8 ml heksana (V_z) oz. 8 ml heksana s standardom (V_{zst}), pripravljenim po postopku 3.2.2.5. in mešali 5 minut z vibracijskim mešalom. Odpipetirali smo 500 µl supernatanta v stekleno epruveto, ga posušili pri 40 °C in suh ostanek rekonstituirali v 1 ml mobilne faze z dodanim stabilizatorjem BHT (3.2.2.4.).

Izkoristek smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{izkoristek} = \frac{VZ_{st} - VZ}{St} \times 100 [\%] \quad \text{Enačba 1}$$

VZ_{st} odziv vzorca z dodanim standardom

VZ odziv vzorca

St odziv standarda (3.2.2.5)

3.2.3. VREDNOTENJE METODE HPLC

Metodo smo validirali v skladu z ICH smernicami (ang. International Conference on Harmonisation - Mednarodna konferenca o harmonizaciji) (16), pri čemer smo preverjali

validacijske parametre: selektivnost, točnost, ponovljivost (znotraj-dnevna, med-dnevna) in linearnost. Prav tako smo preverili stabilnost kontrolnih raztopin retinola in RP.

3.2.3.1. Priprava vzorcev za vrednotenje metode HPLC

Natehtali smo natančno približno 2,5 mg RP in ga prenesli v 5 ml bučko in do oznake dopolnili z mobilno fazo z dodanim BHT (3.2.2.4.) ter dobro premešali. Na enak način smo pripravili standard retinola. Koncentracija obeh analitov v raztopini je znašala približno 500 mg/l. Iz obeh bučk smo nato odpipetirali po 1 ml raztopine in ju prenesli v 10 ml bučko ter do oznake dopolnili z mobilno fazo z dodanim BHT (koncentracija obeh analitov je bila 50 mg/l). Iz slednje smo nato pripravili razredčitve in dobili raztopine s koncentracijami med 1 mg/l in 50 mg/l. Za kalibracijske vzorce (priprava umeritvene premice) smo uporabili vzorce s koncentracijami 1, 3, 4, 6, 8, 20, 25, 40, 50 mg/l za kontrolne vzorce pa 2, 5 in 10 mg/l.

3.2.3.2. Vrednotenje metode HPLC

▪ **Selektivnost:**

Pri selektivnosti preverjamo kako je metoda zmožna ločevati med različnimi analiti (17). Selektivnost metode smo preverjali z opazovanjem kromatografskih vrhov referenčne raztopine retinola in RP ter mobilne faze z dodanim stabilizatorjem. Vzorci so bili pripravljeni po postopkih opisanih v poglavjih 3.2.2.4. in 3.2.3.1.

▪ **Točnost in ponovljivost:**

Točnost predstavlja ujemanje med dejansko koncentracijo in koncentracijo, ki smo jo določili z meritvami (Enačba 2). Ujemanje smo predstavili v obliki %, za mejo sprejemljivosti ujemanja izmerjene in dejanske koncentracije, pa smo definirali interval [90-110 %]. Vrednotili smo znotraj- in med-dnevno točnost. Točnost je v tesni povezavi z natančnostjo, ki je stopnja skladanja, za katero nadaljnje meritve kažejo enake ali podobne rezultate (17). Vrednotili smo jo z vidika med-dnevne in znotraj-dnevne ponovljivosti. Poskuse smo izvajali v okviru tridnevne validacije, za kar smo uporabili tri različne kontrolne vzorce, ki so zajemali koncentracijsko območje med 2 in 10 mg/l. Vzorce smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.1. Preverjali smo tudi ponovljivost injiciranja pri čemer smo enega izmed kontrolnih vzorcev injicirali šestkrat. Za mejo sprejemljivosti, ki smo jo izrazili z RSD, smo si izbrali 5 % za znotraj-dnevno in 10 % za med-dnevno ponovljivost.

Točnost smo izračunali po naslednji enačbi

$$\text{točnost} = \frac{C_{\text{izmer}}}{C_{\text{teor}}} \times 100 [\%] \quad \text{Enačba 2}$$

C_{izmer} izmerjena koncentracija

C_{teor} dejanska oz. teoretična koncentracija

▪ **Linearnost:**

Linearnost analizne metode je njena sposobnost, da poda/pridobi rezultate testov, ki so neposredno proporcionalni koncentraciji v vzorcu (17). Kalibracijski vzorci so bili v koncentracijskem območju od 1 do 50 mg/l. Uporabili smo osnovno raztopino, ki smo jo pripravili vsak dan na novo po postopku 3.2.3.1. Izdelali smo umeritvene premice za retinol in RP in določili enačbe premice ter determinacijske koeficiente (R^2). Mejo za sprejemljivo linearnost smo postavili na $R^2 > 0,999$.

▪ **Stabilnost kontrolnih vzorcev**

Preverjali smo stabilnost kontrolnih vzorcev s koncentracijami 2, 5 in 10 mg/L, ki smo jih pripravili po postopku 3.2.3.1. Te vzorce smo analizirali v več časovnih točkah – ob času 0, ter po 3, 6 in 22 urah. Rezultat smo podali kot razmerje odzivov v posamezni časovni točki, glede na odziv ob času 0, izražen v %.

3.2.4. STABILNOSTNA ŠTUDIJA

Vse kozmetične izdelke z izjemo kreme Vichy smo testirali v dvojicah. Enega izmed njih smo shranjevali pri sobni temperaturi, drugega pa smo izpostavili različnim pogojem. Vrednotili smo vsebnost oziroma stabilnost preiskovane KAS, ki jo vsebuje izdelek in podatke predstavili v obliki grafov. Optimizacijo postopka priprave vzorca smo izvedli na kremi Eveline - Night. Metodo smo pred začetkom testov stabilnosti še enkrat optimizirali in prilagoditi za vsako kremo posebej.

3.2.4.1. Priprava vzorcev za stabilnostno študijo

Kremo smo natehtali v plastične epruvete z zamaškom, dodali 2 ml ACN in za 5 minut postavili v UZ kopel. Po dodatku 8 ml heksana z dodanim BHT, smo mešali 5 minut z vibracijskim mešalom, in nato za 10 minut vzorce centrifugirali na 5000 obratov. Potem smo odpipetirali določen volumen supernatanta v steklene epruvete (Preglednica IV) in ga sušili 30 minut na 40 °C. Suh ostanek smo rekonstituirali v 1 ml mobilne faze z dodanim BHT (3.2.2.4.), epruvete pa zaščitili s parafilmom in jih za 10 minut postavili v UZ kopel. Preden smo vsebino prenesli v vialo, smo jo še enkrat premešali na vibracijskem mešalu (1

minuta). Postopek je za celotno stabilnostno študijo ostal enak, pri različnih vzorcih krem so se spreminjali le pogoji, ki so predstavljeni v Preglednici IV.

Preglednica IV: Spremenljivke pri pripravi različnih vzorcev krem za stabilnostno študijo

Vzorec	Masa kreme (g)	V _{inj.} (μl)	V _{supernatanta} (ml)
Eveline - Night, Eveline - Day, L'oreal	1	20	1
Vichy	0,2	10	0,5
Derma e	1	40	2

V časovni točki 0 so bili vsi vzorci pripravljeni v treh paralelkah, ustrezno maso kreme pa smo natehtali dvakrat. V nadaljevanju smo poskuse glede na ponovljivost posameznih meritvev izvajali v dveh ali treh paralelkah in za vsako od njih izračunali povprečno vrednost, SD in RSD. Če je rezultat katere od paralelek bistveno odstopal, ga nismo upoštevali.

3.2.4.2. Vpliv temperature

Opazovali smo vpliv temperature na stabilnost retinola oz. RP v kremah, pri čemer smo vzorce shranjevali v predalu v laboratoriju pri sobni temperaturi (25 °C) in pri povišani temperaturi v klimatski komori pri pogojih 40 °C in 75 % relativni vlažnosti (RV). Vsi vzorci so bili shranjevali v primarni ovojnini. Vzorce smo pripravili po postopku 3.2.4.1. v naslednjih časovnih točkah: 0, 1, 2, 4, 6 in 8 tednov.

3.2.4.3. Vpliv kisika

V steklene petrijevke smo prenesli 3 g kreme Vichy in po 10 g ostalih krem. Vzorce smo postavili v klimatsko komoro pri pogojih 40 °C in 75 % RV. Meritve smo izvedli po postopku 3.2.4.1. V prvi časovni točki smo poskus izvajali tako, da smo enako maso kreme natehtali dvakrat in vzorce sušili v treh paralelkah, na ta način smo za vsak pripravek dobili rezultate za šest vzorcev. Kasneje smo glede na sipanje rezultatov postopek deloma prilagodili – v nekaterih primerih smo maso kreme natehtali enkrat, vzorce pa sušili v dveh paralelkah. Vzorce smo vrednotili ob času 0 in nato še po enem in dveh tednih.

3.2.4.4. Vpliv svetlobe

V steklene petrijevke smo prenesli 1 g kreme Vichy in po 3 g ostalih krem. Petrijevke smo pokrili s pokrovčkom in zatesnili s parafilmom. Postavili smo jih v klimatsko komoro na 40 °C in 75 % RV. Vzorce smo testirali po 4 dneh, meritve pa izvajali na enak način kot v primeru preverjanja vpliva kisika.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. OPTIMIZACIJA METODE IN PRIPRAVA VZORCEV

4.1.1. OPTIMIZACIJA METODE HPLC

Predhodno razvito HPLC metodo (15) smo prilagodili, da je bila optimalna za našo študijo. V ta namen smo spremenili valovno dolžino detekcije. Za valovno dolžino smo namesto 270 nm izbrali 325 nm, saj pri tej valovni dolžini retinoidi najboljše absorbirajo. Hkrati pri tej valovni dolžini absorbira zelo malo organskih spojin, zato smo s tem tudi zmanjšali vpliv ozadja in izboljšali selektivnost metode.

4.1.2. IZBIRA USTREZNEGA TOPILA ZA EKSTRAKCIJO

Sprva smo uporabili postopek iz literature (3), a smo kmalu ugotovili, da je v organskem topilu heksanu krema slabo topna. Ekstrakcija RP iz kreme je bila minimalna, saj je bil odziv tega analita komaj zaznan. Z obdelavo z ultrazvokom (15-60 minut) smo želeli doseči večjo uspešnost ekstrakcije, a smo dosegli nezadovoljiv rezultat. Rezultati poskusov s heksanom so predstavljeni v preglednici V. Vzorec kreme v heksanu smo pustili stati še en dan in ugotovili, da se je rezultat bistveno spremenil – odziv se je povečal še za približno trikrat (36,3 po 60 minutah na UZ in 91,1 po enem dnevu). Krema v heksanu ni dobro topna, sestavine so se sproščale v topilo šele po dolgotrajnem mešanju, ko smo kremo pustili stati čez noč v topilu,

Preglednica V: Preverjanje vpliva ultrazvoka ob uporabi heksana kot ekstrakcijskega topila na uspešnost ekstrakcije RP

Čas delovanja ultrazvoka (min)	15	30	45	60
Odziv RP	3,4	14,5	27,6	36,3

Zato smo v nadaljevanju iskali bolj primerna topila za ekstrakcijo RP iz kreme. Mobilna faza, ki je bolj polarna od heksana, prav tako ni bila primerna, saj nismo zabeležili omembe vrednega odziva RP. Zaradi slabega izkoristka v predhodnih topilih smo raztapljanje kreme testirali v dveh polarnih topilih, ki se s heksanom ne mešata – MeOH in ACN. Obe topili sta se izkazali kot boljši v primerjavi s heksanom (Preglednica VI), že neposredno po dodatku topil je bil odziv za RP nekajkrat višji kot v primeru heksana (> 80). Po 3 urah ekstrahiranja pa je bil izkoristek še nekoliko boljši. Vendar pa predolg čas stika med kremo in topilom ni bil ustrezen, saj se je po 2 dneh odziv malenkost znižal glede na začetno vrednost. To pa je verjetno posledica manjše stabilnosti analita v obeh

topilih. ACN se je izkazal za bolj primerno topilo kot MeOH (Preglednica VI). Primerjalno glede na heksan je tudi priprava v ACN oz. MeOH lažja, saj je bila krema v obeh topilih bolj topna.

Preglednica VI: Uspešnost postopka ekstrakcije RP pri uporabi posameznih polarnih topil MeOH in ACN

TOPILO	ODZIV RP
MeOH	84,8
MeOH (3h)*	94,3
MeOH (2 dni)*	81,6
ACN	125,0
ACN (3h)*	144,3
ACN (2 dni)*	111,5

* čas dodatnega stika s kremo po soniciranju

Kljub temu da polarni topili izboljšata raztapljanje kreme, RP lažje prehaja v nepolarna topila, ker je sam zelo nepolaren. Zato smo v nadaljevanju preverili še kombinacijo obeh vrst topil. Izkoristek je bil tako v kombinaciji ACN in heksana kakor tudi v kombinaciji MeOH in heksana občutno višji (Preglednica VII) kot pa v primeru uporabe samo ACN oz. MeOH (preglednica VI). Tudi v kombinaciji je ACN favoriziran pred MeOH. Ugotovili smo tudi, da po daljšem času stika kreme v kombinaciji heksana in boljšega polarnega topila - ACN (1 h), praktično ne pride do spremembe v odzivu RP, kar pomeni, da je prehod analita v heksan takojšen. Hidrofilne komponente kreme prehajajo v polarna MeOH oz. ACN, lipofilne komponente (vključno z lipofilnim RP in retinolom) pa v nepolaren heksan. Zaradi večjega odziva smo za ekstrakcijsko topilo izbrali ACN in z njim postavili končen postopek priprave vzorca.

Preglednica VII: Uspešnost postopka ekstrakcije RP pri uporabi kombinacije polarne in nepolarne topila

TOPILO	ODZIV RP
heksan + MeOH	157,7
heksan + MeOH (1h)*	180,6
heksan + ACN	198,4
heksan + ACN (1h)*	200,9

* čas dodatnega stika s kremo po soniciranju

4.1.3. OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA

Za nadaljnjo optimizacijo postopka smo preverjali vpliv časa mešanja na vibracijskem mešalu in čas obdelave na UZ kopeli pri optimalni sestavi organskega topila v skladu s postopkom, opisanim v poglavju 3.2.2.2.. Rezultati so predstavljeni v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Vpliv mešanja in ultrazvoka na uspešnost postopka ekstrakcije RP

POGOJI TESTIRANJA	ČAS	ODZIV RP
VIBRACIJSKO MEŠALO	2,5 min	74,1
	5 min	86,6
	10 min	80,6
ULTRAZVOK	5 min	86,1
	10 min	80,9
	15 min	81,4

Ugotovili smo, da UZ nima bistvenega vpliva uspešnost prehoda RP iz kreme v ACN, zato smo izbrali 5 minut, kjer je tudi najvišji odziv in najkrajši čas priprave vzorca. Pri sami porazdelitvi RP med ACN in heksan pa je najprimernejši čas mešanja prav tako 5 minut. Maksimalen odziv RP je bil primerljiv pri vrednotenju obeh parametrov.

4.1.4. PREVERJANJE PONOVLJIVOSTI IN LINEARNOSTI POSTOPKA PRIPRAVE VZORCA

Preverjali smo ali z naraščanjem mase kreme po optimiziranem postopku, linearno narašča tudi odziv RP. V ta namen smo testirali mase kreme od 0,5 do 2,5 g. Iz rezultatov v preglednici IX je razvidno, da lahko v postopku priprave vzorca uporabimo do 2 g kreme. Nominalne vrednosti (odziv glede na 0,5 g kreme) so namreč za vse mase zelo primerljive, odstopa le 2,5 g. Razlog za nekoliko večje odstopanje je lahko tudi prilagojen postopek priprave vzorca (prenos v večjo epruveto, opisano v 3.2.2.3.). Kljub temu so rezultati linearnosti (odziv RP glede na maso kreme) zadovoljivi, saj je determinacijski koeficient enak 0,9975 vključno z upoštevanjem mase kreme 2,5 g (preglednica IX). Vseeno pa priporočamo, da se pri pripravi vzorca uporabi maksimalno 2 g kreme. V tem primeru bi bil $R^2 = 0,9985$.

Preglednica IX: Vpliv mase kreme na linearnost postopka priprave kreme

MASA KREME	POVPREČNI ODZIV RP	NOMINALNA VREDNOST RP NA 0,5 g	ENAČNA PREMICE IN R^2
0,5 g	92,2	92,2	
1 g	185,5	92,7	$y = 177,7x + 8,6351$
1,5 g	285,4	95,1	$R^2 = 0,9975$
2 g	367,2	91,8	
2,5 g	445,6	89,1	

Pri optimizaciji postopka priprave vzorca smo pri večini poskusov uporabili 1 g kreme. Zbrani rezultati ponovitev priprave vzorca pri optimiziranih pogojih so predstavljeni v preglednici X. Glede na to, da je $RSD < 2 \%$ sklepamo, da je postopek zelo ponovljiv oz. ustrezen.

Preglednica X: Ponovljivosti postopka priprave vzorca kreme Eveline - Night

ŠT. VZORCA KREME – 1g	POVPREČNI ODZIV RP	SKUPNO POVPREČJE
1.	184,4	185,5
2.	189,2	SKUPNI SD
3.	181,3	3,0
4.	187,4	RSD [%]
5.	185,0	1,64

4.1.5. STABILIZIRANJE VZORCEV IN VREDNOTENJE IZKORISTKA

Z računanjem izkoristka (angl. recovery) smo preverili uspešnosti metode. Če je izkoristek maksimalen (100 %), se ekstrahira celotna količina analita in je metodo posledično ustrezna (18). Izkoristek ekstrakcije smo vrednotili v skladu s postopkom opisanim v poglavju 3.2.2.6. po enačbi 1. V prvem poskusu smo dobili izkoristek višji od pričakovanega (preglednica XI, 118 %). Pri iskanju razlage za takšen rezultat sta bili dve verjetni možnosti: 1. med pripravo vzorca je prišlo do hlapenja heksana in s tem do koncentriranja RP v raztopini, 2. retinoidi so nestabilni in pod vplivom različnih dejavnikov razpadajo (enačba 1, upad vsebnosti standarda pomeni večji izkoristek). Zato smo v nadaljevanju dodatno optimizirali postopek priprave vzorca - vzorec smo stabilizirali z dodatkom antioksidanta BHT, ki preprečuje razpad retinola in RP (15). Sprva smo le-tega dodali v heksan, nato pa smo s poskusi ugotovili da so bili rezultati boljši, ko smo ga dodali še v mobilno fazo (Preglednica XI). Hlapenje heksana in dostop kisika pa smo preprečili tako, da smo epruvete pokrili s parafilmom. Izkoristek ekstrakcije je bil po dodatni optimizaciji blizu 100 % (preglednica XI, 101 %).

Preglednica XI: Izkoristek ekstrakcije RP pred in po stabiliziranju vzorcev (dodatek antioksidanta BHT, zaščita s parafilmom)

PRED DODATKOM BHT			PO DODATKU BHT+PARAFILMA		
VZORCI	ODZIVI RP	POVPREČJE	VZORCI	ODZIVI RP	POVPREČJE
krema + standard	568,72	569,99	krema + standard	1110,35	1113,17
	577,31			1117,47	
	563,95			1111,68	
krema	185,27	183,98	krema	180,31	184,20
	183,30			185,66	

	183,38			186,64	
standard	317,76	326,32	standard	910,66	918,86
	334,89			925,33	
				920,61	
IZKORISTEK	118,3%		IZKORISTEK	101,1%	

4.2. VREDNOTENJE HPLC METODE

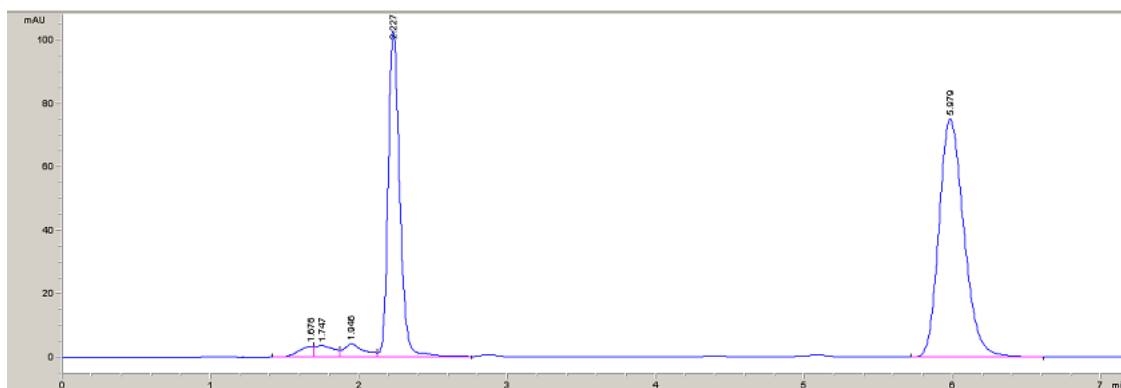
▪ Selektivnost

Selektivnost smo vrednotili z analizo mobilne faze z dodanim BHT (Slika 3) in z analizo raztopine obeh standardov, pripravljenih po postopku 3.2.3.1. (Slika 4). Preverjali smo, če so kromatografski vrhovi med seboj dobro ločeni, oziroma, če se pri določenem retencijskem času eluira samo ena od komponent.



Slika 2: Kromatogram mobilne faze z BHT

Iz Slike 4 je razvidno, da ima retinol retencijski čas 2,2 minuti, RP pa 5,9 minut. Vrhova sta jasno ločena in gre za dve samostojni spojini, medij pa pri tem nima nobenega vpliva. Pri retencijskem času obeh analitov ni prišlo do interferenc.



Slika 3: Kromatogram standarda retinola (2,2 min) in RP (5,9 min) v mobilni fazi z BHT s koncentracijo 10 mg/l

▪ Dnevna točnost in ponovljivost

Vrednotili smo jih v skladu s postopkom, opisanim v poglavju 3.2.3.2. Analizirali smo vzorce s koncentracijami 2-10 mg/l, ki smo jih pripravili v 3 paralelkah. Povprečna in posamezne točnosti so bile pri retinolu in RP znotraj navedenega intervala [90-110 %] in so ustrezne. Metoda je bila tudi ponovljiva (Preglednica XII), saj so bili RSD-ji za oba analita nižji od 5 %, kar predstavlja zgornjo mejo sprejemljivosti.

Preglednica XII: Dnevna točnost (%) in ponovljivost (RSD) analize metode za retinol in RP

RETINIL PALMITAT				
Deklarirana konc. [mg/l]	Povprečje odzivov	Izračunana konc. [mg/l]	Točnost [%]	RSD [%]
2,00	155,08	1,98	99,1	2,5
5,00	8,27	4,95	99,0	2,1
10,00	4,67	9,77	97,7	0,6
Povprečje			98,6	1,7
RETINOL				
Deklarirana konc. [mg/l]	Povprečje odzivov	Izračunana konc. [mg/l]	Točnost [%]	RSD [%]
2,08	92,78	1,91	91,7	2,4
5,20	241,57	4,90	94,3	2,1
10,40	482,82	9,76	93,8	0,6
Povprečje			93,3	1,7

▪ Med-dnevna točnost in ponovljivost

Rezultati med-dnevne točnosti in ponovljivosti, ki smo jih vrednotili 3 zaporedne dni, so skupaj s povprečji, SD in RSD predstavljeni v Preglednici XIII. Ti so nižji od meje sprejemljivosti 10 %, tako da ustrezajo kriterijem.

Preglednica XIII: Med-dnevna točnost (%) in ponovljivost (RSD) analize metode za retinol in RP

RETINOL							
KONC. (mg/l)	1. dan	2. dan	3. dan	POVPREČJE KONC.	SD	RSD [%]	TOČNOST [%]
2	1,92	1,76	1,83	1,84	0,08	4,4	92,0
5	4,65	4,77	4,71	4,71	0,06	1,3	94,2
10	9,88	10,44	9,38	9,90	0,53	5,4	99,0

RETINIL PALMITAT							
KONC. (mg/l)	1. dan	2. dan	3. dan	POVPREČJE KONC.	SD	RSD [%]	TOČNOST [%]
2	2,02	2,10	1,98	2,03	0,06	3,0	101,5
5	4,68	5,06	4,95	4,90	0,20	4,0	98,0

10	9,79	10,57	9,77	10,04	0,46	4,5	100,4
----	------	-------	------	-------	------	-----	-------

▪ Ponovljivost injiciranja HPLC-sistema

Vzorec s koncentracijo 10 mg/l, ki smo ga pripravili po postopku 3.2.3.1., smo injicirali šestkrat zaporedoma, izračunali povprečje odzivov ter SD in RSD. Iz rezultatov (Preglednica XIV) je razvidno, da je ponovljivost zelo dobra, RSD je namreč pri obeh analitih nižji od 0,2 %.

Preglednica XIV: Ponovljivost injiciranja HPLC sistema

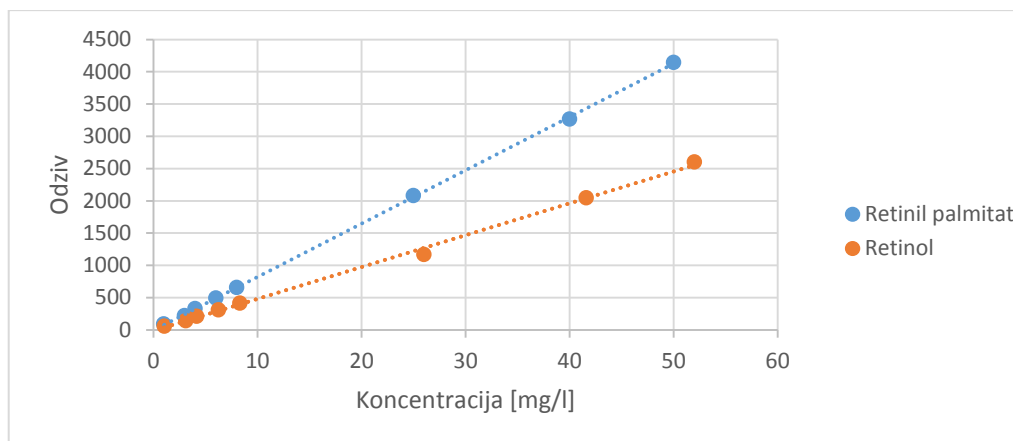
RETINOL			RETINIL PALMITAT		
Zaporedno število injiciranja	Koncentracija	Odzivi	Zaporedno število injiciranja	Koncentracija	Odzivi
1.	10 mg/l	560,48	1.	10 mg/l	878,26
2.		559,29	2.		878,36
3.		558,46	3.		877,01
4.		559,40	4.		877,30
5.		559,16	5.		877,02
6.		559,21	6.		876,25
POVPREČJE		559,33	POVPREČJE		877,37
SD		0,65	SD		0,81
RSD [%]		0,12	RSD [%]		0,09

▪ Linearnost

Linearnost metode smo preverili s kalibracijskimi vzorci v koncentracijskem območju 1-50 mg/l, brez upoštevanja kontrolnih vzorcev (priprava vzorcev opisana v poglavju 3.2.3.1.). Umeritvene premice so bili linearne, kar so potrdile tudi vrednost R^2 (Preglednica XV, Slika 5), ki so bile v vseh primerih višje od 0,999. S tem smo potrdili linearnost metode v izbranem koncentracijskem območju.

Preglednica XV: Enačbe umeritvenih premic za določanje retinola in RP s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti (R^2)

Dan	RETINOL		RETINIL PALMITAT	
	Enačba premice	R^2	Enačba premice	R^2
1.	$y = 45,08x + 13,921$	0,9995	$y = 87,994x + 12,654$	0,9997
2.	$y = 49,707x - 2,0675$	0,9999	$y = 82,595x - 8,5361$	0,9999
3.	$y = 49,707x - 2,0675$	0,9999	$y = 82,595x - 8,5361$	0,9999



Slika 4: Linearnost metode za retinol in RP (2. dan)

▪ Stabilnost kontrolnih vzorcev

Stabilnost kontrolnih vzorcev smo preverjali z namenom, da bi ugotovili, ali že med samo pripravo vzorcev in analizo, pride do razpada katere od aktivnih sestavin. Časovne točke testiranja so bile znotraj enega dne (0-22 ur). Upad ali porast koncentracije smo podali v % glede na začetno stanje (100 %). Vsebnost analitov v roku 6 ur ni padla za več kot 2 %, nekoliko večji upad je bil po enem dnevu, kar kaže na to, da je retinol v mobilni fazi z BHT stabilen krajši čas. Pri višjih koncentracijah je bila stabilnost kontrolnih vzorcev nižja (preglednica XVI).

Preglednica XVI: Stabilnost kontrolnih vzorcev RP in retinola v mobilni fazi z dodanim BHT

STABILNOST RETINIL PALMITATA (%)				
	Čas			
Koncentracija	0 h	3 h	6 h	22 h
2 mg/L	100	99,8	99,4	100,3
5 mg/L	100	99,5	99,1	98,7
10 mg/L	100	99,2	99,1	95,2
STABILNOST RETINOLA (%)				
	Čas			
Koncentracija	0 h	3 h	6 h	22 h
2 mg/L	100	100,5	100,7	100,5
5 mg/L	100	99,5	98,8	96,8
10 mg/L	100	98,7	98,0	92,1

Ker se ovrednoteni validacijski parametri skladajo z vnaprej določenimi kriteriji, lahko zaključimo, da je naša analizna metoda primerna za ugotavljanje vsebnosti in stabilnosti retinola in njegovega estra RP v izbranih kozmetičnih izdelkih.

4.3. STABILNOSTNA ŠTUDIJA

Stabilnostna študija je predstavljala osrednji del diplomske naloge. Vitamini so na splošno precej nestabilne spojine zaradi česar njihova vsebnost v izdelku začne hitro padati v primeru neustrezne zaščite pred različnimi vplivi iz okolja. Za vitamin A je znano, da je zaradi oksidacijskih procesov nestabilen v prisotnosti kisika, podobno je tudi ob izpostavljenosti UV svetlobi in povišani temperaturi, ki lahko povzročita (foto)izomeracijo spojine (19). V okviru naloge smo želeli sistematično predstaviti vpliv omenjenih dejavnikov na stabilnost obeh obravnavanih KAS – retinola in RP.

4.3.1. VSEBNOST VITAMINA A V KREMAH

Retinol je bil prisoten v kremi Vichy, v precej nižji koncentraciji pa smo ga zasledili tudi v kremi znamke L'oreal, v kateri pa je prevladoval RP. Večinoma se v kreme zaradi lažjega formuliranja in večje stabilnosti dodaja njegov ester RP. Ta oblika vitamina A je bila prisotna v vseh preiskovanih izdelkih razen v kremi znamke Vichy.

Večina kozmetičnih izdelkov ne navaja podatka o vsebnosti posameznih sestavin, kljub temu da gre za sestavino, ki jo oglašujejo kot aktivno. Dva od petih kozmetičnih izdelkov, ki smo jih vrednotili, sta ta podatek vseeno vsebovala. Zasledili smo ga na obojnini, ali pa smo ga našli na spletu. Pri teh smo navedeno vsebnosti primerjali z izmerjeno (Preglednica XVII). Kjer podatka nismo imeli, smo ga izračunali sami in preverili ali je v skladu z informacijami o priporočeni mejni vrednosti v Preglednici II. Koncentracijo retinola in RP smo izračunali s pomočjo umeritvene premice, ki smo jo izdelali v drugem dnevu validacije HPLC metode (Preglednica XVII).

Preglednica XVII: Navedene in ugotovljene vsebnosti retinola in RP v testiranih kremah

Kozmetični izdelek	Navedena vsebnost v kremi m/m [%]	Vsebnost v vzorcu [mg/l]	Vsebnost v kremi m/m [%]
Vichy (retinol)	0,2	50,2	0,20
Eveline-night (RP)	/	4,6	0,004
Eveline-day (RP)	/	4,4	0,004
L'oreal (RP)	/	37,8	0,030
L'oreal (retinol)	/	0,8	0,0007
Derma e (RP)	0,005	2,3	0,002

Pričakovali smo, da koncentracije KAS v izdelkih ne bodo visoke, kar se je tudi izkazalo za pravilno. Le pri kremi Vichy smo izmerili visoko koncentracijo retinola, ki je bila blizu

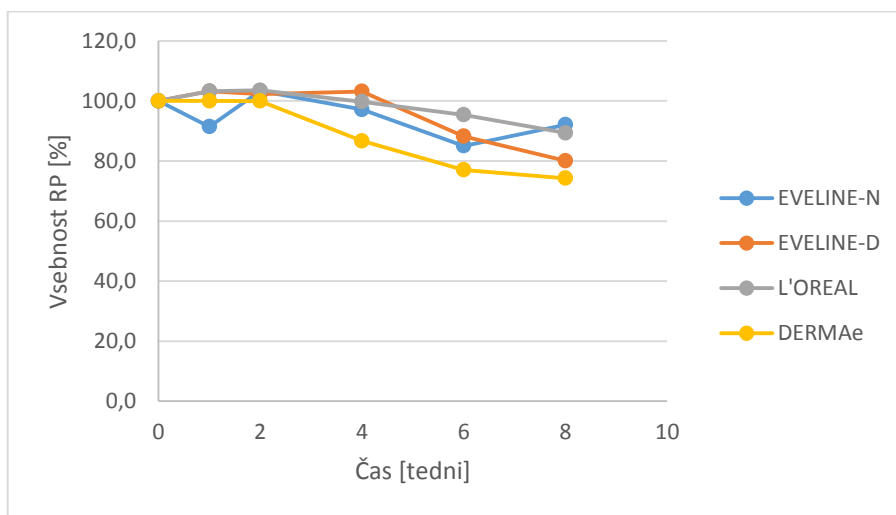
dovoljene mejne vrednosti 0,3 % (7). Podatki v preglednici II se sicer nanašajo na retinol, a so pričakovane priporočene koncentracija za RP še višje (v testiranih izdelkih je bilo 0,002-0,030 % RP). Rezultati meritev retinola v kremi Vichy so se popolnoma ujemali z navedeno vsebnostjo (Preglednica XVII). Za to kremo iz visokega cenovnega razreda, ki kot aktivno komponento vsebuje retinol v visoki koncentraciji, se je pokazalo, da gre res za kakovosten izdelek. Vsebnost retinola je namreč skladna z deklaracijo, kar pa pomeni, da je retinol, kljub njegovi nestabilnosti, v tem izdelku ustrezno stabiliziran. Pri kremi Derma e se je izkazalo, da je bila vsebnost RP za več kot polovico nižja od navedene. Možnosti za takšen rezultat so različne, morebiti je prišlo do spremembe ali napake v proizvodnem procesu ali pa kasneje do nestabilnosti vitamina med shranjevanjem. Verjetnejša je druga možnost, saj smo tudi v okviru stabilnostne študije ugotovili, da je RP v kremi Derma e nestabilen že znotraj krajšega časovnega obdobja (Slika 6 in 7). Zanimivo je tudi, da je v kremi L'oreal prisoten tako RP kot tudi retinol. Slednjega je približno 50-krat manj, možen razlog za ta neobičajen rezultat (prisotnost obeh oblik vitamina A) je lahko nestabilnost RP, ki se hidrolizira do retinola.

Cena izdelka je tudi delno pogojena s koncentracijo KAS. Krema L'oreal in Eveline Night in Day so predstavnice nižjega cenovnega razreda, vsebnost RP je bila pri njih bistveno nižja kot pri kremi Vichy. Glede na to, da Derma e spada v srednji cenovni razred, bi pričakovali višjo vsebnost RP in boljšo kakovost samega izdelka (ugotovljena nestabilnost v stabilnostni študiji). Cenovni razred kreme bi bilo smiselno primerjati s kakovostjo izdelka oz. vsebnostjo glede na deklarirano koncentracijo. Ker pa pri večini izbranih krem ni bila navedena količina vitaminov, ta primerjava ni mogoča.

4.3.2. VPLIV TEMPERATURE

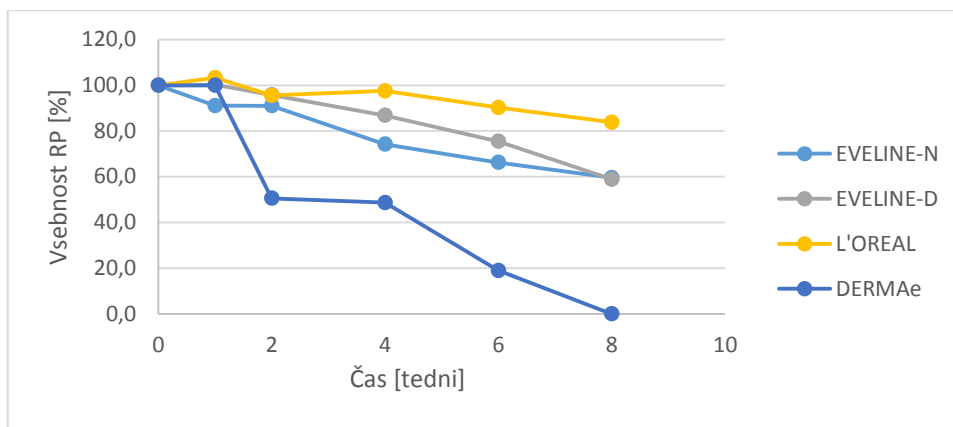
Temperatura ima velik vpliv na hitrost kemijskih procesov. Povišana temperatura bistveno pospeši reakcije, kemične in fizikalne spremembe pa se zaradi tega izražajo hitreje in v večjem obsegu, to pa posledično vodi v manjšo obstojnost (11). Stabilnost vitamina A v kozmetičnih izdelkih smo vrednotili pri 25 °C (sobna temperatura) in 40 °C, saj sta to osnovna pogoja, ki se uporabljata pri izvajanju dolgoročnih in pospešenih testov stabilnosti. Vpliv tega dejavnika smo vrednotili v skladu s postopkom 3.2.4.2., vsebnost retinola oz. RP smo spremljali v vsaki kremi posebej. Rezultati so predstavljeni na Slikah 6-10.

Kozmetični izdelki z RP, ki smo jih shranjevali pri sobni temperaturi, so izkazovali relativno dobro stabilnost znotraj testnega obdobja (8 tednov). Vsebnost je v vseh kozmetičnih izdelkih počasi upadala, nekoliko večji upad (do 20 % v 8 tednih) smo zasledili le pri kremi znamke Derma e in Eveline - Night (Slika 6). Rezultati stabilnosti za RP v izbranih kremah so primerljivi z literaturnimi podatki - po 77 dneh shranjevanja izdelka pri 25 °C se teoretično ohrani do 85 % RP (12).



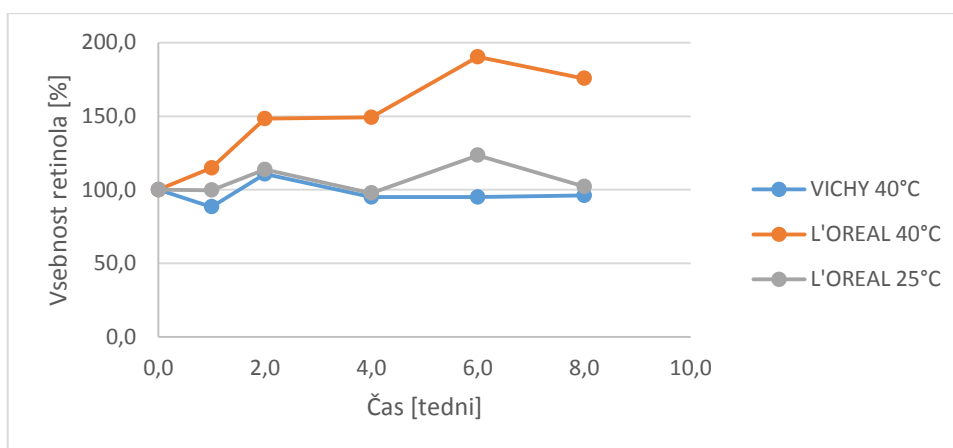
Slika 5: Upad vsebnosti RP v kozmetičnih izdelkih pri 25 °C

Pri 40 °C je RP manj stabilen v kremah kot pri 25° C (Slika 7). Največjo stabilnost pri povišani temperaturi izkazuje krema L'oreal, kjer je bila vsebnost RP pri 40 °C le nekoliko nižja kot pri sobni temperaturi. Približno enako upada RP v obeh izdelkih znamke Eveline Cosmetics, kar je bilo tudi pričakovano. Manj pričakovana pa je slabša stabilnost RP v kremi Derma e (popolna razgradnja po 8 tednih), saj le-ta spada v nekoliko višji cenovni razred. Ti rezultati so pokazali, da pogoji shranjevanja igrajo pomembno vlogo pri ohranjanju vsebnosti RP skozi čas. Najbolj optimalno je shranjevati pripravke pri nižji temperaturi, priporočljivo morda še pri temperaturi nižji od 25 °C.



Slika 6: Upad vsebnosti RP v kozmetičnih izdelkih pri 40 °C

Kremi L'oreal in Vichy sta vsebovali retinol. Vichy je blagovna znamka višjega cenovnega razreda. To se vidi že po ovojnini (tuba, ki omogoča čim manjši stik vsebine z zunanostjo), ki je izdelana na način, da čim bolj zaščiti aktivne komponente v izdelku. Rezultati stabilnosti retinola v tej kremi to le še potrjuje, saj je bil upad koncentracije minimalen celo pri povišani temperaturi (Slika 8). Tudi pri kremi L'oreal se koncentracija retinola pri 25 °C s časom ni bistveno spremenila, zaznali smo le nekoliko večje nihanje med različnimi časovnimi točkami. Prišlo pa je do tega, da se je pri povišani temperaturi vsebnost s časom povečevala. V kremi L'oreal smo našli obe obliki vitamina A – retinol in RP, zato bi bila za višjo vsebnost retinola v kasnejših časovnih točkah lahko odgovorna hidroliza RP (prisoten v precej višji koncentraciji) do retinola. Če velja slednja trditev, je prisotnost retinola v kremi lahko posledica hidrolize RP že med samim shranjevanjem in je v osnovi v kremo dodan le RP.

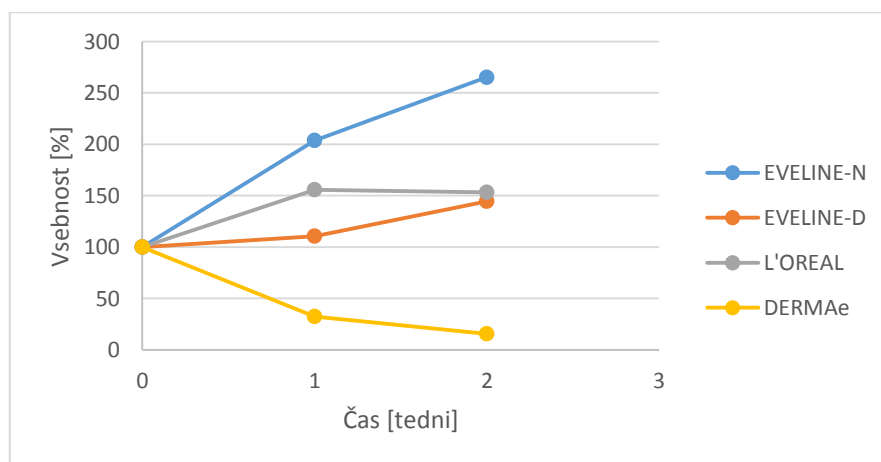


Slika 7: Vsebnost retinola v kozmetičnih izdelkih pri različnih temperaturah

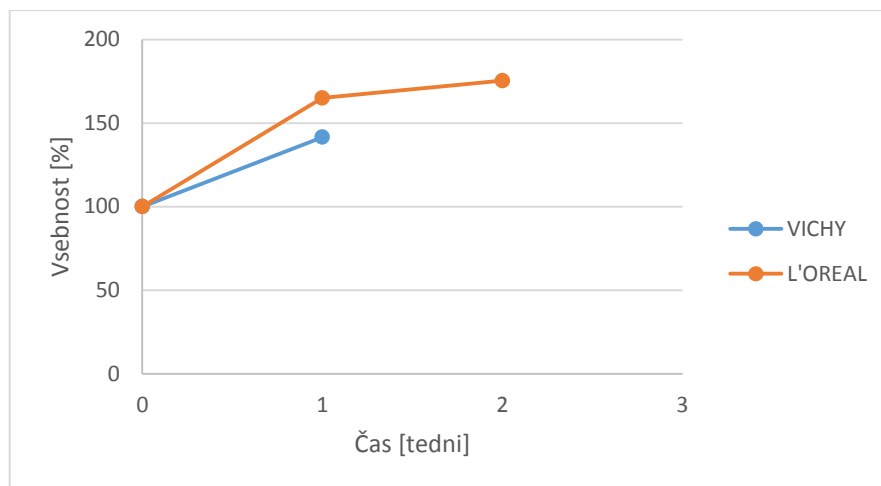
V stabilnostni študiji smo poleg analize vsebnosti aktivne komponente vrednotili tudi organoleptične lastnosti. Vse kreme shranjene v komori pri povišani temperaturi so bile po svoji konsistenci precej manj viskozne od tistih na sobni temperaturi. Prišlo je do spremembe iz poltrdne v tekočo obliko. Rahlo se je izdelku spremenil tudi vonj, medtem ko je barva ostala enaka.

4.3.3. VPLIV KISIKA

Vpliv kisika smo proučevali po metodi opisani v poglavju 3.2.4.3. in rezultate podali grafično v obliki spremembe vsebnosti aktivne komponente s časom. Časovno obdobje vrednotenja je bilo krajše in je potekalo znotraj dveh tednov pri povišani temperaturi. Kljub temu, da je bila prvotna masa vzorcev v petrijevkah 10 g (3 g pri Vichy), se je ta zaradi hlapenja vodnih komponent kreme, zmanjšala za več kot polovico. Pri vseh kremah z izjemo kreme Derma e se je vsebnost retinola oziroma RP posledično povišala (Sliki 9 in 10). Iz podatkov pridobljenih v študiji ne moremo bolj natančno interpretirati rezultatov glede stabilnosti aktivnih komponent. Potrdimo lahko le dejstvo, da je RP v prisotnosti kisika zelo nestabilen v kremi Derma e (občuten padec kljub izhlapevanju komponent kreme). Za ovrednotenje vpliva kisika na stabilnost retinola oz. RP v kremah bo v prihodnje potrebna bolj optimalna izvedba poskusa.



Slika 8: Vpliv kisika na vsebnost RP v pripravkih



Slika 9: Vpliv kisika na vsebnost retinola v kozmetičnih izdelkih

4.3.4. VPLIV SVETLOBE

Preverjali smo tudi vpliv svetlobe na obstojnost retinola oz. RP v kremah. Izkazalo se je, da svetloba še najbolj vpliva na upad vsebnosti vitamina A med vsemi testiranimi zunanji dejavniki. Stabilnost smo vrednotili v skladu s postopkom 3.2.4.4. Po 4 dneh v komori s svetlobnim virom pri 40 °C je bil upad koncentracije aktivne komponente v vseh vzorcih večji od 75 %, ponekod pa tudi 100 % (Preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Vpliv svetlobe na stabilnost KAS po 4 dneh v klimatski komori s svetlobnim virom pri 40 °C

IZDELEK	Konc. pred izpostavitvijo svetlobi [mg/l]	Konc. po izpostavitvi svetlobi t=4 d [mg/l]	Upad konc. KAS
Vichy (retinol)	40,2	8,8	78,1 %
Eveline-day (RP)	4,4	0,7	84,1 %
Eveline-night (RP)	4,6	0	100,0 %
L'oreal (RP)	36,3	1,3	96,3 %
L'oreal (retinol)	0,9	0	100,0 %
DermaE (RP)	2,3	0	100,0 %

Rezultati fotorazgradnje niso primerljivi z dostopnimi podatki iz literature, ki navaja, da se na svetlobi pri 4 °C v 7 dneh razgradi do 40 % RP (20), v našem primeru je bil upad koncentracije KAS večji. Je pa res, da smo mi vzorce testirali pri višji temperaturi in verjetno uporabili močnejši vir svetlobe. Pod vplivom svetlobe se vitamin A nereverzibilno pretvori v obliko, ki je biološko neaktivna (21), s tem pa tudi izdelek, ki kot KAS navaja vitamin A, postane neučinkovit. Zato je za ustrezno delovanje retinola in RP ter posledično

doseg zelenega učinka na kožo, potrebno izdelke, ki navajajo spojini kot KAS, zaščititi pred svetlobo.

5. SKLEP

Vsebnost retinoidov v vzorcih smo vrednotili z metodo HPLC. Že prej razvito metodo smo prilagodili, da je bila le-ta primerna za naše vzorce, in jo nato ovrednotili. Potrdili smo, da je postopek priprave vzorcev ponovljiv in linearen ter ima visok izkoristek ekstrakcije. V skladu z ICH smernicami smo potrdili tudi selektivnost, točnost, ponovljivost in linearnost HPLC-metode. Prav tako smo preučevali stabilnost raztopin retinola in RP in uspeli stabilizirati oba analita pri pripravi vzorca z dodatkom antioksidanta BHT.

V nadaljevanju smo najprej preverili dejanske koncentracije obeh aktivnih sestavin retinola in RP v 5 izbranih kremah za obraz. Neposredno smo lahko primerjali vsebnosti retinola oz. RP za dve kremi, ki sta imeli podano vsebnost. Rezultati meritev retinola v kremi Vichy so se popolnoma ujemali z navedeno vsebnostjo. Za to kremo iz visokega cenovnega razreda se je pokazalo, da gre res za kakovosten izdelek, saj je retinol, kljub njegovi nestabilnosti, v tem izdelku ustrezno stabiliziran. Pri kremi Derma e se podatek o vsebnosti ni skladal z izmerjenim, saj je vsebovala za približno 2,5-krat manj RP od navedenega. Zelo verjetno je v tem primeru prišlo do nestabilnosti vitamina med shranjevanjem, kar smo v okviru stabilnostne študije tudi potrdili, saj je RP v kremi Derma e nestabilen že znotraj krajšega časovnega obdobja (2 tedna). Koncentracije KAS v izbranih izdelkih (0,002-0,030 % RP v kremi), razen pri Vichy (0,2% retinola v kremi), so bile glede na zgornjo dovoljeno mejo precej nizke, zaradi česar se pojavlja dvom ali izbrani pripravki deluje na način, kot jih navajajo proizvajalci.

Stabilnostna študija je predstavljala osrednji namen diplomske naloge. Znotraj le-te smo testirali kako parametri nestabilnosti (povišana temperatura, svetloba in kisik) vplivajo na upad koncentracije preiskovanih spojin. Vpliv teh smo vrednotili v različnih časovnih točkah znotraj 8 tednov pri povišani temperaturi, 2 tednov pri izpostavitvi kisiku in po 4 dneh v komori s svetlobnim virom. Po končani študiji smo upad koncentracije analitov primerjali z začetno koncentracijo in na podlagi tega podali zaključke o stabilnosti kozmetičnega izdelka. Kozmetični izdelki shranjeni na sobni temperaturi (25 °C) so izkazovali dobro stabilnost znotraj testnega obdobja, medtem ko je pri povišani temperaturi (40 °C) vsebnost RP hitreje upadala, v večini primerov za več kot 40 %, pri kremi Derma e pa celo za 100%. Iz rezultatov o vplivu kisika smo ugotovili, da je bila potrebna bolj optimalna izvedba poskusov, saj na podlagi le-teh nismo mogli sklepati o nestabilnosti izdelka, razen za kremo Derma e. Svetloba je na vsebnost vitamina A še najbolj vplivala,

saj je bil upad koncentracije v vseh vzorcih večji od 78 %. KAS v kremi znamke Vichy se je v celotni študiji izkazala za najbolj stabilno, krema znamke Derma e pa za najmanj.

Za pridobitev bolj tehtnih zaključkov bi morali imeti na razpolago večje število vzorcev krem. Na podlagi pridobljenih rezultatov pa lahko zaključimo, da je pri rokovanju z izdelki z občutljivimi spojinami kot sta retinol in RP, le-te potrebno ustrezno zaščititi pred zunanjimi dejavniki nestabilnosti. Veliko lahko naredimo že z izbiro ustrezne ovojnine, ki vsebino ščiti pred zunanjimi vplivi in zagotavlja ustrezno delovanje izdelka tekom roke uporabe ter shranjujemo pri nižji temperaturi in zaščiteno pred svetlobo.

6. LITERATURA

1. Draelos Z D, Thaman L A; Cosmetic Formulation of Skin Care Products – Cosmetics Science and Technology Series; 1st edition; Informa Health Care Inc.; New York; 2006; pages 167-170, 187-189, 276-278, 404
2. Draelos Z D; Cosmeceuticals; 2nd edition; Elsevier Saunders; Philadelphia, USA; 2005; pages 35-41, 108-109
3. Kwiecien A, Hubicka U, Krzek J; Determination of Retinil Palmitate in ointment by HPLC with diode array detection; Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research;; Volume 67(5); 2010; pages 475-479
4. Medić-Šarić M, Buhač I, Bradamante V; Vitamini in minerali – resnice in predhodki; 1st edition; In obs medicus; Ptuj, 2002; pages 5-12, 17-29
5. Internetna stran: <http://extension.colostate.edu/topic-areas/nutrition-food-safety-health/fat-soluble-vitamins-a-d-e-and-k-9-315/> (dostopano:3.4.2016)
6. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting H C, Roeder A, Weindl G; Retinoids in the treatment of skin aging: An overview of clinical efficacy and safety. Clinical Interventions in Aging; Volume 1(4); 2006; pages 327–348.
7. Internetna stran: <http://www.vkm.no/dav/afdc8a9688.pdf> (dostopano 4.4.2016)
8. Internetna stran: <http://www.dr-baumann-international.co.uk/science/BASF%20Vitamin%20A.pdf> (dostopano: 3.4.2016)
9. Mriouah N; Rethinking retinoids – A New Approach to Skincare's No. 1 Ingredient; Skin, Inc.; Volume 24(8); 2012; page 74
10. Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. Cosmetic Toiletry and Fragrance Association and The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association;; 2004; pages 1–8
11. Roškar R; Embalaža in stabilnost; Vaje iz stabilnosti zdravil; 2013
12. Guaratini T, Gianeti M D, Campos P M; Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A : Chemical and physical aspects; International Journal of Pharmaceutics; Volume 327 (12–16); 2006; pages 6-12
13. Internetna stran: http://www.brenntag.com/media/documents/bsi/product_data_sheets/life_science/basf_vitamins/basf_vitamin_a-palmitate_10_mio_iu-g_stable_w_bht_pds.pdf (dostopano: 5.5.2016)

14. Internetna stran: <http://www.zdravilnerastline.si/vitamini-in-minerali/47-vitamin-a-retinol.html> (dostopano: 14.7.2016)
15. Srečnik E: Vrednotenje vsebnosti in stabilnosti lipofilnih vitaminov in koencinma Q10 v zdravilih in prehranskih dopolnilih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (Magistrska naloga), Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2017
16. International Conference on Harmonization Guidelines - Validation of analytical procedures Q2(R1); Proceeding of the International Conference of Harmonization (ICH); Commission of the European Communities; 2005
17. Internetna stran: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf> (dostopano 14.7.2016)
18. Thompson M, Ellison S R L., Fajgelj A, Willetts P, Wood R; Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement; International union of pure and applied chemistry; Volume (1-5); 1996
19. Tsunoda T, Takabayashi K; Stability of all-trans-retinol in cream; Journal of Cosmetic Science; Volume 46; 1995; pages: 191–198
20. Tolleson W H, Cherng S, Xia Q, Boudreau M, Yin J J, Wamer W G, Howard P C, Yu H, Fu P P; Photodecomposition and Phototoxicity of Natural Retinoids; International Journal of Environmental Research and Public Health; Volume 2(1); 2005; pages 147–155
21. Carlotti M E, Ugazio E, Sapino S, Peira E, Gallarate M; Photodegradation of retinol and anti-aging effectiveness of two commercial emulsions; Journal of Cosmetic Science; Volume 57; 2006; pages 261-277
22. Internetna stran: <http://bestanti-aging.com/anti-aging-skin-care-news/differences-retinoids-retinols/> (dostopano 15.7.2016)